

Einfluss von
Staphylococcus aureus α -Toxin,
Streptococcus pyogenes Streptolysin-O und
Escherichia coli Lipopolysaccharid auf die Funktion und Interaktion
humaner Thrombozyten und neutrophiler Granulozyten

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Dipl. Pharm. Monika Erlenkamp

geb. am 11.6.1984 in Bad Frankenhausen

Gutacher

Prof. Dr. med. Michael Buerke

Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Dr. rer. nat. Andreas Hilgeroth

Tag der Verteidigung

9.1.2015 in Halle (Saale)

Das Leben ist viel zu kurz, um krank zu sein! (Monika Erlenkamp)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XII
1.Theoretischer Teil.....	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Sepsis.....	2
1.2.1 Pathogenese der Sepsis.....	4
1.3. Infektiöse Endokarditis.....	8
1.3.1 Pathogenese der infektiösen Endokarditis.....	10
1.4 Thrombozyten.....	12
1.4.1 Thrombozytenmorphologie.....	12
1.4.2 Thrombozytenadhäsion.....	14
1.4.3 Thrombozytenaktivierung.....	15
1.4.4 Thrombozytenaggregation und Gerinnselretraktion.....	19
1.4.5 Inhibitoren der Thrombozytenfunktion.....	20
1.4.6 Proteinexpression und Bcl-3.....	21
1.4.6.1 Inhibierung der thrombozytären Proteinexpression.....	23
1.5 Neutrophile Granulozyten.....	24
1.5.1 Morphologie von neutrophilen Granulozyten.....	24
1.5.2 Funktion von neutrophilen Granulozyten.....	25
1.5.3 Phorbol 12-Myristinsäure 13-Acetat.....	27
1.6 Staphylococcus aureus.....	28
1.6.1 α -Toxin von Staphylococcus aureus.....	29
1.7 Streptococcus pyogenes.....	31
1.7.1 Streptolysin-O von Streptococcus pyogenes.....	32
1.8 Escherichia coli.....	34
1.8.1 Lipopolysaccharide.....	35
1.9 Zielstellung.....	37
2. Material und Methoden.....	38
2.1 Material.....	38
2.1.1 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Glasware.....	38
2.1.2 Chemikalien und eingesetzte Versuchssubstanzen.....	40
2.2. Methoden.....	42
2.2.1 Isolierung humaner Thrombozyten aus Vollblut.....	42
2.2.2 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut.....	45

2.2.3 Suspensionsversuche in Fibrinogen	48
2.2.4 Adhäsionsversuche mit Kollagen und Fibrinogen	49
2.2.5 Proteinextraktion aus Thrombozyten	50
2.2.6 Proteinbestimmung nach Popov	50
2.2.7 Grundlagen des Western Blot	51
2.2.7.1 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
2.2.7.2 Proteintransfer	55
2.2.7.3 Proteinfärbung mit Ponceau S	56
2.2.7.4 Immunologischer Nachweis des Bcl-3 Proteins	57
2.2.7.5 Immunologischer Nachweis von β -Aktin.....	58
2.2.8 Thrombozytenaggregometrie nach Born	58
2.2.9 Durchflusszytometrische Messungen	59
2.2.10 Statistische Auswertung	62
3. Ergebnisse	63
3.1 Thrombozytenaggregometrie	63
3.1.1 Physiologisch und durch bakterielle Toxine induzierte Thrombozytenaggregation.....	63
3.1.2 Inhibierung der physiologisch und Toxin-induzierten Thrombozytenaggregation	65
3.1.3 Interaktion von Thrombozyten und PMN bei der Thrombozytenaggregation	69
3.2 Bcl-3 Proteinexpression in humanen Thrombozyten.....	72
3.2.1 Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen	73
3.2.2 Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärenent an Fibrinogen	76
3.2.3 Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärenent an Kollagen.....	77
3.2.4 Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Zeit	78
3.2.5 Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO-Konzentration.....	81
3.2.6 Inhibierung der SLO induzierten Bcl-3 Expression	85
3.3 Durchflusszytometrie	89
3.3.1. Abhängigkeit der GPIIb/IIIa-Aktivierung von der α -Toxin-Konzentration	89
3.3.2 Abhängigkeit der GPIIb/IIIa-Aktivierung von der SLO-Konzentration.....	92
3.3.3 Aktivierung von Thrombozyten über 24 Stunden	95
3.3.4 Inhibierung der Thrombozytenaktivierung	99
3.3.5 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten.....	104
3.3.5.1 Synergistische Interaktionen zwischen PMN und Thrombozyten.....	115
4. Diskussion.....	116
4.1 Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie.....	116
4.2 Ergebnisse der Bcl-3 Proteinexpression unter Toxineinfluss	121
4.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie.....	125
5. Zusammenfassung und Ausblick	133
6. Literaturverzeichnis.....	I
7. Anhang.....	XIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Geschlechtsspezifische Inzidenz der Sepsis in den USA von 1979-2000 (modifiziert nach [18])	2
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Pathogenese der Sepsis (modifiziert nach [26,27])	5
Abbildung 3 Schematische Darstellung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch PAMPs (modifiziert nach [28])	6
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Aktivierung des adaptiven Immunsystems über APC (modifiziert nach [28]).....	6
Abbildung 5 Vegetationen (Pfeile) im Rahmen einer Endokarditis durch Streptococcus viridans mit Befall der Mitralklappe [39]	8
Abbildung 6 Schematische Darstellung der Pathogenese der Endokarditis (modifiziert nach [43,56])	11
Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Blutzellen [57].....	12
Abbildung 8 Morphologie eines ruhenden Thrombozyten [63]	13
Abbildung 9 Morphologie eines aktivierten Thrombozyten [63].....	13
Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Aufnahme von aggregierten Thrombozyten [64]	14
Abbildung 11 Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung (modifiziert nach [72,75])....	17
Abbildung 12 Übertragung des Translationsapparates und des Spleißosomens während der Thrombopoese [104].....	21
Abbildung 13 Proteinexpression in Thrombozyten.....	22
Abbildung 14 Struktur von Puromycin [117].....	23
Abbildung 15 Struktur von t-RNA (R = Rest) [117]	23
Abbildung 16 PMN in verschiedenen Reifestadien [120,121]	24
Abbildung 17 Schematische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten [123]	25
Abbildung 18 Leukozytenextravasation (modifiziert nach [129])	26
Abbildung 19 Struktur von PMA [137]	27
Abbildung 20 Struktur von DAG [139].....	27
Abbildung 21 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Staphylococcus aureus [140]	28
Abbildung 22 Schematische Darstellung der Porenformation von α -Toxin (modifiziert nach [10])....	29
Abbildung 23 Negativkontrastfärbung von α -Toxin lysierten Kaninchen-Erythrozyten [154].....	30
Abbildung 24 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Streptococcus pyogenes [157]	31
Abbildung 25 Schematische Darstellung der reversiblen Oxidation bzw. Reduktion von SLO [164] ...	32
Abbildung 26 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von SLO lysierten Thrombozytenmembranen [167].....	33
Abbildung 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Escherichia coli [173]	34
Abbildung 28 Struktur von E. coli O111:B4 LPS modifiziert nach [184]	35
Abbildung 29 Schematische Darstellung der LPS-TLR-4 Signalkaskade (modifiziert nach [190,192]) ..	36
Abbildung 30 Schematische Darstellung der Isolation von Thrombozyten aus humanen Vollblut.....	43
Abbildung 31 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer	45
Abbildung 32 Schematische Darstellung der Isolation von PMN aus humanen Vollblut	47
Abbildung 33 Trypanblau gefärbte PMN.....	48
Abbildung 34 Ausgefällter Amidoschwarz-Protein-Komplex.....	51
Abbildung 35 Schematische Darstellung der Abläufe beim Bcl-3 Western Blot.....	52
Abbildung 36 Ponceau S gefärbte PVDF-Membran	56
Abbildung 37 Messküvetten gefüllt mit PPP, PRP und durch α -Toxin aggregiertes PRP	59
Abbildung 38 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten Thrombozyten nach fünf Minuten	61
Abbildung 39 FSC-PAC-1 Dot Plot von unstimulierten Thrombozyten nach fünf Minuten.	61
Abbildung 40 SSC-FSC Dot Plot von Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin .	61
Abbildung 41 FSC-PAC-1 Dot Plot von Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin	61

Abbildung 42 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten gegateten Thrombozyten nach fünf Minuten Inkubationszeit.....	62
Abbildung 43 SSC-FSC Dot Plot von gegateten Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin.....	62
Abbildung 44 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der ADP-Konzentration.....	64
Abbildung 45 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Kollagen-Konzentration.....	64
Abbildung 46 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der AA-Konzentration.....	64
Abbildung 47 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Epinephrin-Konzentration.....	64
Abbildung 48 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Ristocetin-Konzentration.....	65
Abbildung 49 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der α -Toxin-Konzentration.....	65
Abbildung 50 Inhibierung der mit 5 μ M ADP induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration.....	66
Abbildung 51 Inhibierung der mit 1 μ g/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration.....	66
Abbildung 52 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration.....	67
Abbildung 53 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration.....	67
Abbildung 54 Inhibierung der mit 1 μ g/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration.....	67
Abbildung 55 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration.....	67
Abbildung 56 Inhibierung der mit 5 mM ADP induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration.....	67
Abbildung 57 Inhibierung der mit 1 μ g/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration.....	67
Abbildung 58 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration.....	68
Abbildung 59 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Indometacin-Konzentration.....	68
Abbildung 60 Inhibierung der mit 3,5 μ g/ml α -Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration.....	69
Abbildung 61 Inhibierung der mit 3,5 μ g/ml α -Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration.....	69
Abbildung 62 Inhibierung der mit 3,5 μ g/ml α -Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration.....	69
Abbildung 63 Inhibierung der mit 3,5 μ g/ml α -Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Puromycin-Konzentration.....	69
Abbildung 64 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten.....	70
Abbildung 65 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz.....	70
Abbildung 66 Mikroskopische Aufnahme von PMA (0,5 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten.....	70
Abbildung 67 Mikroskopische Aufnahme von PMA (0,5 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz.....	70
Abbildung 68 Mikroskopische Aufnahme von α -Toxin (3,5 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten.....	70
Abbildung 69 Mikroskopische Aufnahme von α -Toxin (3,5 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz.....	70
Abbildung 70 Mikroskopische Aufnahme von E.coli LPS (0,1 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten.....	70
Abbildung 71 Mikroskopische Aufnahme von E.coli LPS (0,1 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz.....	70
Abbildung 72 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten.....	71

Abbildung 73 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz	71
Abbildung 74 PMA ausgelöste relative Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der PMN-Anzahl	72
Abbildung 75 α -Toxin ausgelöste relative Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der PMN-Anzahl	72
Abbildung 76 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen	73
Abbildung 77 Mikroskopische Aufnahme von α -Toxin (0,5 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	73
Abbildung 78 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	74
Abbildung 79 Mikroskopische Aufnahme von Thrombin (0,1 U/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	74
Abbildung 80 Mikroskopische Aufnahme von mit LPS (0,1 μ g/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	74
Abbildung 81 Aggregierte Thrombozyten in Suspensionen mit Fibrinogen zeigen eine erhöhte Lichtdurchlässigkeit.....	75
Abbildung 82 Thrombozytenpellets nach Zentrifugation von in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Plättchen	75
Abbildung 83 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigen β -Aktin Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen	75
Abbildung 84 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen.....	76
Abbildung 85 Vergleich der Ausschnitte aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigen β -Aktin Blot von Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen.....	76
Abbildung 86 Reduktion der relatven Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Inkubation der Thrombozyten ohne Fibrinogen.....	76
Abbildung 87 Blick auf adhärente Thrombozyten in mit Fibrinogen beschichteten Zellkulturplatten	77
Abbildung 88 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten adhärent an Fibrinogen	77
Abbildung 89 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärent an Fibrinogen.....	77
Abbildung 90 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten adhärent an Kollagen.....	78
Abbildung 91 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärent an Kollagen	78
Abbildung 92 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit	79
Abbildung 93 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.....	79
Abbildung 94 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach 12 Stunden in Suspension mit Fibrinogen	80
Abbildung 95 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach 12 Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	80
Abbildung 96 Vergleich der Ausschnitte aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von unstimulierten und mit SLO stimulierten Thrombozyten nach vier bzw. 24 Stunden.	80
Abbildung 97 Vergleich der relativen Signalintensitäten der Bcl-3 Expression von unstimulierten und mit SLO stimulierten Thrombozyten nach vier bzw. 24 Stunden.....	80
Abbildung 98 Thrombozytenpellets von mit SLO in steigender Konzentration stimulierten Plättchen	81
Abbildung 99 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen	81

Abbildung 100 Mikroskopische Aufnahme von SLO (125 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	81
Abbildung 101 Mikroskopische Aufnahme von SLO (250 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	81
Abbildung 102 Mikroskopische Aufnahme von SLO (500 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	82
Abbildung 103 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	82
Abbildung 104 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen	82
Abbildung 105 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO-Konzentration	82
Abbildung 106 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen unter Zusatz von Cystein.....	83
Abbildung 107 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO Konzentration unter Zusatz von Cystein.....	83
Abbildung 108 Vergleich der relativen Signalintensitäten der Bcl-3 Expression von Thrombozyten stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz.....	83
Abbildung 109 Mikroskopische Aufnahme von nur mit Cystein stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	84
Abbildung 110 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (500 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	84
Abbildung 111 Mikroskopische Aufnahme von nur mit Cystein stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	84
Abbildung 112 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	84
Abbildung 113 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten inkubiert mit SLO mit Cysteinzusatz bzw. nur Cystein.....	85
Abbildung 114 Vergleich der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten stimuliert mit SLO mit Cysteinzusatz bzw. nur mit Cystein.....	85
Abbildung 115 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Puromycin	86
Abbildung 116 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Puromycin	86
Abbildung 117 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Rapamycin	87
Abbildung 118 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Rapamycin.....	87
Abbildung 119 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Abciximab, Iloprost und NPN.....	87
Abbildung 120 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Abciximab, Iloprost und NPN	88
Abbildung 121 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,01 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	90
Abbildung 122 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,025 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	90
Abbildung 123 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,05 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	91
Abbildung 124 Aufgesplitteter Graph von PAC-1 positiven Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,05 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	91
Abbildung 125 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	91
Abbildung 126 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,25 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	91

Abbildung 127 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	91
Abbildung 128 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 2,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	91
Abbildung 129 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	92
Abbildung 130 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 50 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 131 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 132 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 133 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 134 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 135 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden	93
Abbildung 136 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 5 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	94
Abbildung 137 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 25 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	94
Abbildung 138 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 50 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	94
Abbildung 139 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	94
Abbildung 140 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 100 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	95
Abbildung 141 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	95
Abbildung 142 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden	96
Abbildung 143 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden	96
Abbildung 144 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden	96
Abbildung 145 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden	96
Abbildung 146 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden	97
Abbildung 147 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden	97
Abbildung 148 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden	97
Abbildung 149 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden	97
Abbildung 150 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden	98
Abbildung 151 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden	98
Abbildung 152 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden	98

Abbildung 153 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden	98
Abbildung 154 Absolut-werte der Inhibierung der mit Thrombin ausgelösten Thrombozytenaktivierung	99
Abbildung 155 Absolutwerte der Inhibierung der mit α -Toxin ausgelösten Thrombozytenaktivierung	100
Abbildung 156 Absolutwerte der Inhibierung der mit SLO ausgelösten Thrombozytenaktivierung.	101
Abbildung 157 Absolut-werte der Inhibierung der mit Thrombin ausgelösten Thrombozytenaktivierung	102
Abbildung 158 Absolut-werte der Inhibierung der mit α -Toxin ausgelösten Thrombozytenaktivierung	102
Abbildung 159 Absolut-werte der Inhibierung der mit SLO ausgelösten Thrombozytenaktivierung.	103
Abbildung 160 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung	104
Abbildung 161 Mikroskopische Aufnahme von mit PMA (0,5 μ g/ml) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung.....	104
Abbildung 162 Mikroskopische Aufnahme von mit α -Toxin (0,5 μ g/ml) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung.....	105
Abbildung 163 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung.....	105
Abbildung 164 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,5 μ g/ml PMA über vier Stunden....	105
Abbildung 165 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,05 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	106
Abbildung 166 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,5 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	106
Abbildung 167 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 1 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden ..	106
Abbildung 168 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 2,5 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	106
Abbildung 169 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,1 μ g/ml LPS von E. coli über vier Stunden	107
Abbildung 170 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,1 μ g/ml LPS von Salm. ent. über vier Stunden	107
Abbildung 171 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden ...	108
Abbildung 172 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 25 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	108
Abbildung 173 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden ...	108
Abbildung 174 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 50 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	108
Abbildung 175 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden ...	108
Abbildung 176 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	108
Abbildung 177 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden .	109
Abbildung 178 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 100 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	109
Abbildung 179 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden .	109
Abbildung 180 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden	109
Abbildung 181 Vergleich der CD11b positiven Events von PMN inkubiert mit SLO, SLO mit Cysteinzusatz sowie nur Cystein über vier Stunden.....	110
Abbildung 182 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten (Bild oben) und mit 0,5 μ g/ml PMA stimulierten PMN (Bild unten) nach fünf Minuten Inkubationszeit	111
Abbildung 183 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,5 μ g/ml PMN über vier Stunden	110
Abbildung 184 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,05 μ g/ml α -Toxin über vier Stunden	111

Abbildung 185 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	111
Abbildung 186 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 1 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	112
Abbildung 187 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 2,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden	112
Abbildung 188 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS E. coli über vier Stunden	112
Abbildung 189 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS Salm. ent. über vier Stunden	112
Abbildung 190 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden	113
Abbildung 191 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden	113
Abbildung 192 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden	114
Abbildung 193 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden	114
Abbildung 194 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden	114
Abbildung 195 Vergleich der positiven Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit SLO, SLO mit Cysteinzusatz sowie nur Cystein über vier Stunden.....	115
Abbildung 196 Synergistische Inter-aktionen zwischen Thrombozyten und PMN	115
Abbildung 197 Schematischer Überblick über die gewonnenen Ergebnisse zur Aktivierung und Interaktion von durch bakterielle Toxine stimulierte Thrombozyten und PMN.....	133
Abbildung 198 Bcl-3 Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen und Jurkat-Positivkontrolle	XIX
Abbildung 199 Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen und HSA-Kontrollprobe	XIX
Abbildung 200 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen	XX
Abbildung 201 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von α-Toxin stimulierten Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen.....	XXI
Abbildung 202 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von SLO stimulierten Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen sowie unter Zugabe von Abciximab, Iloprost und NPN.....	XXII
Abbildung 203 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von stimulierten Thrombozyten adhärent an Kollagen und Fibrinogen	XXIII
Abbildung 204 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO über 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen.....	XXIV
Abbildung 205 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO in Suspension mit Fibrinogen nach vier Stunden	XXV
Abbildung 206 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO in Suspension mit Fibrinogen nach 24 Stunden	XXVI
Abbildung 207 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen.....	XXVII
Abbildung 208 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen unter Zusatz von Cystein	XXVIII
Abbildung 209 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO bzw. nur Cystein.....	XXIX
Abbildung 210 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten inkubiert mit 750 HU/ml SLO bzw. nur Cystein.....	XXX
Abbildung 211 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten inhibiert mit Puromycin.....	XXXI
Abbildung 212 Bcl-3 und β-Aktin Western Blot von Thrombozyten inhibiert mit Rapamycin	XXXII
Abbildung 213 Bescheinigung zur Prüfung der mathematisch/ statistischen Richtigkeit	XXXIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Diagnosekriterien für die Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock der S-2-Leitlinie (modifiziert nach [20]).....	3
Tabelle 2: Erregerspektrum der vierten Blutkulturstudie von Sepsispatienten der Arbeitsgemeinschaft der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (2006-2007) (modifiziert nach [25]).....	4
Tabelle 3 Prozentuale Häufigkeit der Erreger der infektiösen Endokarditis (verschiedene Statistiken) [47]	9
Tabelle 4 modifizierte Duke Kriterien zur Diagnose einer infektiösen Endokarditis [49]	10
Tabelle 5 Hauptinhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (modifiziert nach [75,77])	18
Tabelle 6 Folgende Geräte wurden verwendet:	38
Tabelle 7 Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:.....	38
Tabelle 8 Folgende Glaswaren wurden verwendet:	39
Tabelle 9 Folgende Reagenzien bzw. Puffer wurden verwendet:.....	40
Tabelle 10 Folgende Antikörper wurden verwendet:	41
Tabelle 11 Folgende bakterielle Toxine wurden verwendet:.....	41
Tabelle 12 Folgende Medikamente wurden verwendet:.....	41
Tabelle 14 Zusammensetzung der ACD-A-Lösung nach der United States Pharmacopeia (USP).....	43
Tabelle 15 Zusammensetzung der PGE1-Lösung	43
Tabelle 16 Zusammensetzung von PBS	44
Tabelle 17 Zusammensetzung von HBSS.....	44
Tabelle 18 Zusammensetzung des Ammoniumchlorid-Lysepuffers	47
Tabelle 19 Zusammensetzung der Trypanblau-Lösung.....	48
Tabelle 20 Zusammensetzung des Lysepuffers zur Proteinextraktion aus Thrombozyten	50
Tabelle 21 Übersicht über die verwendeten Lösungen für die Proteinquantifizierung nach Popov	51
Tabelle 22 Zusammensetzung von zwei 9%igen Polyacrylamid-Trenngelen (140 mm x 140 mm x 1 mm)	53
Tabelle 23 Zusammensetzung des Trenngelpuffers.....	53
Tabelle 24 Zusammensetzung von zwei Sammelgelen	54
Tabelle 25 Zusammensetzung des Sammelgelpuffers	54
Tabelle 26 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers	55
Tabelle 27 Zusammensetzung des zehnfach konzentrierten Tris-Glycin-Puffers	55
Tabelle 28 Zusammensetzung des Transferpuffers	55
Tabelle 29 Zusammensetzung der zehnfach konzentrierten TBS	57
Tabelle 30 Zusammensetzung von TBST	57
Tabelle 31 Zusammensetzung des 5%igen Blockierungspuffers.....	57
Tabelle 32 Zusammensetzung des 1%igen Blockierungspuffers.....	58
Tabelle 33 Zusammensetzung der 2%igen PFA-Lösung	60
Tabelle 34 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	99
Tabelle 35 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	100
Tabelle 36 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	101
Tabelle 37 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS	102
Tabelle 38 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS	103
Tabelle 39 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS.....	103
Tabelle 40 Übersicht über die wichtigsten bei der Thrombozytenaggregation ermittelten IC ₅₀ -Werte	118

Tabellenverzeichnis

Tabelle 41 Zusammenfassung der Ergebnisse der Thrombozytenaggregation mit PMN-Zusatz	120
Tabelle 42 Ergebnisse der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression von stimulierten Thrombozyten	122
Tabelle 44 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression unter Zusatz von Translationsinhibitoren	124
Tabelle 45 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Thrombozyteninhibitoren	125
Tabelle 46 Mittelwerte der PAC-1 positiven Events von Thrombozyten stimuliert mit verschiedenen Konzentrationen an α -Toxin.....	125
Tabelle 47 Mittelwerte der PAC-1 positiven Events von Thrombozyten stimuliert mit verschiedenen Konzentrationen an SLO.....	126
Tabelle 48 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	130
Tabelle 49 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	130
Tabelle 50 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN	131
Tabelle 51 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS	131
Tabelle 52 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS	131
Tabelle 53 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS.....	131

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACD-A	Zitronensäure-Natriumzitat-Glukose Mischung zur Antikoagulation (von engl. acid-citrate-dextrose-A)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Apact 4	Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer 4
APC	antigenpräsentierende Zelle (von engl. antigen presenting cell)
APS	Ammoniumpersulfat
α -Tox	α -Toxin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serum Albumin
Bis	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CHAPS	3-[aps3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propan-sulfonat)
COX	Cyclooxygenase
CR3	Komplement-Rezeptor 3 (von engl. complement receptor 3, siehe auch MAC-1)
DAG	Diazylglyzerol
DIC	disseminierte intravasale Koagulopathie (von engl. disseminated intravascular coagulation)
DGLA	Dihomogammalinolensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure (von engl. deoxyribonucleic acid)
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
DTT	Dithiothreitol
4E-BP1	eIF-4E bindendes Protein 1
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird (von engl. effective concentration ₅₀)
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (von engl. enhanced chemiluminescence)
E. coli	Escherichia coli
eIF-4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ESBL	β -Laktamasen mit erweitertem Spektrum (von engl. extended spectrum β -Lactamase)
F V, F VII...	Faktor V, Faktor VIII...
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (von engl. Forward Scatter)
GAS	Gruppe A Streptokokken
GP	Glykoprotein
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung (von engl. Hank's Balanced Salt Solution)
hr	Stunde, von engl. hour
HSA	humanes Serum Albumin
HU/ml	Hämolytische Units pro Milliliter
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration; Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition auftritt (von engl. inhibitory concentration ₅₀)

Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1/-2	interzelluläres Adhäsionsmolekül-1/-2 (von engl. intercellular adhesion molecule-1/-2)
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (von engl. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1, -4, -10	Interleukin 1, -4, -10
IRF	Interferon-regulierende Faktoren
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-abhängiges Aktivierungsmotiv (von engl. immunoreceptor tyrosinkinase activation motif)
K	Kontrolle
KDO	2-Keto-3-desoxy-octonat
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes-Protein (auch Septin genannt)
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Leukotriene
MAC-1	Makrophagen-Antigen 1 (CD11b/ CD18, auch CR3)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD2	Myeloides Differenzierungsprotein 2
MHC II	Haupthistokompatibilitätskomplex II (von engl. major histocompatibility complex II)
M _R	relative Molekülmasse
MyD88	Myeloider Differenzierungsfaktor 88 (von engl. myeloid differentiation factor 88)
MODS	Multiples Organ Dysfunktions Syndrom
mTOR	Ziel des Rapamycins im Säugetier (von engl. mammalian target of rapamycin)
NETs	neutrophile extrazelluläre Fallen (von engl. neutrophil extracellular traps)
NF- κ B	nuklearer Transkriptionsfaktor kappa-leichte-Kette-Verstärker von aktivierten B-Zellen (von engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NO	Stickstoffmonoxid
NOD 1/ 2	Nukleotid-Oligomerisierungs-Domäne 1/ 2 (von engl. nucleotide binding oligomerization domain 1/ 2)
NPN	Nitroprussid-Natrium
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1
PAMPs	Pathogen-assoziierte Molekulare Muster (von engl. pathogen-associated molecular pattern)
PAR	Protease aktivierter Rezeptor
PECAM	Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül-1 (von engl. platelet endothelial cell adhesion molecule)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (von engl. phosphate-buffered saline)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Blutplättchenwachstumsfaktor (von engl. platelet-derived growth factor)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd

PF-4	Plättchenfaktor-4
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC/-A ₂	Phospholipase C/ -A ₂
PMA	Phorbol-12-Myristinsäure-13-Acetat
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten (von engl. polymorphonuclear neutrophils)
PMP	Plättchenmikropartikel (von engl. platelet microparticles)
PK (C)	Protein Kinase (C)
PPP	plättchenarmes Plasma (von engl. platelet poor plasma)
PRP	plättchenreiches Plasma (von engl. platelet rich plasma)
PRR	Mustererkennungsrezeptor (von engl. pattern recognition receptor)
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (Sialyl-Lewis)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure (von engl. ribonucleic acid)
Salm. ent.	Salmonella enterica
S. aureus	Staphylococcus aureus
SDS	Natriumdodecylsulfat, auch Natriumlaurylsulfat (von engl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (von engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SLO	Streptolysin-O
SLS	Streptolysin-S
SSC	Seitwärtsstreulicht (von engl. Side Scatter)
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (von engl. Tris-Buffered Saline)
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (von engl. Tris-Buffered Saline Tween)
Temed	Tetramethylethylendiamin
TF	Thromboplastin, auch Gewebsthrombokinasen oder Faktor 3 (von engl. tissue factor)
Th _{1/2} -Lymphozyten	Lymphozyten vom Typ _{1/2} -T-Helferzellen
Thr	Thrombin
TK	Tyrosinkinasen
TLR-4	Toll-ähnlicher-Rezeptor 4 (von engl. toll-like receptor 4)
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPFI	Gewebefaktor-Inhibitor (von engl. tissue factor-pathway inhibitor)
TRIF	Toll/IL-1-Rezeptordomäne IFN-β induzierender Adaptor (von engl. TIR (toll-interleukin-1-receptor) domain-containing adaptor protein inducing IFN-β)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch Tromethamin oder Trometamol
t-RNA	Transfer-RNA
TXA ₂	Thromboxan A ₂
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (von engl. vascular cell adhesion molecule-1)
VLA-4	very late antigen-4 (CD49d/CD29)
vWF	von-Willebrand-Faktor

1.Theoretischer Teil

1.1 Einleitung

Bakterielle Infektionen sind dem Menschen seit vielen Jahrtausenden bekannt. So beschrieb schon ca. 400 v. Chr. der griechische Arzt Hippokrates eine Krankheit, die 7-14 Tage nach der Verwundung als ein Fieber beginnt, das verursacht wird durch eine Materie, die fault und die häufig mit dem Tod endet. Er war der Erste, der den Begriff Sepsis (von griechisch sipsi – faul machen) prägte. Im Laufe der Vergangenheit gab es viele weitere bekannte Personen, die sich mit der Sepsis auseinandergesetzt haben. Man denke an Ignaz Semmelweis, der 1847 entdeckte, dass das verstärkte Auftreten von Kindbettfieber durch mangelnde Hygiene des Krankenhauspersonals zustande kam. Die Grundlage für eine rationale Erklärung der Sepsis war jedoch erst mit Begründung der modernen Mikrobiologie um 1860 und der Entdeckung von Bakterien durch Louis Pasteur und Robert Koch gegeben sowie durch Hugo Schottmüller, der 1914 den Grundstein für eine moderne Sepsisdefinition legte [1,2]. Heutzutage versteht man unter einer Sepsis, die umgangssprachlich auch als Blutvergiftung bezeichnet wird, eine komplexe überschießende systemische Entzündungsreaktion des Organismus als Reaktion auf eine mikrobielle Invasion. Eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Sepsis spielt der Verlust physischer und immunologischer Barrieren, welche den Organismus von der unsterilen Außenwelt trennen. Solche Barrieren stellen die menschliche Haut sowie die Schleimhäute des Gastrointestinal- bzw. Urogenitaltraktes, der Atemwege und der Augen dar. Sowohl durch große Traumata als auch infolge kleinster Verletzungen dieser physischen Barrieren können selbst kommensale Mikroorganismen, etwa der Haut- oder Darmflora in die Blutbahn des Organismus gelangen und bei einer schwachen immunologischen Barriere eine Sepsis auslösen [3].

Eine weitere lebensbedrohliche Infektion mit septischem Krankheitsbild ist die infektiöse Endokarditis. Hierbei handelt es sich um eine bakterielle Entzündung der Herzinnenhaut (Endokard), bei der es im Zuge einer Bakteriämie zu einer Besiedlung sogenannter Vegetationen kommt. Diese Vegetationen entstehen durch Fibrin- und Thrombozytenablagerungen an vorgeschädigtem Endothel des Endokards und können bei einem Fortschwemmen bis hin zu septischen Embolien führen [4].

Besonders die Keime *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) gehören mit Abstand zu den häufigsten Auslösern einer Sepsis [5]. Auch die durch *S. aureus* verursachte Endokarditis verläuft besonders fulminant [6]. Ebenso verursacht das Bakterium *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) schwerwiegende Infektionen, wie Osteomyelitis und Sepsis, welche in den letzten Jahrzehnten vermehrt beobachtet wurden [7] und gilt als Auslöser von akuten Endokarditiden [8].

Eine besondere Rolle im Prozess der septischen Krankheitsentstehung spielen bakterielle Toxine. Dem Endotoxin Lipopolysaccharid von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* kommt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Sepsis zu [9]. Auch die porenformenden Zytolysine α -Toxin von *S. aureus* und Streptolysin-O (SLO) von *S. pyogenes* führen zu vielfältigen primären und sekundären zellulären Effekten im Rahmen der septischen Erkrankung [10]. Die überschießende Aktivierung von Thrombozyten als Bestandteil der Hämostase und von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN, von engl. polymorphonuclear neutrophil) als Zellen der angeborenen Immunabwehr sowie deren synergistische Interaktionen miteinander spielen ebenfalls eine Schlüsselrolle im Geschehen der Sepsis [11,12] und Endokarditis [13].

Um tiefere Einblicke in die bis heute noch nicht genau geklärte Pathogenese der Sepsis und Endokarditis zu erlangen [14] wurde der Einfluss dieser drei pathogenen Toxine auf den Aktivierungszustand sowie physiologisch bedeutsame Interaktionen von Thrombozyten und PMN untersucht. Mit dieser Arbeit soll somit ein Teil dazu beigetragen werden, die komplexen Mechanismen der Pathogenese des septischen Krankheitsbildes besser zu verstehen, um in Zukunft bessere Behandlungsmethoden bzw. Medikamente gegen diese schwerwiegenden Krankheiten entwickeln zu können.

1.2 Sepsis

Die Sepsis ist eine seit Jahrhunderten gefürchtete Komplikation von Infektionskrankheiten. Auch heutzutage ist die Erkrankung gegenwärtig. Trotz der Einführung wirksamer Antibiotika und moderner intensivmedizinischer Maßnahmen haben Langzeitstudien ergeben, dass die Letalität der Sepsis in den letzten Jahrzehnten nur leicht gesunken ist [15,16]. Weiterhin steigt die Inzidenz besonders aufgrund der derzeitigen demographischen Entwicklung, der Zunahme von multiresistenten Erregern, durch kompliziertere operative Methoden und postoperative Wundinfekte, durch den häufigeren Einsatz apparativer invasiver Maßnahmen (Beatmungspneumonie, Venenkatheter-, Harnwegskathetersepsis) und eine steigende Anzahl immunsupprimierter sowie multimorbider Patienten weiter an [16,17]. So konnten *Martin et al.* in den USA von 1979 bis zum Jahr 2000 eine Steigerung der Inzidenz von 82,7 auf 240,4 pro 100.000 Einwohner, also eine jährliche Steigerung der Inzidenzrate um 8,7%, beobachten (siehe Abbildung 1) [18].

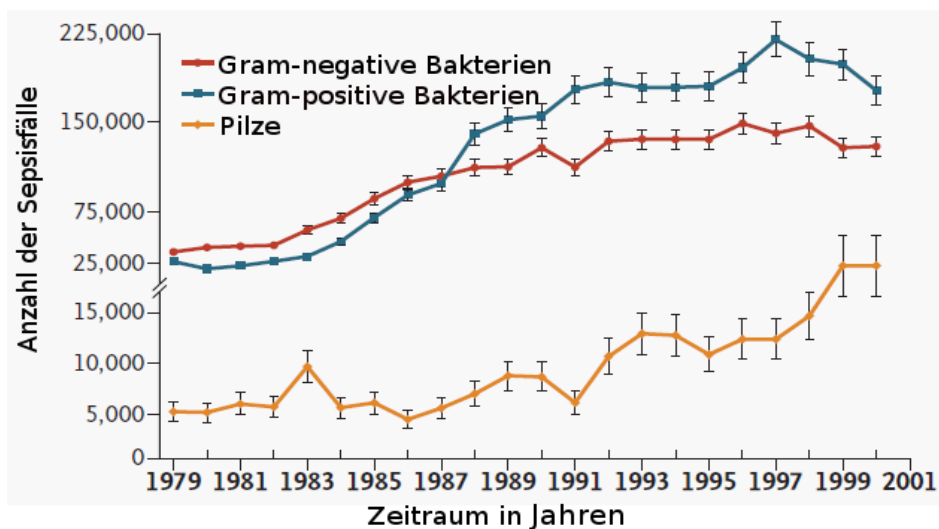


Abbildung 1 Geschlechtsspezifische Inzidenz der Sepsis in den USA von 1979-2000 (modifiziert nach [18])

In Deutschland erkranken jährlich etwa 150.000 Menschen an einer Sepsis. Die Mortalität, die mit dem Alter des Patienten und dem Schweregrad der Sepsis korreliert, beträgt dabei bis zu 50%. Damit steht die Sepsis nach dem koronaren Herzinfarkt und dem Myokardinfarkt an dritthäufigster Stelle der Todesursachen in Deutschland. In der heutigen Zeit begegnet uns die Sepsis besonders in der modernen Intensivmedizin wieder, wo die lebensbedrohliche Erkrankung nicht nur behandelt, sondern häufig erst erworben wird [19]. Die Sepsis stellt eine der Haupttodesursachen bei Intensivpatienten dar und gehört mit Ausgaben von 1,77 Mrd. Euro zu den kostenintensivsten Krankheitsbildern [20]. Mittlerweile liegt bei 70% der verstorbenen Patienten auf deutschen Intensivstationen mit einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock primär eine nosokomiale Infektion vor, sodass die Sepsisprävention immer mehr an Bedeutung gewinnt [21].

Da die Sepsis eine komplexe Erkrankung ist, fällt es schwer diese genau zu definieren. Die klassische Definition der Sepsis wurde 1914 von Hugo Schottmüller formuliert: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ [22]. 2005 formulierten Werdan und Schuster eine nach dem heutigen Kenntnisstand moderne Sepsisdefinition: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“ [23].

Diese Definition stützt sich auf die fünf Grundpfeiler des septischen Krankheitsprozesses: die septische Infektionsquelle als Ausgangspunkt, die Invasion von Mikroorganismen in den Organismus, die Freisetzung ihrer mikrobiellen Bestandteile bzw. Toxine, die Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren, Zellfunktionsstörungen und morphologische Destruktion von Zellmembranen sowie Zellstrukturen, welche zu einer Organschädigung und Multiorganinsuffizienz mit dem klinischen Symptom des Multiorganversagens führen können [24].

Die 1992 auf der Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) formulierten Diagnosekriterien der Sepsis bilden auch heute noch die Grundlage modernerer Definitionen. Im Laufe der Zeit führten jedoch weitere wissenschaftliche Erkenntnisse zu einer Anpassung dieser Kriterien. In Deutschland werden die Schweregrade der Sepsis, basierend auf den Konsensus-Kriterien, durch die S-2-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) definiert (siehe Tabelle 1) [20].

Tabelle 1 Diagnosekriterien für die Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock der S-2-Leitlinie (modifiziert nach [20])

Schweregrade	Kriterien
I Nachweis der Infektion	Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien
II SIRS (mind. 2 Kriterien müssen erfüllt sein)	Fieber: ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$), bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder vesikale Messung Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$ Tachypnoe: (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation (arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($p_a\text{CO}_2$) $\leq 4,3$ kPa bzw. ≤ 33 mmHg) Leukozytose: ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differenzialblutbild
III akute Organdysfunktion (mind. ein Kriterium muss erfüllt sein)	akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Delirium relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 hr oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$, eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein arterielle Hypoxämie: arterieller Sauerstoffpartialdruck ($p_a\text{O}_2$) ≤ 10 kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $p_a\text{O}_2 / F_i\text{O}_2$ (Fraktion des inhalierten Sauerstoffs)-Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation, eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein renale Dysfunktion: Diurese $\leq 0,5$ ml/kg/h für wenigstens 2 hr trotz ausreichender Volumensubstitution und/ oder ein Anstieg des Serumkreatinins > 2 -fach oberhalb des üblichen Referenzbereichs metabolische Azidose: „base excess“ ≤ -5 mmol/l oder Laktatkonzentration $> 1,5$ -fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs

Trotz dieser modernen Kriterien und aufgrund des Fehlens eines einfachen sowie zuverlässigen Tests zur Erkennung dieser Erkrankung, ist die Diagnose Sepsis oft fraglich. So werden, obwohl die konsequente und frühzeitige Therapie entscheidend ist, gerade die frühen Stadien einer Sepsis oft zu spät erkannt.

Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock stellen laut den Kriterien der S-2-Leitlinie eher ein Krankheitskontinuum dar und werden durch die Kombination von Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten sowie Organfunktionen beschrieben. Die Diagnose Sepsis wird hiernach

durch die Kriterien I und II, also durch eine klinisch nachgewiesene oder vermutete Infektion und durch mindestens zwei Kriterien des systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) gestellt. Das SIRS ist durch eine systemische Entzündungsreaktion des Organismus aufgrund der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren gekennzeichnet. Bei dem Vorliegen der Kriterien I, II und III, wenn also mindestens eine infektionsbezogene Organdysfunktion zur Sepsis hinzukommt, spricht man von einer schweren Sepsis. Der septische Schock liegt bei den Kriterien I und II vor, sowie wenn für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg vorliegt oder ein Vasopressoreinsatz notwendig wird, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären. Somit wird trotz intensivmedizinischer Maßnahmen ein Kreislaufversagen im Zuge der schweren Sepsis beobachtet [20].

Zu den häufigsten Erregern einer Sepsis gehören grampositive Staphylokokken und Streptokokken sowie gramnegative Darmbakterien. Von diesen kommt mit einem Anteil von 18,2 % *S. aureus* bzw. mit 25,1 % *E. coli* die bedeutendste Rolle zu. Dies konnte auch die Arbeitsgemeinschaft der Paul-Ehrlich-Gesellschaft in ihrer vierten Blutkulturstudie bestätigen, bei der das Erregerspektrum in Blutkulturen von Sepsispatienten bestimmt wurde (siehe Tabelle 2). Anaerobier und Sprosspilze wurden zu 1,6 % bzw. 5,6% in den Blutkulturen identifiziert [25].

Tabelle 2: Erregerspektrum der vierten Blutkulturstudie von Sepsispatienten der Arbeitsgemeinschaft der Paul-Ehrlich-Gesellschaft (2006-2007) (modifiziert nach [25])

Grampositive Erreger	Häufigkeit (%)	Gramnegative Erreger	Häufigkeit (%)
Staphylococcus aureus	18,2	Escherichia coli	25,1
koagulase-negative Staphylokokken	10	Klebsiella spp.	6,3
Enterococcus spp.	9	Enterobacter spp.	3,6
nicht-hämolysierende Streptokokken	3,7	Pseudomonas aeruginosa	3,6
hämolysierende Streptokokken	2,1	Acinetobacter spp.	1,6
Streptococcus pneumoniae	1,7	Proteus mirabilis	1,5
		Serratia marcescens	0,9
		Stenothrophomonas maltophilia	0,7
		Salmonella spp.	0,5

1.2.1 Pathogenese der Sepsis

Die Pathogenese einer Sepsis ist sehr komplex. Auch sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Krankheitsentstehung bis heute nicht genau geklärt. Einen schematischen Überblick über die Abläufe im Sepsisgeschehen bis hin zum Multiplen Organ Dysfunktions Syndrom (MODS) gibt Abbildung 2. Charakteristisch für die Sepsis ist zunächst eine dysregulierte, überschießende Immunantwort des Organismus auf Bakterien, insbesondere auf deren Endo- bzw. Exotoxine und/ oder auf Pilze. Innerhalb der ersten Stunden einer Sepsis wird das humorale und zelluläre angeborene Immunsystem von den eingedrungenen Erregern und ihren Produkten aktiviert. Wichtig für die Erkennung der Pathogene durch das zelluläre angeborene Immunsystem sind die sogenannten pathogen assoziierten Molekularen Muster (PAMPs, von engl. pathogen-associated molecular patterns) (siehe Abbildung 3). PAMPs sind weit verbreitete, hochkonservierte Polysaccharide oder Polynukleotide, wie Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien, unmethylierte DNA, das Flagellin der bakteriellen Geißel oder die Peptidoglykane grampositiver Bakterien. Diese PAMPs werden über Mustererkennungsrezeptoren (PRR, von engl. pattern recognition receptor) von den Zellen des angeborenen Immunsystems, wie PMN und Makrophagen, erkannt. Zu den PRR gehören die sogenannten Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, von engl. toll-like receptor). LPS beispielsweise bindet und aktiviert die TLR-4 Rezeptoren

von Monozyten und PMN. Über Proteinkinasen (PK) wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zur Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ b führt. Dieser stimuliert die Expression von inflammatorischen Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1). Auch durch Phagozytose intrazellulär befindliche pathogene Strukturen können über TLRs oder die Nucleotid-Oligomerisierungs-Domäne (NOD 1/ 2, von engl. nucleotide-binding oligomerization domain 1/ 2) erkannt werden. Hier führt die Rezeptoraktivierung über NF- κ b ebenfalls zur Expression proinflammatorischer Mediatoren. Durch weitere auto- oder parakrin stimulierte Zellen wird dieser Prozess durch die Freisetzung sekundärer Mediatoren noch verstärkt [28,29].

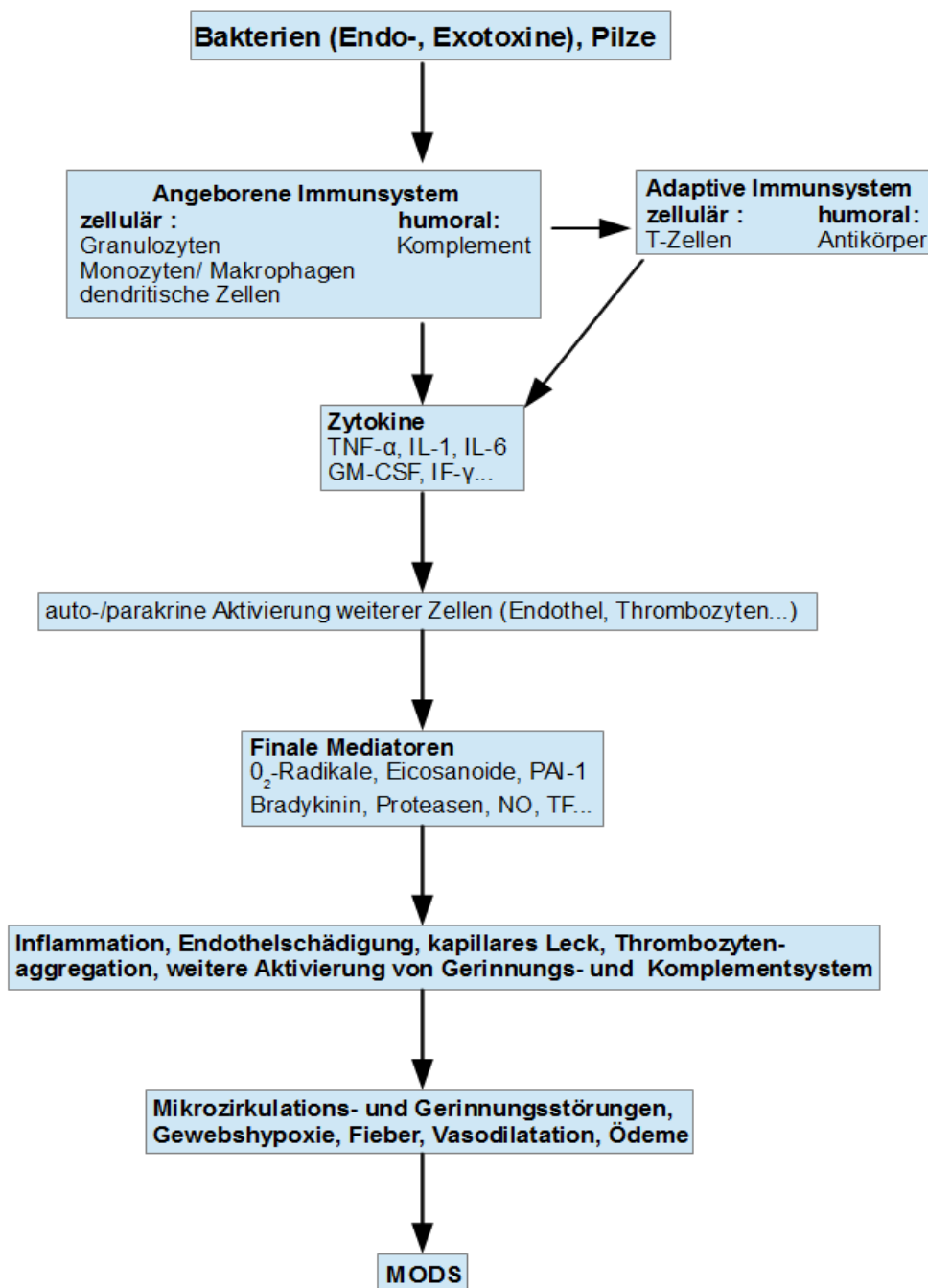


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Pathogenese der Sepsis (modifiziert nach [26,27])

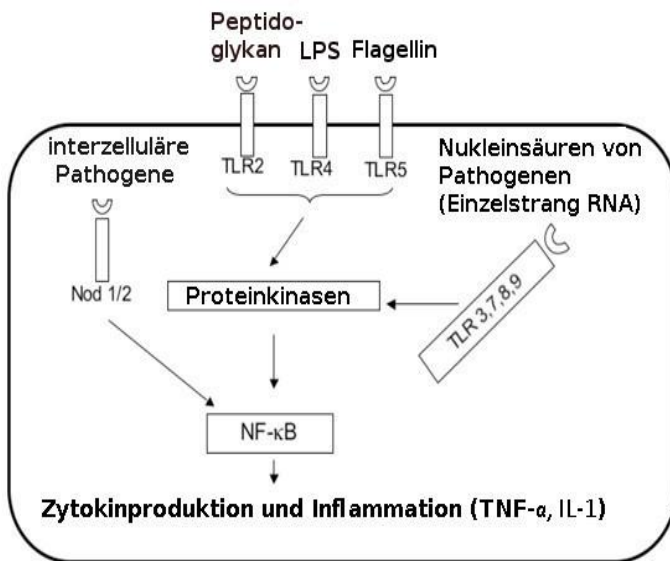


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch PAMPs (modifiziert nach [28])
 Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen PAMPs, wie LPS oder Flagellin über ihre PRR, etwa TLRs oder NOD1 bzw. 2. Über Signalkaskaden aktivieren diese Rezeptoren NF-κB, welches zur Expression inflammatorischer Mediatoren führt.

Auf humoraler Ebene kommt es entweder über die direkte Erkennung von PAMPs innerhalb der angeborenen Immunantwort oder durch die Aktivierung des zellulären adaptiven Immunsystems zu einer Komplementaktivierung. Die aktivierte Komplementkaskade endet in der Opsonisierung, also Markierung von Pathogenen mit Komplementfaktoren, die darüber von phagozytierenden Zellen erkannt und vernichtet werden. Des Weiteren kommt es durch die Formation des C5b-9-Komplexes, einem Membran attackierenden Komplex, zur porenvermittelten Lyse der Pathogene. Die im Rahmen der Komplementaktivierung freigesetzten Anaphylatoxine C3a und C5a wirken proinflammatorisch, indem sie eine Degranulation von Mastzellen bewirken, Leukozyten anlocken (Chemotaxis) und die vaskuläre Permeabilität steigern. In der ersten Phase einer Sepsis ist die Komplementaktivierung als positiv zu bewerten, da diese den Organismus vor der unkontrollierten Ausbreitung der Mikroben schützt. Im späteren Sepsisgeschehen überwiegen jedoch die Nachteile, da in Folge einer hohen Zytokinausschüttung die Hyperinflammation begünstigt wird [30].

Zeitlich verzögert wird auch das adaptive Immunsystem im Laufe einer Sepsis aktiviert (siehe Abbildung 4). Dabei werden kleine Peptid-Sequenzen phagozytierter Erreger von Antigen-präsentierenden Zellen (APC, von engl. antigen presenting cell) über den oberflächenständigen Haupthistokompatibilitätskomplex MHC-II (von engl. major histocompatibility complex 2) präsentiert.

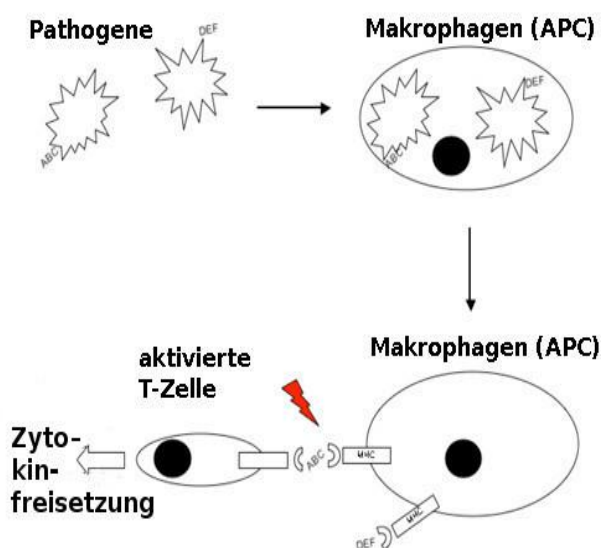


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Aktivierung des adaptiven Immunsystems über APC (modifiziert nach [28])
 APC phagozytieren Pathogene, wie Bakterien oder Viren und präsentieren Bestandteile dieser über MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche. T-Zellen erkennen diese Peptide, werden aktiviert, setzen proinflammatorische Zytokine frei und verstärken die Immunantwort.

Diese Sequenzen werden über T-Zell-Rezeptoren von CD4-positiven Typ₁-T-Helferzellen (Th₁-Lymphozyten), welche zuvor im Thymus darauf geprimt wurden, wiedererkannt. Es kommt zur Aktivierung der Th₁-Lymphozyten, welche proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-2 und IFN- γ freisetzen. Bei einer Sepsis sind zunächst diese proinflammatorischen Mediatoren (Th₁-Antwort) erhöht, später überwiegt die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine (Th₂-Antwort). Des Weiteren werden B-Lymphozyten durch Antigene aktiviert und wandeln sich zu Plasmazellen um. Diese produzieren gegen das Antigen gerichtete Antikörper und sind somit Träger der humoralen adaptiven Immunantwort. T-Gedächtniszellen lösen bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen wieder eine gezielte Immunreaktion aus [31,32].

Schließlich reagiert der Körper im späteren Verlauf einer Sepsis auch mit antiinflammatorischen Mechanismen. Dieser, als kompensatorisches antiinflammatorisches Syndrom (CARS, von engl. compensatory antiinflammatory response syndrome) bezeichnete hypoinflammatorische Zustand, kommt durch die Freisetzung von Substanzen wie IL-4, IL-10, löslichen TNF- α -Rezeptoren oder IL-1-Rezeptor-Antagonisten und durch die Apoptose von Immunzellen zustande. Somit ist die Sepsis als bipolare Störung des Immunsystems zu betrachten. Einerseits kommt es zu einer unkontrollierten Hyperinflammation mit systemischer Entzündungsreaktion und Organversagen, andererseits zur Immunparalyse, die der systemischen Bakteriämie, Endo- bzw. Exotoxinämie und damit dem Voranschreiten einer Infektion Vorschub leistet [33,34].

Die insbesondere durch Bakterien und deren Toxine aktivierten immunkompetenten Zellen wie Monozyten bzw. Makrophagen und PMN schütten proinflammatorische Mediatoren aus, die ebenfalls multiple Wirkungen auf das Gerinnungs- und Kallikrein/Kinin-System sowie direkt auf die Endorgane haben können. So vermitteln proinflammatorische Mediatoren die Freisetzung von Thromboplastin (auch Gewebsthrombokinase oder Faktor 3 bzw. TF, von engl. tissue factor) aus Monozyten, Thrombozyten, Leukozyten und endothelialen Zellen. TF aktiviert die proteolytische Gerinnungskaskade, die in der Konversion von Fibrinogen zu Fibrin endet. Über Fibrin vernetzen sich Thrombozyten und bilden Mikrogerinnsel, welche die Organperfusion stören. Auch setzen Mikrothromben Mediatoren frei, die eine Obstruktion der Gefäße verursachen und somit zu einer lokalen Ischämie und Gewebshypoxie führen können. Gleichzeitig werden physiologische Antikoagulantien, wie Antithrombin, das Protein C/Protein S-System oder der Gewebefaktor-Inhibitor (TPFI, von engl. tissue factor-pathway inhibitor) in ihrer Wirkung gehemmt. Auch der im septischen Verlauf in hoher Konzentration gebildete Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1 (PAI-1) unterstützt diesen Prozess. PAI-1 verhindert die Bildung von Plasmin aus dessen Vorstufe Plasminogen. In Folge der durch die aktivierte Gerinnungskaskade gesteigerten Fibrinproduktion und den verringerten Abbau durch PAI-1 lagern sich ebenfalls vermehrt Mikrothromben in kleinen Blutgefäßen ab, welche die Organperfusion unterbinden. Diese übermäßig stark ablaufende Blutgerinnung im Gefäßsystem führt in 30-50% der Fälle zu einer sogenannten disseminierten intravasalen Koagulopathie (auch Verbrauchskoagulopathie, DIC, von engl. disseminated intravascular coagulation). Hierbei führt der erhöhte Verbrauch von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten zu einer pathogen erhöhten Blutungsneigung des Patienten [35].

Auch das Endothel nimmt eine besondere Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis ein. Inflammatorische Mediatoren stimulieren die endotheliale NO-Synthase zur Synthese von Stickstoffmonoxid (NO). Durch die vasodilatierenden Eigenschaften von NO kommt es zu einer arteriellen Hypotension, welche kennzeichnend für den septischen Schock ist. Ebenfalls stimuliert durch proinflammatorische Mediatoren wie TNF- α , IL-1, Komplement und Leukotriene (LT) werden endotheliale Zellen und Leukozyten aktiviert. Endotheliale Zellen exprimieren daraufhin Adhäsionsmoleküle, wie P-Selektin, das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 und 2 (ICAM-1/ -2, von engl. intercellular adhesion molecule -1/ -2), das Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül-1 (PECAM, von engl. platelet endothelial cell adhesion molecule) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1, von engl. vascular cell adhesion molecule-1). Leukozyten, Monozyten und Thrombozyten können daraufhin am Endothel haften, werden aktiviert und setzen weitere inflammatorische Mediatoren frei. Bei einer Aktivierung von PMN erfolgt deren Transmigration in das darunterliegende Gewebe sowie die Freisetzung zytotoxischer Sauerstoffradikale (oxidative burst) (siehe auch Kap. 1.5.2). Die von den Leukozyten freigesetzten oxidativen Substanzen wirken zwar antimikrobiell, schädigen allerdings auch das Endothel sowie das umliegende Gewebe. Die Leukozytenmigration in das Gewebe wird durch eine Retraktion des

Endothels begünstigt. Die dabei zwischen den Endothelzellen entstehenden Lücken sowie die von den Leukozyten freigesetzten oxidativen Substanzen begünstigen sowohl die vaskuläre Permeabilität als auch die Bildung von lokalen Ödemen [36,37].

Schließlich mündet die Generalisierung der Entzündungsreaktion oft in einem Multiplen Organ Dysfunktions Syndrom. Das Vorliegen eines MODS geht bei einem Ausfall von vier bis fünf Organen mit einer Mortalität von über 90% einher und ist die schwerwiegendste Komplikation einer Sepsis. Die Pathogenese des Multiorganversagens ist multifaktoriell bedingt und noch nicht genau geklärt. Die Ausbildung eines Kapillarlecks durch Endothelschädigung, welches durch den Einstrom von intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium zu einer intravaskulären Hypovolämie sowie einer Störung der Organperfusion führt und die daraus resultierende Hypoxie sowie Nekrose stellen die wichtigsten Pathomechanismen dar [38].

1.3. Infektiöse Endokarditis

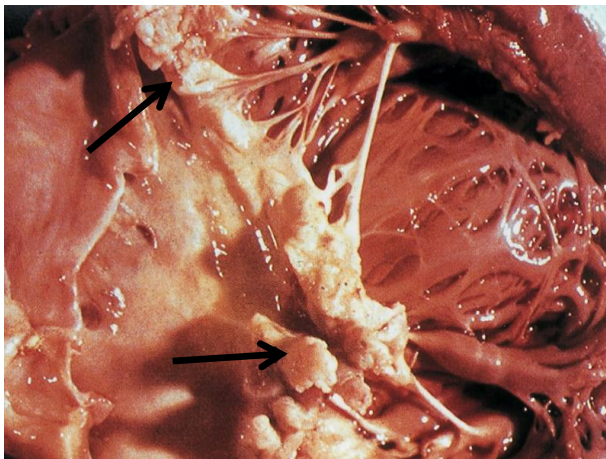


Abbildung 5 Vegetationen (Pfeile) im Rahmen einer Endokarditis durch *Streptococcus viridans* mit Befall der Mitralklappe [39]

Bei der infektiösen Endokarditis handelt es sich um eine bakterielle Infektion der innersten Schicht der Herzwand (Endokard), zu welcher ebenfalls die vier Herzklappen gehören [40]. Im Zuge einer Bakteriämie findet bevorzugt eine Kolonisation der zumeist vorgeschädigten Mitralk- bzw. Aortenklappe des linken Herzens statt (siehe Abbildung 5) [41].

Man unterscheidet nach dem Verlauf und Erregerspektrum die akute und subakute Form. Die subakute Endokarditis (Endokarditis lenta) verläuft schleichend über mehrere Wochen. Hier liegt zumeist ein angeborener oder erworbener Herzfehler vor, der zu einem Endotheldefekt führt, an dem sich hauptsächlich Streptokokken, Enterokokken oder Pilze ansiedeln. Bei der akuten (septischen) Endokarditis, die zumeist durch *S. aureus* oder Enterobakterien verursacht wird, können die Erreger sowohl native als auch vorgeschädigte Herzklappen infizieren. Der Verlauf ist fulminant und es können zum Teil innerhalb von wenigen Stunden die befallenen Herzklappen zerstört werden [42]. Aus einer akuten Endokarditis kann sich schnell eine Sepsis mit Multiorganversagen entwickeln. Die subakute Endokarditis geht oft mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz einher. Dennoch treten, wenngleich auch seltener, bei der subakuten Verlaufsform ebenso septische Embolien verschiedenster Organe mit entsprechenden Folgen, wie etwa einer Niereninsuffizienz oder einem Apoplex auf [43].

Unter Berücksichtigung der Lokalisation erfolgt auch eine Unterteilung in Endokarditis valvulari, welche am Schließungsrand einer Klappe vorherrscht, Endokarditis parietalis, die im Bereich der Vorhof- und Kammerwände lokalisiert ist sowie Endokarditis chordalis, die vorwiegend im Bereich der Sehnenfäden anzutreffen ist [44].

Die Inzidenz der mikrobiell verursachten Endokarditis liegt bei 3/100.000. Unbehandelt verläuft diese Erkrankung tödlich. Die Letalitätsrate hängt von vielen Faktoren, etwa dem Erreger, dem Grundzustand der erkrankten Person oder dem Zeitpunkt der Diagnosestellung der Infektion ab und beträgt

in Deutschland bis zu 18 %. In den letzten Jahrzehnten konnte, ähnlich wie bei der Sepsis, trotz des Einsatzes neuartiger Antibiotika eine steigende Inzidenz, insbesondere bei der akut verlaufenden Endokarditis beobachtet werden [45]. Gründe hierfür sind die verlängerte Lebenserwartung der Patienten, der vermehrte Einsatz invasiv-diagnostischer und -therapeutischer Maßnahmen, der Zuwachs prädisponierender kardialer Vorerkrankungen und das Hinzutreten des neuartigen Patientenkollektivs der Drogenabhängigen. Des Weiteren führte die Einführung der Antibiotika zu einem Anstieg des Erkrankungsalters. So stieg das Erkrankungsalter von durchschnittlich 30 Jahren bezogen auf das Jahr 1927 innerhalb der folgenden 50 Jahre auf das 50. Lebensjahr an. Der Anteil der Patienten mit rheumatischen Endokarditiden (siehe Kap. 1.7) ist in den letzten Jahren gesunken, während die akuten Endokarditiden ohne Vorschädigung des Herzen sowie die Prothesenendokarditiden anstiegen [6]. Bei etwa dreiviertel aller Patienten entwickelt sich eine Endokarditis aufgrund von angeborenen oder erworbenen Herzfehlern. Zu den kardialen erworbenen Risikofaktoren gehören rheumatische Herzklappenerkrankungen, arteriosklerotische Ablagerungen und Verkalkungen der Herzklappen, die Implantation von Fremdkörpern etwa künstlichen Herzklappen sowie die Anlage palliativer aortopulmonaler Shunts. Häufige angeborene Herzfehler sind das Mitralklappenprolapsyndrom oder ein offener Ductus arteriosus. Extrakardiale Dispositionsfaktoren betreffen besonders Patienten mit einem geschwächtem Immunsystem, die eine massiven Bakteriämie erleiden [6,46].

Häufig tritt eine Endokarditis im Zuge einer Herzoperation auf. Hierbei wird eine Frühform unterschieden, bei der die Erreger während der Implantation von intravasalen Fremdkörpern etwa künstlichen Herzklappen oder kurz nach der Operation durch kontaminierte Venenkatheter oder Drainageschläuche in die Blutbahn gelangen. Bei der Spätform kommt es zur Besiedlung der Blutbahn und zu einem Befall der vorgeschädigten Herzklappen durch eine fehlende antibiotische Prophylaxe nach Eingriffen wie einer Tonsillektomie oder einer zahnärztlichen Behandlung. Während es üblicherweise zu einer Entzündung der linken Herzklappe kommt, herrscht bei Drogenabhängigen, die das infektiöse Material direkt in die Vene injizieren die sogenannte Rechtsherzendokarditis vor [42].

Die Endokarditis wird am häufigsten durch Staphylokokken und Streptokokken ausgelöst (siehe Tabelle 3). Die häufigsten Erreger an natürlichen Herzklappen sind *S. aureus* und Viridans Streptokokken. Bei Endokarditiden an künstlichen Herzklappen tritt die Frühform sechs bis acht Wochen nach der Herzklappenoperation auf. Die Spätform herrscht acht Wochen nach der OP vor und gleicht dem Erregerspektrum von Endokarditiden an natürlichen Herzklappen. Seltener treten Pilzendokarditiden auf [47]. Durch die Einführung von Antibiotika hat sich das Erregerspektrum von Viridans-Streptokokken zu den virulenteren und antibiotikaresistenten Keimen wie *S. aureus*, Enterokokken und Gram-negativen Erregern verschoben [6].

Tabelle 3 Prozentuale Häufigkeit der Erreger der infektiösen Endokarditis (verschiedene Statistiken) [47]

Erreger	Natürliche Klappen	Künstliche Klappen (< 8 Wochen nach OP)	Künstliche Klappen (> 8 Wochen nach OP)
Streptokokken	60-80	11	35
- Viridans Streptokokken	30-40	3	20
- Enterokokken	5-20	5	10
- andere Streptokokken	15-25	3	5
Staphylokokken	20-35	50	40
- <i>S. aureus</i>	10-30	20	15
- <i>S. epidermis</i> und andere <i>S.</i>	1-5	30	25
gramnegative Stäbchen	< 1-2	20	10
Pilze	2-4	13	5
polymikrobiell	1-2	/	/
andere Erreger	2-5	10	10
kulturell negativ	< 5-25	/	/

Anhand der sogenannten Duke-Kriterien wird die Endokarditis durch den Nachweis positiver Blutkulturen, mittels Elektrokardiogramm, durch klinische Befunde als auch Laborbefunde diagnostiziert (siehe Tabelle 4). Die Diagnose gilt als gesichert, wenn entweder zwei Hauptkriterien oder ein Haupt- und drei Nebenkriterien oder fünf Nebenkriterien erfüllt sind [48].

Tabelle 4 modifizierte Duke Kriterien zur Diagnose einer infektiösen Endokarditis [49]

Hauptkriterien	Nebenkriterien
positive persistierende Blutkulturen (mindestens zwei aus verschiedenen Kulturen)	eine prädisponierende Kardiopathie oder i.v. Drogenabusus
mit typische Erregern (Streptococcus viridans, Streptococcus bovis, Staphylococcus aureus, Enterokokken, Bakterien der HACEK-Gruppe)	Fieber > 38°C
mit nicht typischen Erregern aus wiederholt positiven Blutkulturen (> 12 hr oder > 3/3)	Gefäßbeteiligung: septische Embolie, mykotische Aneurysma, Blutungen, Petechien oder Janeway-lesions
eine positive Blutkultur mit Coxiella burnetti oder erhöhter IgG-Antikörper-Titer > 1:800	immunologische Reaktionen: Glomerulonephritis, Arthralgien oder Osler-Knötchen
eine neu aufgetretene Klappeninsuffizienz	der serologische Nachweis eines zur Endokarditis kompatiblen Erregers ohne Erfüllung der Hauptkriterien
ein positiver Echokardiographiebefund (Vegetationen, Abszess, Insuffizienz)	

1.3.1 Pathogenese der infektiösen Endokarditis

Abbildung 6 gibt einen Überblick über die pathophysiologischen Abläufe einer Endokarditis, in dem PMN und Thrombozyten eine wichtige Rolle spielen. Eine lokale Endothelläsion bildet zumeist die Grundlagen der Entstehung einer infektiösen Endokarditis. Bei angeborenen oder erworbenen Herzfehlern herrschen pathologische Strömungsverhältnisse im Übergangsbereich zwischen hohem und niedrigem Druck vor, die zu Endothelverletzungen führen. Diese turbulenten Strömungsverhältnisse entstehen durch das Auftreffen von Blut mit hoher Geschwindigkeit auf das Endothel. Infolge dessen lagern sich Fibrin-Thrombozyten-Komplexe an diese sogenannten Jetläsionen an, sodass eine abakterielle thrombotische Endokarditis entsteht. Im Zuge einer Bakteriämie kommt es besonders an endothelgeschädigten Herzklappen bzw. an den dortigen Vegetationen zu einer Bakterienkolonisation. Die Bakterien adhären dabei an Matrixproteinen wie Kollagen oder Laminin. Die Beteiligung des Immunsystems findet unter anderem durch agglutinierende Antikörper, die ebenfalls zur Verklumpung und Fixierung der Bakterien am verletzten Endothel führen sowie durch eine Leukozyteninfiltration in das entzündete Gewebe statt. Durch die Vermehrung der Bakterien und weitere Thrombozyten- sowie Fibrinablagerungen kommt es zur Ausbildung von Vegetationen, welche sehr voluminös werden können und auf wichtige Strukturen, etwa Sehnenfäden oder Papillarmuskeln übergreifen können, sodass es z. B. zu einer Schließunfähigkeit der Herzklappen, der Perforation eines Klappen-segels oder der Ruptur von Chordafäden kommen kann. Die Einwirkung der Leukozyten als auch der Bakterien und insbesondere ihrer Toxine führt schließlich zur Klappendestruktion. Zudem kann sich die Infektion weiter in das Herzgewebe ausbreiten und dort zu Abszessen, Defekten im Reizweiterleitungssystem mit Arrhythmien, Muskelzellnekrosen oder einer Perikarditis führen. Vegetationen können außerdem leicht weggeschwemmt werden und Embolien etwa in der Niere-, Lunge oder dem Gehirn verursachen. Nach einer akut entzündlichen Endokarditis folgt häufig eine Vernarbung und Verkalkung der befallenen Herzklappe [50–52].

Der klinische Verlauf einer Endokarditis wird in der Regel durch die Virulenz des Erregers bestimmt. So kann die Erkrankung uncharakteristisch mit allgemeinen Krankheitsgefühlen wie Müdigkeit, subfebrilen Temperaturen, Gewichtsverlust, Schwitzen sowie Gelenk- und Kopfschmerzen einhergehen oder eher stürmisch mit Dyspnoe, hohem Fieber und Schüttelfrost verlaufen. Im weiteren Krankheitsverlauf treten Anämien, Splenomegalie sowie Hautveränderungen wie Petechien an den Konjunktiven und am Gaumen, Osler Knötchen, welches erbsengroße, bläuliche Knötchen durch vaskulitische Reaktion darstellen oder Janeway-Läsionen, also hämorrhagische Effloreszenzen durch bakterielle Mikroembolien, Einblutungen des Nagelbetts sowie eine fahlgraue Hautfarbe auf. Die kardialen Symptome ergeben sich durch den Grad der Zerstörung des Klappenapparates mit konsekutiver Klappeninsuffizienz und nachfolgender Herzinsuffizienzsymptomatik. Durch eine hohe Virulenz des Erregers und Antibiotikaresistenz kann es zu einer weiteren lokalen Verbreitung des Erregers bis hin zur Sepsis kommen. Durch zerebrale Embolien kann es zu neurologischen Ausfallerscheinungen kommen. Bei einer Nierenbeteiligung treten Hämaturie und Proteinurie auf [53].

Morphologisch unterscheidet man vier verschiedene Endokarditisformen. Bei der abakteriellen verrukösen Endokarditis kommt es im Zuge von Kachexie, Schock oder malignen Tumoren zu zarten, rötlichen Auflagerungen von Fibrin und Thrombozyten auf den Herzklappen. Die ulzeröse Endokarditis kommt zumeist bei einer akuten bakteriellen Endokarditis vor und ist durch eine ausgedehnte Zerstörung im Bereich der Aortenklappen gekennzeichnet. Große Vegetationen auf der Klappenoberfläche trifft man bei der Endokarditis polyposa an. Die Vegetationen bestehen aus Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Fibrin und Bakterienhaufen. Weist die Klappe eine ausgedehnte Zerstörung auf, deutet dies auf eine subakute Endokarditis hin. Die Endokarditis fibroplastica stellt den narbigen Endzustand einer Herzklappenentzündung dar. Diese geht mit einer Klappeninsuffizienz und Stenose einher [54,55].

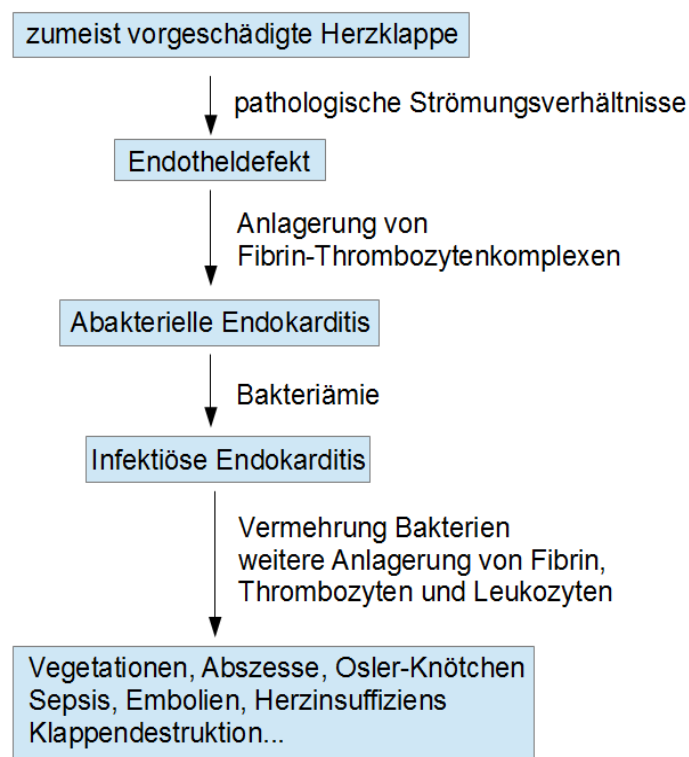


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Pathogenese der Endokarditis (modifiziert nach [43,56])

1.4 Thrombozyten

1.4.1 Thrombozytenmorphologie

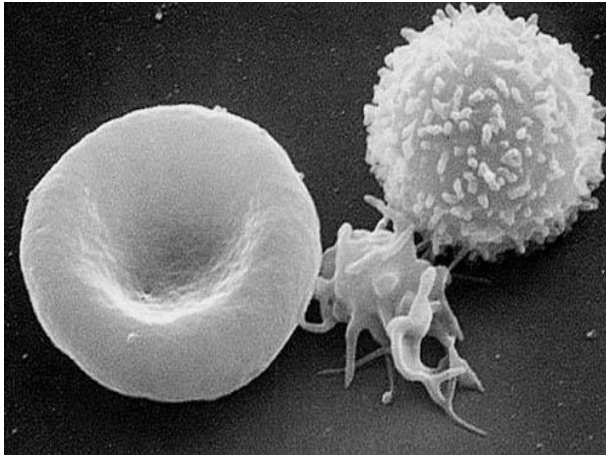


Abbildung 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Blutzellen [57]

Links zu sehen ist ein Erythrozyt. In der Mitte befindet sich ein aktivierter Thrombozyt und rechts ein T-Lymphozyt.

Thrombozyten oder auch Blutplättchen genannt, gehören mit einem Durchmesser von 2-3 μm zu den kleinsten Zellen des Blutes (siehe Abbildung 7). Sie entstehen, stimuliert durch den Wachstumsfaktor Thrombopoetin, im Knochenmark durch Zytoplasmaabschnürungen aus polyploiden Megakaryozyten. Nach durchschnittlich fünf bis neun Tagen werden sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber durch Gewebemakrophagen abgebaut. Ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert [58]. Morphologisch gesehen bestehen Blutplättchen aus vier Zonen, die spezielle Funktionen erfüllen: die periphere und die strukturelle Zone, sowie die Zone der Organellen und das Membransystem. Die periphere Zone besteht aus der Plasmamembran, welche auf der extrazellulären Seite von einer dünnen Schicht aus verschiedenen Proteinen, Glykoproteinen und Mucopolysacchariden, der sogenannten Glykokalix, umhüllt ist. Dort befinden sich viele Rezeptoren die für die Aktivierung bzw. Inhibierung der Blutplättchen wichtig sind. Unterhalb der Plasmamembran befindet sich die strukturelle Zone. Diese besteht aus submembranös gelegenen Mikrotubuli und anderen Strukturproteinen und ist maßgeblich an der Degranulation und am sogenannten Formwandel (engl. shape change), der auch eine wichtige Rolle während der Gerinnselretraktion spielt, beteiligt. Im Zellplasma findet sich die Zone der Organellen mit typischen Zellbestandteilen, wie Mitochondrien, Glykogen, Lysosomen und den Speichergranula [59]. Die drei verschiedenen Speichergranula enthalten für die Plättchenfunktion besonders wichtige Substanzen (siehe Tabelle 5). Im Zuge der Plättchenaktivierung kommt es zur Exozytose der Granulainhaltsstoffe, wodurch Thrombozyten sowie andere in der Umgebung befindliche Zellen para- bzw. autokrin aktiviert werden. Auch gelangen hierdurch weitere adhäsive Rezeptoren an die thrombozytäre Oberfläche. Die Substanzen der Granula werden in den Vorläuferzellen der Plättchen, den Megakaryozyten, synthetisiert oder durch Endozytose aus dem Blut aufgenommen. Die aufgrund ihrer hohen optischen Dichte bezeichneten dichten Körperchen bzw. Granula (engl. dense bodies) enthalten hauptsächlich die aggregationsfördernden Substanzen ADP (Adenosindiphosphat), Serotonin und Calcium. Die α -Granula sind mit 40-80 Granula pro Plättchen die häufigsten und größten Granula in Thrombozyten und enthalten Proteine, welche verschiedenste biologische Funktionen, wie die Adhäsion, Aggregation, Proliferation, Inflammation, Chemotaxis und Koagulation beeinflussen. In den Lysosomen befinden sich vorwiegend Verdauungsenzyme [60].

Die vierte Zone bildet das Membransystem, welches ebenfalls am Formwandel der Thrombozyten beteiligt ist. Auf der Oberfläche von unstimulierten Thrombozyten befinden sich die Einstülpungen der Plasmamembran des offenen kanalikulären Systems. Ruhende Thrombozyten weisen eine diskoidale Gestalt auf (siehe Abbildung 8). Werden Blutplättchen jedoch aktiviert, so kommt es über verschiedene Signalwege zur intrazellulären Calciumfreisetzung. Überschreiten die Calcium-Ionen

schließlich eine bestimmte zytoplasmatische Schwellenkonzentration, so führt dies innerhalb von Sekunden zum shape change und zur Degranulation der Plättchen. Dabei werden die Plasmaeinstülpungen des offenen kanalikulären Systems unter Ausbildung von Pseudopodien nach außen gestülpt und die Zellorganellen zentralisiert (siehe

Abbildung 9). Über das offene kanalikuläre System werden außerdem sowohl extrazelluläre Substanzen in das Zellinnere aufgenommen als auch Granulainhaltsstoffe in den Extrazellularraum abgegeben. Weiterhin kommt es zu einer Vergrößerung der thrombozytären Plasmamembran durch das Verschmelzen der Granulamembranen mit dem offenen kanalikulären System während der Degranulation. Der Formwandel ergibt sich durch Veränderungen in der strukturellen Zone. Durch die Bindung von F-Aktin an Myosin entsteht Aktomyosin, welches ähnlich wie in glatten Muskelzellen einen kontraktilem Apparat formt und letztendlich treibende Kraft des shape change ist. In den Pseudopodien liegen die Mikrotubuli daraufhin parallel nebeneinander und reichen bis in deren Spitzen hinein. Die Ausbildung der Pseudopodien führt weiterhin zu einer Vergrößerung der thrombozytären Oberfläche und ermöglicht so einen besseren Wundverschluss. Daneben existiert in den Plättchen noch das ubiquitär verteilte sogenannte geschlossene dichte Tubularsystem. Das aus dem endoplasmatischen Retikulum der Megakaryozyten hervorgegangene System ist der Hauptspeicherort für freie Calcium-Ionen, die während der Thrombozytenaktivierung in den Intrazellularraum abgegeben werden [61,62].

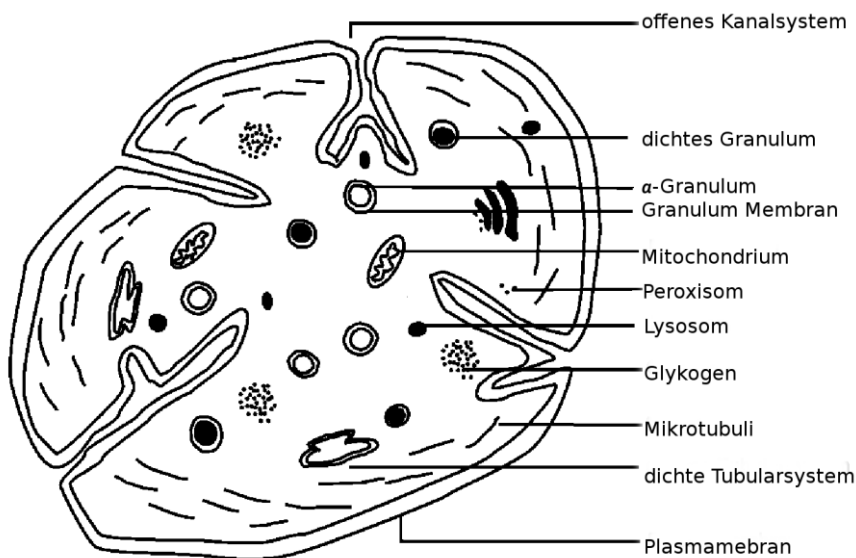
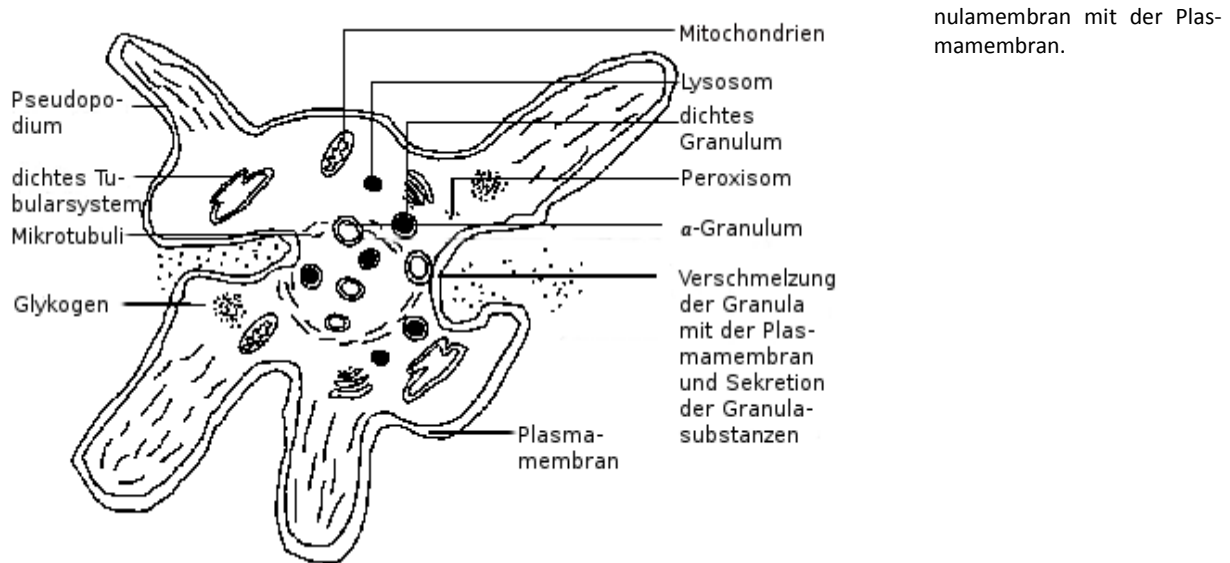


Abbildung 8 Morphologie eines ruhenden Thrombozyten [63]

Ruhende Thrombozyten (Diskozyt) weisen eine diskoide Gestalt auf. Man erkennt gut die Einstülpungen des offenen Kanalsystems sowie die wahllos verteilten Zellorganellen mit den Speicherganula.

Abbildung 9 Morphologie eines aktivierten Thrombozyten [63]

Aktivierte Thrombozyten (Echinosphärozyten) unterziehen sich einem Formwandel der zur Pseudopodienausbildung und zur zentralisierten Anordnung der Zellorganellen führt. Des Weiteren kommt es zur Sekretion der Speichergranula durch Verschmelzung der Gra-



1.4.2 Thrombozytenadhäsion

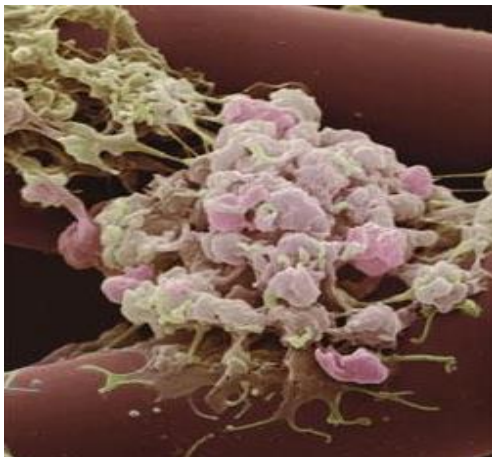


Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Aufnahme von aggregierten Thrombozyten [64]

Aktivierte Thrombozyten aggregieren an der verletzten Gefäßwand und decken den Defekt vollständig ab.

Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen. Sie wirken nicht nur in der Hämostase als Bindeglied zwischen dem Gefäßsystem und der plasmatischen Gerinnung, sondern sind auch Teil der angeborenen und adaptiven Immunabwehr, sie interagieren mit Leukozyten im Entzündungsgeschehen und fördern die Wundheilung. Zudem sind sie an der hämatogenen Metastasierung und dem Tumorwachstum beteiligt [65].

Bei einer verletzten Gefäßwand oder einem zerstörten Endothel werden Thrombozyten aus dem zirkulierenden Blut rekrutiert und bilden einen Verschlusspfropfen (siehe Abbildung 10). Diese sogenannte primäre Hämostase verläuft in drei Schritten: der Adhäsion, der Aktivierung und der Aggregation von Thrombozyten. Während der sogenannten Adhäsion haften die Thrombozyten zunächst an der verletzten subendothelialen Matrix des Gefäßes. Dies führt zur Aktivierung der Thrombozyten mit anschließendem Formwandel, der Ausschüttung der thrombozytären Granula und der Plättchenaggregation. Die Bindung von weiteren, im Blut zirkulierenden Blutplättchen an schon aktivierte Thrombozyten führt schließlich zur Bildung eines stabilen plättchenreichen primären Thrombus. Thrombozyten können jedoch auch durch verschiedenartige mechanische sowie biochemische Stimuli aktiviert werden. Etwa durch Bindung an entzündlich aktiviertes Endothel, wie es bei einer Sepsis oder Endokarditis vorliegt oder durch zu hohen Scherstress, der z.B. in arteriosklerotisch verengten Gefäßen vorkommt. Auch Substanzen wie Adrenalin, ADP, Thrombin, Serotonin, oxidiertes LDL, immobilisiertes Fibrinogen und bakterielle Toxine können die Blutplättchen aktivieren [63].

Durch hämodynamische Kräfte zirkulieren Thrombozyten in einer wandnahen Schicht des Endothels.

Dadurch können diese quasi im Vorbeifließen die Gefäßwand auf Läsionen absuchen. Das multimeres Glykoprotein von-Willebrand-Faktor (vWF) wird von Endothelzellen synthetisiert, in den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen gespeichert und sowohl konstitutiv in der Basalmembran gespeichert als auch durch Exozytose in den Blutstrom sezerniert, wo es als Träger für Faktor VIII (F VIII) fungiert. Infolge einer Gefäßläsion oder durch Kontakt mit Entzündungsmediatoren exprimiert das aktivierte Endothel ebenfalls den vWF auf seiner Oberfläche. Die bei einem verletzten Gefäß freiliegenden subendothelialen Kollagenfibrillen binden mit hoher Affinität den im Plasma zirkulierenden vWF. Zusätzlich werden vWF-Monomere durch Degranulation aus den thrombozytären α -Granula unmittelbar an der Verletzungsstelle konzentriert. Am Endothel assoziiert, wird der im Plasma in globulärer Form vorliegende vWF durch Scherkräfte langgestreckt. Diese Konformationsänderung führt dazu, dass der thrombozytäre Glykoprotein (GP) Ib-V-IX-Komplex diesen binden kann [66–68]. Erst durch die hochaffine Bindung von GPIb des leucinreichen GPIb-V-IX-Komplexes an den vWF werden die Blutplättchen abgebremst und können anschließend über die Kollagenrezeptoren GPVI und GPIIa (auch Integrin $\alpha_2\beta_1$) an das freigelegte Kollagen binden. Eine stabile Adhäsion wird jedoch erst im weiteren Verlauf der Plättchenaktivierung erreicht. Die Interaktion dieser synergistisch wirkenden Rezeptoren mit Kollagen führt zur Aktivierung der Blutplättchen. Infolge der Aktivierung kommt es über intrazelluläre Signalkaskaden (outside-in-signaling) zum Formwandel, der Degranulation und Aggregation der Thrombozyten sowie zur Ausbildung einer koagulatorischen Plasmamembran und der Freisetzung von Mikropartikeln. Nur bei niedrigen Scherraten sind die Plättchen in der Lage auch direkt an subendotheliales Kollagen, Fibronectin, Vitronectin oder Laminin zu binden [69].

Das zur Immunglobulin-Superfamilie gehörende GPVI besteht aus zwei extrazellulären immunglobulinähnlichen Domänen, einer transmembranären Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Region. GPVI ist mit der FcR γ -Untereinheit assoziiert, welche das Immunrezeptor-Tyrosin-abhängige Aktivierungsmotiv (ITAM, von engl. immunoreceptor tyrosinkinase activation motif) zur Signaltransduktion trägt. Der GPIIa Rezeptor führt ähnlich wie bei GPVI über Signalkaskaden zu einer Aktivierung der Thrombozyten. GPIIa gehört zur Gruppe der Integrine, welche die extrazelluläre Matrix mit Strukturen des Zytoskeletts verbinden [70]. Integrine sind Glykoproteine, die aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Heterodimeren, der α - und β -Untereinheit bestehen. Die mittlerweile 14 verschiedenen bekannten α -Untereinheiten weisen drei bis vier Binderegionen für divalente Kationen auf. So wird für die Ligandenbindung die Anwesenheit kleinster Mengen divalenter Kationen, etwa Calcium-Ionen, wie sie physiologischerweise im Plasma vorliegen, benötigt. Oft besteht die α -Kette aus einer niedrigmolekularen (leichten Kette) und einer höhermolekularen (schweren Kette) Untereinheit, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Anhand der β -Untereinheit wird diese Rezeptorfamilie klassifiziert. Die bisher acht bekannten β -Untereinheiten bestehen aus vier hochkonservierten cysteinreichen Sequenzen und sind mit dem Zytoskelett der Thrombozyten verankert. β -1 und β -2-Integrine erkennen die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-(RGD)-Aminosäuresequenz mit ihrer extrazellulären Domäne, die Bestandteil zahlreicher Matrixproteine ist [71].

Eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion wird im Zuge der Plättchenaktivierung durch den Übergang der thrombozytären Integrin-Rezeptoren von einem niedrigaffinen in den hochaffinen Zustand erreicht. Somit kann GPIIb (auch Integrin $\alpha_5\beta_1$) das in der Gefäßmatrix vorkommende Fibronectin und der Rezeptor VLA-6 (auch Integrin $\alpha_6\beta_1$) das Matrixprotein Laminin binden. Weiterhin ist der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa (auch Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) nun in der Lage Fibronectin, Vitronectin sowie vWF bzw. Fibrinogen zu binden. Das Ende der Adhäsion ist erreicht, wenn die Thrombozyten einen vollständigen Wundverschluss erreicht haben [72].

1.4.3 Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können über verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden (siehe

Abbildung 11). Oft führen diverse Mechanismen zur Aktivierung von Tyrosinkinasen (TK), welche wiederum die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Diese hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP₂) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ fungiert als sekundärer Botenstoff und führt nach Bindung an einen selektiven Kationenkanal des dichten tubulären Systems zum Efflux von Calcium-Ionen in den zytoplasmatischen Raum. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über weitere Signalkaskaden den Fibrinogenrezeptor aktiviert. Die erhöhte zytosolische Calcium- und DAG-Konzentration führt zur Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), dem shape change, der Degranulation und schließlich zur Aggregation der Thrombozyten. Des Weiteren verfügen Thrombozyten über zahlreiche G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Stimulation sowohl aktivierende als auch inhibierende Wirkungen auf die Thrombozyten entfalten können. So aktiviert Thromboxan A₂ (TXA₂) Thrombozyten sowohl para- als auch autokrin über einen G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor. Das vasokonstriktive Lipid wird von den Thrombozyten selbst infolge einer Aktivierung sezerniert. Durch die aktivierte PLA₂ wird aus den Phospholipiden der Plättchenmembran Arachidonsäure freigesetzt. Aus dieser entsteht über die Cyclooxygenase-1 (COX-1) zunächst Prostaglandin H₂ (PGH₂), welches über die Thromboxansynthetase zu TXA₂ umgewandelt wird [73].

Die Serinprotease Thrombin wird über die parallel ablaufende plasmatische Gerinnung aus Prothrombin gebildet. Thrombin gehört zu den stärksten Aktivatoren der Thrombozyten und aktiviert diese über die Protease aktivierten Rezeptoren-1 (PAR1), seltener PAR-4, welche ebenfalls G-Protein gekoppelte Rezeptoren darstellen. Thrombin (Faktor IIa) spaltet von diesem Rezeptor eine extrazelluläre 41 Aminosäuren lange Peptidsequenz des N-terminalen Endes ab. Der neue verkürzte Amino-Terminus bindet intramolekular an den Rezeptor und aktiviert ihn. Über TKs wird anschließend die PLC aktiviert. GPVI und Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermitteln das Kollagensignal ebenfalls über die Stimulation von TKs, welche die PLC aktivieren [74].

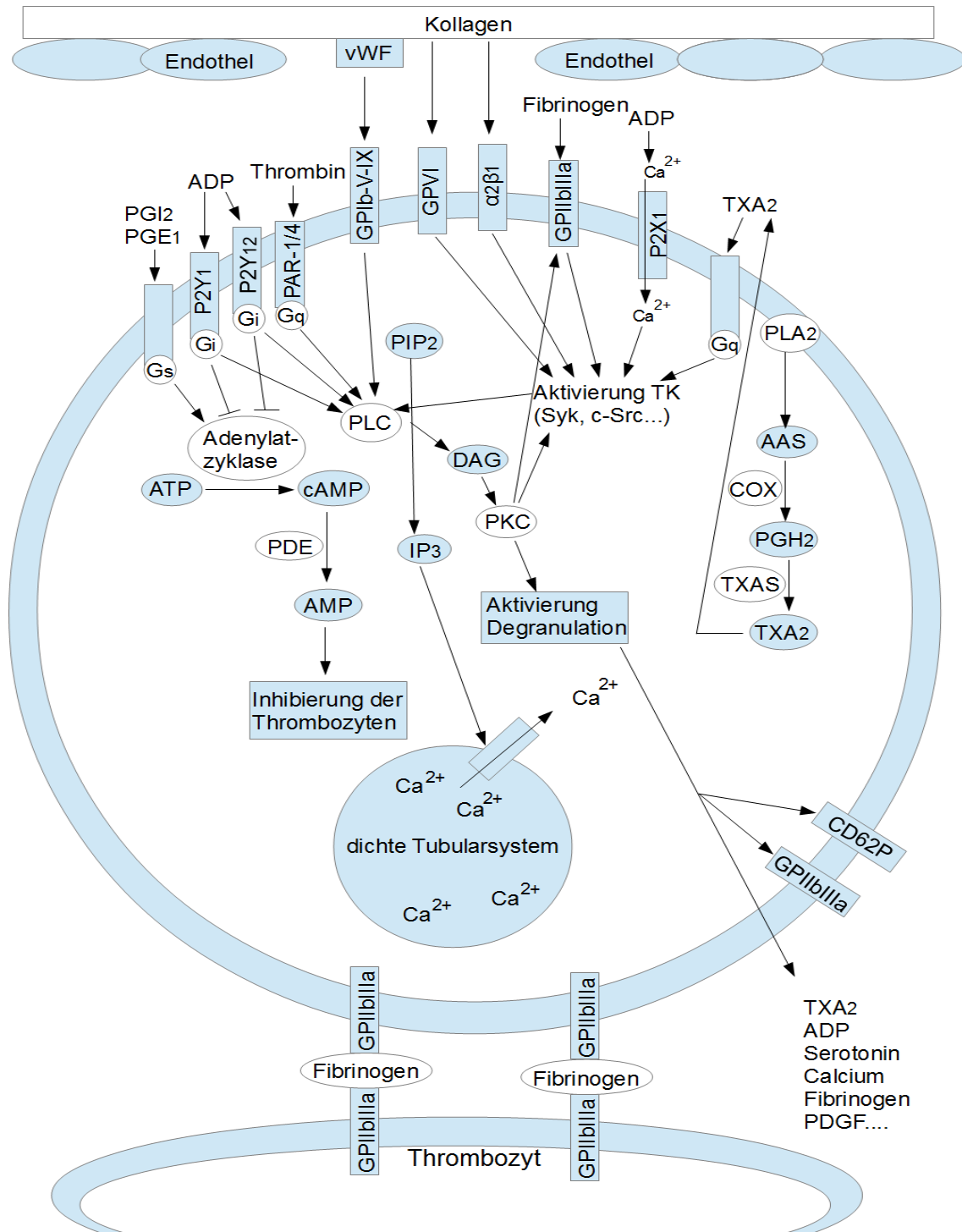


Abbildung 11 Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung (modifiziert nach [72,75])

Infolge der Plättchenaktivierung kommt es auch zur Freisetzung der thrombozytären Granula. Die Degranulation führt sowohl zu einer Verstärkung des Adhäsionsprozesses als auch zu einer autokrinen sowie parakrinen Aktivierung und Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Plättchen. Die Granulasubstanzen werden entweder durch Exozytose der Granulamembran mit der Plasmamembran des

offenen kanalikulären Systems oder mit der Plasmamembran des Plättchen freigesetzt [76]. Einen Überblick über die Substanzen der jeweiligen Speichergranula gibt Tabelle 5.

Tabelle 5 Hauptinhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (modifiziert nach [75,77])

α-Granula	Dichte Granula	Lysosomen
<p>Antikoagulatorische Faktoren: α₁-Antitrypsin, α₂-Makroglobulin, α₂-Antiplasmin, Protein C/S, Plasminogen, PAI-1, C1-Esterase-Inhibitor, TPFI</p> <p>Prokoagulatorische Faktoren: Kininogen, vWF, Faktor V, - VII;- XI;- XIII, Fibrinogen, Multimerin, Matrixmetalloproteinasen</p> <p>Adhäsionsproteine: Fibrinogen, Fibronectin, vWF, Thrombospondin, Vitronectin, GPIIb/IIIa, P-Selektin (CD62P)</p> <p>Wachstumsfaktoren: Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF, von engl. platelet derived growth factor), endotheliale Wachstumsfaktor, transformierender Wachstumsfaktor β, epidermale Wachstumsfaktor</p> <p>Entzündungsmodulatoren: IL-1β, PF-4, β-Thromboglobulin, RANTES, Kininogen, Komplementfaktoren, PAF, CD40-Ligand</p> <p>Antimikrobielle Proteine/ Immunmodulatoren: Thrombocidin, Fibrinopeptid A und B, Thymosin-β-4, β-Lysin, Immunglobulin A, -G, -M, Komplementfaktoren</p>	<p>Nukleotide: ATP ADP GTPα GDP</p> <p>Transmitter: Serotonin Histamin</p> <p>Kationen: Ca²⁺ Mg²⁺ Phosphat</p> <p>Membranproteine: Granulophysin</p>	<p>Proteasen: α-Arabinoside β-Galaktosidase β-Glucuronidase Elastase Kathepsin D Kathepsin E Kollagenase N-Acetylglucosaminidase Heparinase</p>

Auch die Freisetzung von ADP aus den dichten Granula spielt eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Rekrutierung von Thrombozyten. Die ADP-Wirkung wird über drei purinerge Rezeptoren vermittelt. Der nicht selektive Kationenkanal P2X₁ führt zu einem schnellen Einstrom von Calcium-Ionen in das Zytoplasma. Der G-Protein gekoppelte P2Y₁-Rezeptor führt über eine Aktivierung der PLC zur intrazellulären Calciummobilisation mit Formwandel und Thrombozytenaggregation. Zudem wird der GPIIb/IIIa-Rezeptor aktiviert und die Adenylatzyklase inhibiert. Diese katalysiert die Umwandlung von ATP in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welches über die Phosphodiesterase (PDE) zu dem inhibitorisch wirkenden AMP abgebaut wird. Inhibitoren der Adenylatzyklase, wie Prostacyclin (auch Prostaglandin I₂, PGI₂) und PGE₁ stimulieren diese über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und inhibieren so die Plättchenfunktion. Der G-Protein gekoppelte P2Y₁₂-Rezeptor inhibiert ebenfalls die Adenylatzyklase und vermittelt die Verstärkungsreaktion sowie die solide Aggregation [78].

Durch die Degranulation werden die in der α-Granulamembran enthaltenen transmembranären Proteine GPIIb/IIIa und P-Selektin (CD62P) durch Koaleszenz der Granulamembran mit der Plättchenmembran verstärkt auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert [79]. CD62P gehört zur Gruppe der Selektine, welche vaskuläre Adhäsionsrezeptoren darstellen und heterotypische Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen vermitteln. Die Selektinfamilie besteht aus dem auf Leukozyten befindlichen L-Selektin (CD62L), dem E-Selektin (CD62E), welches auf Endothelzellen exprimiert wird und P-Selektin, welches sowohl auf Thrombozyten als auch auf Endothelzellen anzutreffen ist. Die Glykoproteine bestehen aus einer extrazellulären calciumabhängigen Lektin-Domäne, einer angrenzenden, dem epidermalen-Wachstumsfaktor-ähnlichen Domäne, zwei bis neun sich wiederholender Domänen, einer transmembranären und einer intrazellulären zytoplasmatischen Domäne. Selektine binden sialysierte Oligosaccharide, die an Mucin-ähnliche Glykoproteine verschiedenster Zellen gebunden sind. P-Selektin vermittelt so die Bindung zwischen PMN und Plättchen und induziert inflammatorische Reaktionen in PMN. Auf einem mit Plättchen bedeckten verletzten Subendothel rollen die Leukozyten P-Selektin vermittelt und wandern anschließend ins Gewebe ein [80].

ADP, Serotonin und Calcium aus den dichten Granula sowie Fibrinogen, welches von den α -Granula freigesetzt wird, spielen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von noch ruhenden Thrombozyten. Das Serotonin bindet an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und verstärkt zusammen mit ADP die Plättchenaktivierung. Die aus den α -Granula freigesetzten Wachstumsfaktoren wie PDGF, fördern die Heilung des verletzten Gefäßes durch proliferative Effekte auf die Fibroblasten. Weiterhin werden proinflammatorische Mediatoren, wie CD40-Ligand und IL-1 von aktivierten Thrombozyten freigesetzt. Die aus den Lysosomen freigesetzten Hydrolasen schädigen das verletzte Endothel und spielen eine pathophysiologische Rolle in atherosklerotischen Prozessen [81].

1.4.4 Thrombozytenaggregation und Gerinnselretraktion

Das primär gebildete Thrombozytenaggregat ist relativ instabil und benötigt eine effiziente sekundäre Hämostase zur Festigung. Diese beginnt als Folge der Thrombozytenaktivierung mit der Aktivierung der Koagulationskaskade und der Aggregation der Plättchen über GPIIb/IIIa-vermittelte Fibrinogenbrücken. Das Glykopeptid Fibrinogen wird in den Hepatozyten der Leber gebildet und in das Plasma abgegeben. Es ist ein Dimer aus zwei identischen Hälften, die jeweils aus einer α -, β -, und γ -Polypeptidkette bestehen, welche über Disulfidbrücken verbunden sind [82].

Die Thrombozytenaggregation wird in zwei Phasen unterschieden. Während der primären Aggregationsphase sind die Thrombozyten über Fibrinogenbrücken locker und reversibel verbunden. Die sekundäre Aggregationsphase setzt zeitlich versetzt ein und beginnt mit der Degranulation der Plättchen, wodurch es zu einer irreversiblen, festen Verknüpfung der Thrombozyten miteinander kommt. Die Fibrinogenbrücken werden mit Hilfe des GPIIb/IIIa-Rezeptors ausgebildet. Der Fibrinogenrezeptor gehört zur Gruppe der β_3 -Integrine. Mit 60.000-100.000 Rezeptoren pro Plättchen gehört dieser zu den häufigsten Membran-Glykoproteinen auf Thrombozyten. 70 % der Rezeptoren sind konstitutiv auf der thrombozytären Oberfläche exprimiert, während die restlichen 30 % von den intrazellulären Speichern, den α -Granula und dem offenen kanalikulären System, nach Aktivierung der Plättchen freigesetzt werden [75]. GPIIb/IIIa wird anders als der Kollagenrezeptor erst nach Plättchenaktivierung über intrazelluläre Signalwege (engl. inside-out-signaling) aktiviert. Dabei geht der Rezeptor in seine aktive Konformation über wodurch hochaffine Bindungsstellen für Fibrinogen freigelegt werden. Im niedrigaffinen Zustand kann der Rezeptor lediglich immobilisiertes Fibrinogen binden. Zu den spezifischen Binderegionen des Liganden Fibrinogen gehört die Dokapeptid-Sequenz KQAGDV am Amino-terminalen-Ende der α -Kette und zwei RDG-Signalsequenzen in der Region der α -Kette. Die Bindung von Fibrinogen induziert eine Änderung der Konformation, die zu einer transmembranären Signaltransduktion (outside-in-signaling) führt. Daneben ist der aktivierte Rezeptor auch in der Lage RGD-Sequenz- enthaltende adhäsive Proteine, wie Fibronectin, Vitronectin, vWF und Thrombospondin zu binden [83].

Eine weitere Folge der Aktivierung von Blutplättchen ist die Bildung einer prokoagulanten Oberfläche durch Verlagerung von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin, die eine erhöhte Bindeaktivität für Koagulationsfaktoren aufweisen, an die Oberfläche der Thrombozyten. Weiterhin kann der subendotheliale TF, der sich membranständig auf Fibroblasten befindet, durch die Endothelläsion den plasmatischen FVII aktivieren. Der gebildete Komplex aktiviert die Faktoren X, FV und FIX. Auf der Zelloberfläche von TF exprimierenden Zellen kann FXa im Komplex mit FVa und FVIIa geringe Mengen Thrombin generieren. Das gebildete Thrombin reicht nicht für die Bildung eines stabilen Thrombus aus, aktiviert jedoch zusätzlich die Plättchen sowie die auf der Thrombozytenoberfläche gebundenen Kofaktoren des prokoagulant Tenase-(FVIIIa/ FIXa) und Prothrombinase (FVa/ FXa)-Komplexes. Durch die Aktivierung der Koagulationskaskade werden große Mengen Thrombin (FIIa) durch proteolytische Spaltung von Prothrombin (FII) in der Umgebung des Plättchenaggregates gebildet. Thrombin wiederum spaltet von Fibrinogen (FI) die Fibrinopeptide A und B ab, wodurch Fibrinmonomere entstehen, die spontan zu Fibrin polymerisieren. Durch das gebildete Fibrin, welches zusätzlich durch FXIIIa quervernetzt wird, kommt es zur Verfestigung des Gerinnsels.

Der fibrinreiche stabile Thrombus versiegelt schließlich das verletzte Gefäß effizient und leitet den Heilungsprozess ein [84,85].

Die prokoagulante Aktivität in Thrombusnähe wird durch thrombozytäre Mikropartikel (PMP, von engl. Platelet microparticles) noch erhöht. Mikropartikel sind kleine Membranvesikel mit einer hohen prokoagulanten Aktivität, die von aktivierten Thrombozyten abgegeben werden. Thrombozyten gehören zur Hauptquelle von Mikropartikeln. Neben diesen sind Endothelzellen, Leukozyten sowie Erythrozyten ebenfalls in der Lage Mikropartikel zu bilden [86]. PMP können mit Leukozyten interagieren und werden vermehrt im Zuge einer Sepsis gebildet [87]. Die prokoagulanten Eigenschaften ergeben sich durch die Exposition negativ geladener Phospholipide, die nach Bildung des Tenase- und Prothrombinasekomplexes zur Thrombingeneration führen. Des Weiteren können PMP Zellen wie PMN aktivieren und somit die Produktion inflammatorischer Mediatoren anregen [88].

Nach der Formation von Thrombin ist der letzte Schritt der Koagulationskaskade die Gerinnselretraktion (engl. clot retraction). Dabei ziehen sich unter ATP-Verbrauch die Aktinfilamente in den Fortsätzen der Thrombozyten zusammen. Unter Plasmaauspressung kommt es zur Verkürzung der Fibrinfäden des Plättchenaggregates, welches zu einer Verfestigung des Thrombus führt [86,89]. Bei der clot retraction spielt das Protoonkogen B Zell Lymphom-3 (Bcl-3, von engl. B cell lymphoma-3) eine wichtige Rolle (siehe Kap. 1.4.6). *Weyrich et al.* konnten feststellen, dass die Inhibierung der Bcl-3 Expression die Gerinnselretraktion von humanen Thrombozyten unterband und kein stabiler Thrombus entstand. Im Gegenzug verstärkte die Überexpression des Proteins die clot retraction [90].

1.4.5 Inhibitoren der Thrombozytenfunktion

Abciximab (auch c7E3 Fab, ReoPro®) wird als Thrombozytenaggregationshemmer zur Vermeidung von ischämisch kardialen Komplikationen z.B. bei Eingriffen am Herzen eingesetzt. Abciximab ist ein human-murines chimäres Antikörper-Fragment. Durch die Bindung des monoklonalen Fab-Antikörpers an die Fibrinogen-Bindungsstelle des GPIIb/IIIa-Rezeptors kann Fibrinogen nicht mehr binden und es kommt zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation [91,92].

Iloprost (Ventavis®) ist ein synthetisches Prostacyclin-Analogon, welches bei pulmonaler arterieller Hypertonie eingesetzt wird. Die Halbwertszeit beträgt 20 bis 30 Minuten und ist somit circa zehnmal höher als die Halbwertszeit des physiologisch vorkommenden Prostacyclins. Iloprost bindet an den G-Protein gekoppelten PGI₂-Rezeptor und erhöht über eine Stimulation der Adenylatzyklase die intrazelluläre cAMP-Konzentration, welches inhibitorische Effekte (siehe

Abbildung 11) auf die Thrombozyten und das Endothel hat. Iloprost hemmt hierdurch die Thrombozytenaggregation und wirkt vasodilatierend [93–96].

Nitroprussid-Natrium (NPN, Nipruss®) hemmt ebenfalls die Thrombozytenfunktion. Hierbei handelt es sich um einen vasodilatierenden NO-Donator, der bei hypertonen Krisen eingesetzt wird. Durch die NO-Stimulation der thrombozytären Guanylatzyklase, wodurch es zu einer Erhöhung des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Spiegels kommt, wird die thrombozyteninhibitorische Wirkung vermittelt [97,98].

β_1 - und β_3 -Integrine erkennen und binden Liganden mit der sogenannten RGD-Aminosäuresequenz. Dieses Peptid ist Bestandteil von vielen extrazellulären Matrixproteinen, etwa dem vWF, Fibronectin und Fibrinogen. Synthetische Peptide mit dieser Aminosäuresequenz und einer ähnlichen molekularen Struktur fungieren als kompetitive Inhibitoren gegenüber den physiologischen Liganden dieser Integrinrezeptoren [75]. Auch der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa gehört zur Unterklasse der RGD-erkennenden Integrine und kann demzufolge durch Substanzen mit der RGD-Sequenz inhibiert werden. Das synthetische Tetrapeptid RGDS (Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Serin) konkurriert um die Bindung mit Fibrinogen am Integrin α IIb β 3 und kann somit, je nach Konzentration, die Thrombozytenaggregation verhindern [99,100].

Auch der murine monoklonale Antikörper PAC-1, der ein Epitop nahe der Bindungsstelle für Fibrinogen erkennt, wirkt inhibitorisch. Der Antikörper bindet nur an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor und

konkurriert dort mit den physiologischen Liganden. PAC-1 verhindert so die Fibrinogen vermittelte Thrombozytenaggregation [101–103].

1.4.6 Proteinexpression und Bcl-3

Da Thrombozyten anukleare Zellen darstellen, sind sie nicht in der Lage eine Transkription, also eine Übersetzung von Desoxyribonukleinsäure (DNA, von engl. deoxyribonucleic acid) in Ribonukleinsäure (RNA, von engl. ribonucleic acid), durchzuführen. Allerdings konnte bewiesen werden, dass Blutplättchen die von den Megakaryozyten während der Thrombopoese durch Fragmentation erhaltene Boten-RNA (mRNA, von engl. messenger RNA), in Folge einer Aktivierung translatieren können (siehe Abbildung 12). So gelang der Arbeitsgruppe von *Weyrich et al.* 1998 der Nachweis, dass Thrombin stimulierte Thrombozyten zeit- und konzentrationsabhängig das Protein Bcl-3 aus megakaryozytären mRNA translatieren [105]. Bcl-3 wurde zuvor als nukleares Protein in einer Subgruppe von leukämischen B-Lymphozyten entdeckt. Es gehört zur Familie der I κ B Proteine, welche den nuklearen Transkriptionsfaktor NF κ B (nukleare Transkriptionsfaktor kappa-leichte-Kette-Verstärker von aktivierten B-Zellen, von engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) regulieren und somit Einfluss auf die Proteinexpression in kernhaltigen Zellen nehmen [106,107]. Bei den anuklearen Thrombozyten erfüllt das Protein andere Funktionen, die noch nicht bis ins Detail geklärt sind. Bisher ist bekannt, dass Bcl-3 nach der Expression in aktivierten Thrombozyten an die SH3-Domäne der TKs Fyn und Lck bindet und damit unter anderem die clot retraction reguliert. Die Expression von Bcl-3 findet Integrin und mTOR (Ziel des Rapamycins im Säugetier, von engl. mammalian target of rapamycin)-vermittelt statt. Eine Aktivierung von Thrombozyten durch beispielsweise Thrombin führt dazu, dass der GPIIb/IIIa-Rezeptor in seine aktive Konformation übergeht und Fibrinogen binden kann. Über dieses Integrin können Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen adhären bzw. über Fibrinogenbrücken untereinander aggregieren. Durch die Fibrinogenbindung an das aktivierte Integrin α IIb β ₃ wird ein Signal in die Plättchen geleitet (outside-in signaling), welches schließlich zur Expression von Bcl-3 führt. Auch an Kollagen adhären Thrombozyten vermitteln das Signal zur Proteinexpression vermutlich über das Integrin α ₂ β ₁ [108]. Neben dem Bcl-3 Protein wurden in den letzten Jahren noch weitere Proteine etwa IL-1 β , COX und TF entdeckt [109], die von Thrombozyten translationiert werden [110].

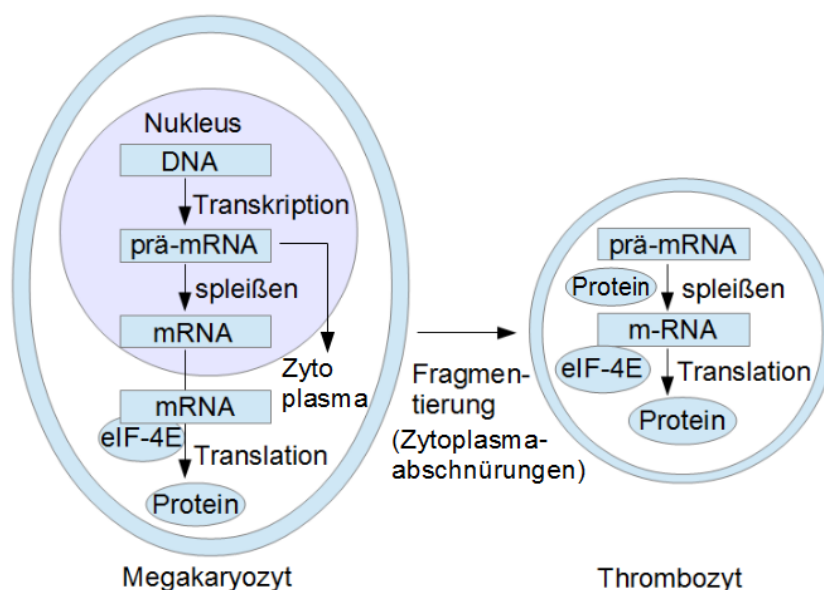


Abbildung 12 Übertragung des Translationsapparates und des Spleißosoms während der Thrombopoese [104]

Thrombozyten entstehen durch zytoplasmatische Abschnürungen aus Megakaryozyten. Dabei werden die Komponenten des Spleißosoms sowie spezifische prä-mRNA übertragen. Auch alle Faktoren für die Translation, ebenso wie megakaryozytäre Proteine, die nicht mehr von den Thrombozyten exprimiert werden können, etwa bestimmte Granulasubstanzen, gelangen so in die Thrombozyten.

Die Translation wird in drei Schritte unterteilt. Zur Initiation der Proteinbiosynthese wird der sogenannte Initiationskomplex gebildet, an dem verschiedene eukaryotische Initiationsfaktoren regulie-

rend beteiligt sind. Zunächst bindet die mRNA an die kleine 40S-Untereinheit des Ribosoms. Der Startpunkt für die Übersetzung in ein Protein ist das AUG-Codon (Basentriplett) auf der mRNA, welches für die Aminosäure Methionin codiert. Eine mit Methionin beladene t-RNA fungiert als Starter-t-RNA. Ist der Initiationskomplex vollständig, kann sich die große 60S-Untereinheit des Ribosoms anlagern und die Elongation beginnt. Während der Elongation kommt es zum Wachstum der Polypeptidkette unter Beteiligung von Elongationsfaktoren. Dabei lagert sich die Aminoacyl-t-RNA an die komplementäre mRNA an. Anschließend verknüpft die Peptidyltransferase die Aminosäuren der Aminoacyl-t-RNA über Peptidbrücken. Die Termination beendet die Proteinsynthese. Sobald ein Stoppcodon in der mRNA erscheint bricht die Translation ab, da es keine komplementäre Aminoacyl-t-RNA zum Stoppcodon gibt. Anschließend wird die Polypeptidkette sowie die mRNA freigesetzt und das Ribosoms zerfällt wieder in seine zwei Untereinheiten [111].

Es hat sich gezeigt, dass eine signalabhängige Translation von Proteinen erst nach Aktivierung der Thrombozyten möglich ist (siehe Abbildung 13). Der eukaryotische Initiationsfaktor-4E (eIF-4E), der sich im Membrangerüst der Thrombozyten zusammen mit den β_3 -Integrinen befindet, bindet an die sogenannte Cap-Struktur der mRNA und vermittelt die Bindung der megakaryozytären mRNA an das Ribosom. Die zu translatierende mRNA ist jedoch im Zytoskelett, außerhalb des Membranskeletts der Plättchen, lokalisiert. Durch diese räumliche Trennung ist keine Proteinexpression möglich. Erst durch den, durch das outside-in Signal des Integrin vermittelten Formwandel, kommt es zur Verlagerung des eIF-4E in das Zytoplasma, so dass dieser mit der mRNA interagieren kann. Ein weiterer translationsregulierender Faktor ist das eIF-4E bindende Protein 1 (4E-BP1). Dieses liegt in ruhenden Plättchen an den eIF-4E gebunden vor, wodurch die Translation unterdrückt wird. Nach Thrombozytenaktivierung wird das 4E-BP1 innerhalb von Minuten durch mTOR phosphoryliert, spaltet sich vom eIF-4E ab, sodass dieser in der Lage ist an die mRNA zu binden [112,113]. Des Weiteren sind Thrombozyten auch in der Lage zu spleißen, also nicht kodierende Introns aus der prä-mRNA zu entfernen (siehe Abbildung 12). Die Exons, also die kodierenden Abschnitte werden miteinander verbunden und eine translatierbare mRNA wird erhalten. Das Spleißosom erhalten die Thrombozyten ebenfalls von Megakaryozyten während der Fragmentation. Das proinflammatorisch wirkende IL-1 β oder der TF können so durch spleißen aus einer prä-mRNA exprimiert werden [114].

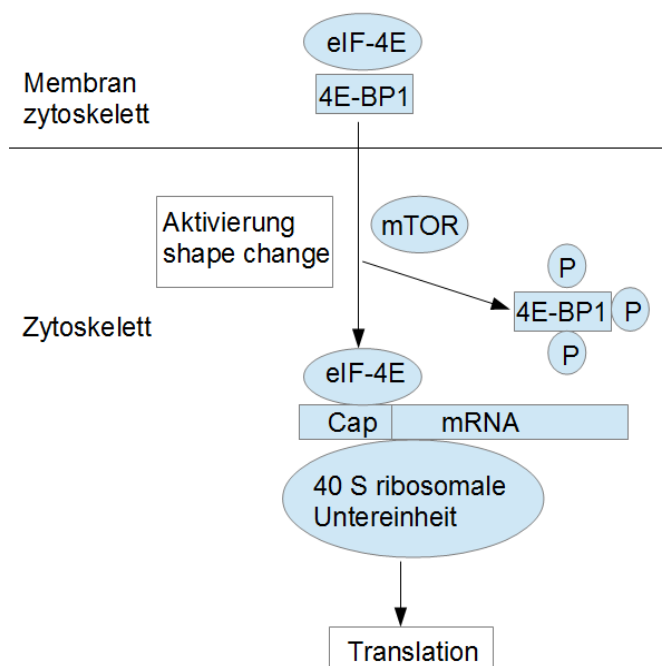


Abbildung 13 Proteinexpression in Thrombozyten [112,113]

Im Zuge der Thrombozytenaktivierung wird das 4E-BP1 von mTOR phosphoryliert, der eIF-4E wird frei und kann durch den shape change in das Zytoskelett zur mRNA verlagert werden. Dort bindet der eIF-4E an die Cap-Struktur der mRNA und führt diese zum Ribosom, wo die Translation stattfindet.

1.4.6.1 Inhibierung der thrombozytären Proteinexpression

Das aus dem Bakterium *Streptomyces alboniger* isolierte Puromycin gehört zur Gruppe der Aminonukleosid-Antibiotika. Neben seiner antibiotischen Wirkung hemmt es auch die Proteinsynthese. Mit seiner purinergeren Struktur ähnelt Puromycin dem Aminoacyl-transfer-RNA-Ende (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Als Analogon kann Puromycin so während des Peptidyltransfers anstatt einer transfer-RNA (t-RNA) an die Eingangsstelle (A-Stelle) am Ribosom binden. Nach erfolgtem Peptidyltransfer auf die Aminogruppe von Puromycin fällt das Peptidylpuromycin aus dem Ribosom, da die nötige t-RNA Struktur, welche für die Bindung an das Ribosom wichtig ist, fehlt. Außerdem kann ein weiteres Wachsen der Peptidylkette nicht erfolgen, da die Peptidyltransferase die Amidbindung im Puromycin nicht spalten kann [115,116].

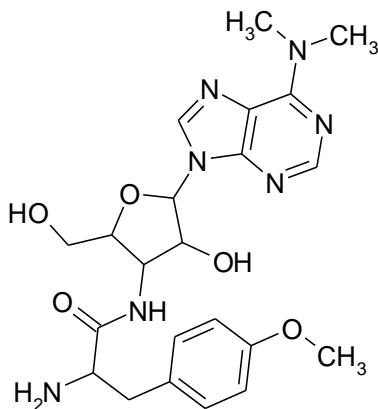


Abbildung 14 Struktur von Puromycin [117]

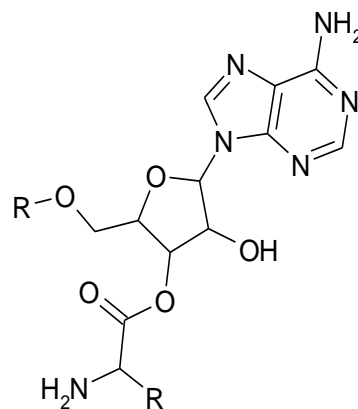


Abbildung 15 Struktur von t-RNA (R = Rest) [117]

Rapamycin, auch Sirolimus genannt, wird aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus*, welches in Bodenproben der Osterinseln (Rapa nui) entdeckt wurde, isoliert. Das Makrolid-Antibiotikum wirkt immunsuppressiv, antimykotisch, antitumoral und antiproliferativ. Es wird als Immunsuppressivum bei Organtransplantationen und durch seine antiproliferativen Eigenschaften zur Verhinderung von Restenosen bei Stents eingesetzt. Die zahlreichen Wirkungen von Rapamycin werden durch die Interaktion mit den FK bindenden Proteinen (FKBP), besonders FKBP12, vermittelt. Der Sirolimus-FKBP-Komplex inhibiert die Serin/Threonin-Kinase mTOR, welche zur Gruppe der Phosphatidylinositol-3-Kinase-ähnlichen Kinasen gehört und verhindert die aktivierungsabhängige Phosphorylierung der S6 Kinase 1 und des 4E-BP1 und somit die mTOR-abhängige Expression einer Untergruppe von Proteinen in Thrombozyten. Durch das Ausbleiben der mTOR-abhängigen Phosphorylierung des 4E-BP1 bleibt dieses fest an den eIF-4E gebunden, sodass der Faktor die mRNA nicht zur Translation an das Ribosom führen kann. Durch die verhinderte mTOR-vermittelte Phosphorylierung der S6 Kinase unterbleibt ebenfalls deren Aktivierung des S6-Proteins, welches zur 40S ribosomalen Untereinheit gehört, wodurch es zu einer Verringerung der Translation der sogenannten 5'TOP-mRNA-Familie kommt [118,119].

1.5 Neutrophile Granulozyten

1.5.1 Morphologie von neutrophilen Granulozyten

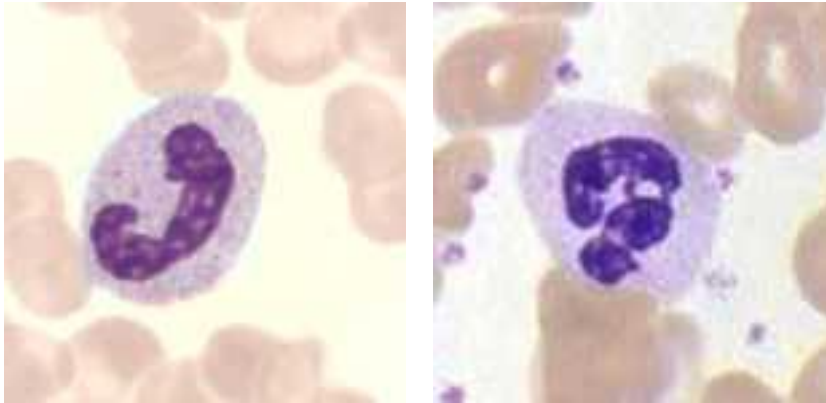


Abbildung 16 PMN in verschiedenen Reifestadien [120,121]

Im linken Bild ist ein junger stabkerniger Granulozyt abgebildet. Im rechten Bild ist ein reifer segmentkerniger neutrophiler Granulozyt zu sehen.

Die circa 10 μm großen neutrophilen Granulozyten gehören mit einem Anteil von rund 60 % zu den am häufigsten vorkommenden Leukozyten. Sie werden im Knochenmark aus multipotenten Vorläuferzellen gebildet. Die Konzentration im Blut beläuft sich auf etwa 2500-7500 PMN/ μl . Diese Anzahl kann jedoch während einer Infektion dramatisch, bis auf das Zehnfache, ansteigen. Im Knochenmark existiert ein Pool reifer PMN, der im Falle einer Infektion innerhalb weniger Stunden in die Blutbahn abgegeben werden kann und eine Versorgung mit PMN für 4-8 Tage sicherstellt. In der Blutbahn befinden sich 40% der PMN im zirkulierenden Pool. Die übrigen 60 % sind im marginalen Pool lokalisiert, welcher am Endothel der Kapillaren und postkapillären Venulen adhären PMN erfasst. Nicht aktivierte PMN verlassen mit einer Halbwertszeit (HWZ) von rund 6,7 Stunden die Blutbahn und werden abgebaut. Aktivierte PMN treten in die Organbindegewebe ein, wo sie mit einer HWZ von zwei bis drei Tagen zur Verfügung stehen. Die zirkulierenden PMN befinden sich in einem inaktivierten Zustand und weisen eine kugelförmige Gestalt auf. Werden die PMN jedoch durch chemische Stimuli oder die Bindung an aktivierte Oberflächen stimuliert, bilden die Zellen eine amöboide Struktur mit vielen Pseudopodien aus, die es ihnen erlaubt in Gewebe einzuwandern [122,123].

Anhand der Segmentierung des Zellkerns kann man die PMN in drei Reifestadien einteilen. Bei unreifen PMN hat der Zellkern die Form eines S-förmig gekrümmten Stabes (stabkernige PMN). Ein verstärktes Auftreten von stabkernigen PMN deutet auf eine erhöhte Neubildung im Zuge einer Infektion hin (Linksverschiebung Blutbild). Im Verlauf der Reifung wird der Kern segmentiert (segmentkernige PMN). Ausgereifte PMN haben einen aus drei bis fünf Segmenten, die über dünne Chromatinbrücken verbunden sind, bestehenden Kern (siehe Abbildung 16). Alte PMN mit mehr als fünf Kernsegmenten bezeichnet man als hypersegmentierte PMN (Rechtsverschiebung Blutbild) [124,125]. Die Bezeichnung Granulozyt beruht auf den zahlreich im Zytoplasma vorkommenden Granula (siehe Abbildung 17). Nach dem lichtmikroskopischen Anfärbeverhalten der Granula mit sauer-basischen Farbstoffgemischen unterscheidet man weiterhin die eosinophilen und basophilen Granulozyten. In PMN existieren zwei Arten von Granula. Die Primärgranula (auch Azur- oder unspezifische Granula) sind in reifen PMN nur noch in geringer Zahl vorhanden und sind als Lysosomen aufzufassen. Neben etlichen lysosomalen Enzymen enthalten sie bakterizide Enzyme, wie saure Phosphatase, Myeloperoxidase, Kollagenase und basische Proteine. Die Sekundärgranula (auch spezifische oder neutrophile Granula) lassen sich weder mit basischen noch mit sauren Farbstoffen anfärben (lat. neuter = keiner von beiden) und enthalten vor allem bakterizide Substanzen. In ihnen befinden sich Laktoferrin, Lysozym, Cobalophilin und Defensine. Neben den Granula befinden sich im Zytoplasma typische Zellorganellen, wie Mitochondrien, ein Golgi-Apparat, das endoplasmatische Retikulum sowie das Zytoskelett, welches für die Diapedese sowie die amöboide Beweglichkeit während des Aufsuchens von Krankheitserregern im Gewebe nötig ist [126].

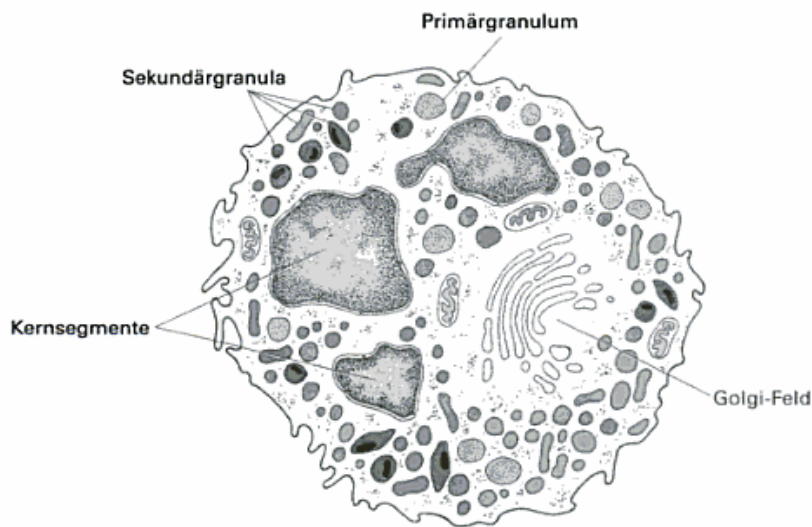


Abbildung 17 Schematische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten [123]

Deutlich zu erkennen ist der segmentierte Zellkern und die Primär- bzw. Sekundärgranula.

1.5.2 Funktion von neutrophilen Granulozyten

PMN spielen als Zellen des angeborenen Immunsystems eine große Rolle bei der Bekämpfung insbesondere bei bakteriell, als auch durch Pilze bedingter Infektionen. Sie werden als erste Zellen zu infizierten Geweben rekrutiert, sind hochbeweglich und besitzen viele zytotoxische Mechanismen, um eine Reihe mikrobieller Pathogene abzutöten. Bei systemischen Entzündungsreaktionen, wie der Sepsis kommt es jedoch zur einer übermäßigen Aktivierung von PMN. Diese adhären daraufhin am Endothel und transmigrieren in das darunterliegende Gewebe. PMN spielen hierbei eine entscheidende Rolle, da sie dabei sowohl das Endothel als auch das Gewebe schädigen und somit diese schwerwiegende Erkrankung begünstigen [127]. Auch bei der Endokarditis kommt es zu einer Einwanderung von PMN in das entzündete Herzgewebe, welches die Entzündungsreaktion verstärkt und zu einer lokalen Destruktion des Klappengewebes führt [51]

Der Vorgang der Leukozytenextravasation kann in vier Schritte unterteilt werden: die Aktivierung, das Rollen, die Adhäsion und schließlich die Transmigration der PMN (siehe Abbildung 18). PMN aus dem marginalen Pool haben eine erheblich verlängerte Passagezeit und zirkulieren nahe an der Gefäßwand, welches deren Adhäsion am Endothel begünstigt. Dieser Prozess der Leukozytenakkumulation in der Peripherie von Gefäßen wird als Margination bezeichnet. Durch freigesetzte Mediatoren wie Histamin, LPS, TNF- α oder IL-1 werden die PMN und das Endothel aktiviert. Hierdurch kommt es zur Expression von E-Selektin auf der Endotheloberfläche sowie zur Externalisierung von P-Selektin aus den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen. Ebenfalls wird L-Selektin vermehrt auf der leukozytären Oberfläche exprimiert [128]. Die PMN binden anschließend mit ihrem auf den Mikrovilli vorhandenen und vom L-Selektin präsentierten P-Selektin-Glykoprotein-Liganden-1 (PSGL-1, Sialyl-Lewis) und GP CD44 an die oberflächlich exprimierte Selektine des Endothels. E-Selektin bindet dabei zusätzlich an den E-Selektin-Liganden-1 (ESL-1), welcher sich ebenfalls auf den Mikrovilli von PMN befindet. Die Selektin vermittelten Bindungen sind nur schwach, sodass die PMN an das Endothel binden und sich dann wieder lösen. Hierdurch kommt es zum sogenannten Rollen der PMN am Endothel. Während des Rollens erfolgt ein Priming der PMN durch inflammatorische Substanzen wie PAF, LT oder IL-1/-2 [129]. In der dritten Phase der Leukozytenrekrutierung kommt es zur Chemokin vermittelten de novo Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Immunglobuline, wie VCAM und ICAM. Chemokine sind Zytokine mit chemotaktischer Aktivität, die vor allem von geschädigten Endothelzellen ausgeschüttet werden und über elektrostatische Wechselwirkungen mit Bindungsmolekülen wie CD44, Glypican oder Syndecan auf der Endotheloberfläche zu-

rückgehalten werden. Stimuliert durch die Chemokine des Endothels wie IL-1 β , TNF- α und Interferon- γ (IFN- γ) werden PMN aktiviert. Im Zuge dessen gehen deren oberflächliche Integrine in ihre aktive Konformation über. Die leukozytären Integrine CD11b/CD18 (Makrophagen-Antigen-1, MAC-1) und CD11a/CD18 sind nun in der Lage das endotheliale ICAM-1 zu binden [130]. Das Integrin VLA-4 (very late antigen-4) (auch CD49d/CD29) bindet VCAM-1 auf der Endothelzelloberfläche. Durch diese Bindungen wird die zunächst lockere Adhäsion verstärkt, es kommt zu einer festen Bindung der Leukozyten an das Endothel und zur Umlagerung des Zytoskeletts, wodurch die PMN abflachen. In der letzten Phase erfolgt die PECAM vermittelte Transmigration, auch Diapedese genannt, der PMN zwischen den Endothelzellen hindurch in das Gewebe entlang eines Chemokin-Konzentrationsgradienten (Chemotaxis). Dabei schiebt der Leukozyt Pseudopodien zwischen die Kontaktstellen der Endothelzellen. Um besser durch die Endothelzellen in das Gewebe zu gelangen schütten die PMN Granulainhaltsstoffe wie Proteasen aus. Dies trägt wahrscheinlich zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und Ödembildung bei. Des Weiteren kommt es durch die zahlreich am Endothel haftenden und über L-Selektin aggregierte PMN zur Störung der Mikrozirkulation. Nach der Diapedese erfolgt die Migration der PMN zum Ort der Gewebeschädigung [131,132].

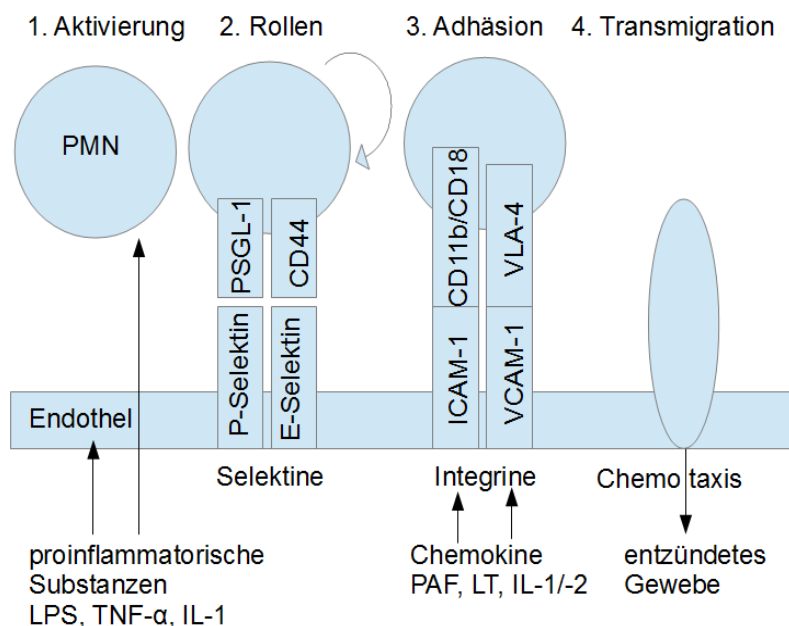


Abbildung 18 Leukozytenextravasation (modifiziert nach [129])

Durch proinflammatorische Substanzen aktiviertes Endothel präsentiert Selektine auf seiner Oberfläche. Diese werden vom leukozytären PSGL-1 bzw. CD44 gebunden, wodurch die PMN am Endothel rollen. Durch Chemokine stimuliert kommt es zur Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen, die von aktivierten leukozytären Integrinen gebunden werden. In Folge dessen haften die PMN fest am Endothel. Anschließend Transmigrieren die PMN entlang eines chemo-taktischen Gradienten in das entzündete Gewebe.

Im entzündeten bzw. geschädigten Gewebe erkennen die PMN pathogene Strukturen, wie LPS oder komplementmarkierte Erreger anhand ihrer PRR. In Folge dieser Pathogenerkennung werden die Granulozyten aktiviert und sind nun in der Lage über verschiedene Mechanismen die eingedrungenen Mikroben abzutöten. [133]. So werden im Gewebe befindliche Mikroorganismen durch die Freisetzung von bakteriziden Substanzen aus den Granula oder die Produktion und Sezernierung toxischer Sauerstoffradikale im Zuge des sogenannten *oxidative burst* abgetötet. Hierbei kommt es durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase in der Plasmamembran der PMN zur Übertragung eines Elektrons auf Sauerstoff, wodurch Superoxid (O_2^-) gebildet wird. Dieses wird durch die Dismutase in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. Anschließend baut die in den Primärgranula enthaltene Myeloperoxidase dieses in Gegenwart von Halogenen zu Hypochlorit ($Cl_2O_2^-$) bzw. Hypojodit ($I_2O_2^-$) um. Das Wasserstoffperoxid kann auch durch Reaktion mit Superoxid zu hochreaktiven Hydroxylgruppen (OH^\cdot) reagieren. Die hierbei entstandenen Sauerstoffradikale wirken bakterizid, indem sie ungesättigte Fettsäuren von Membranlipiden oxidieren, Membranproteine vernetzen und Enzyme der Bakterien inaktivieren [123].

Außerdem haben PMN die Fähigkeit Bakterien mittels sogenannter neutrophiler extrazellulärer Fallen (NETS, von engl. neutrophil extracellular traps), welche aus einer fibrillären Matrix aus bakteriziden Granulaproteinen und Chromatin bestehen, zu binden und abzutöten [134].

Des Weiteren erfolgt nach der Bindung von PAMPs an bestimmte PRR die aktive Aufnahme durch Phagozytose. Intrazellulär verschmelzen die Phagosomen mit den Granula der PMN. In diesen Granula sind verschiedenste bakterizide Stoffe enthalten, welche die Mikroorganismen abtöten und abbauen. So daunt das granuläre Lysozym die bakterielle Zellwand an während Laktoferrin freies Eisen bindet und somit bakterielle Nährstoffe entzieht. Nach der Phagozytose gehen die PMN zugrunde, ihre freigesetzten Enzyme bauen das umliegende Gewebe ab, sodass schließlich Eiter aus Geweberesten und abgestorbenen PMN entsteht [135].

1.5.3 Phorbol 12-Myristinsäure 13-Acetat

PMA (Phorbol 12-Myristinsäure 13-Acetat, auch Tetradecanoyl-Phorbolacetat (TPA) kommt natürlicherweise im sogenannten Crotonöl, welches aus den Samen von *Croton tiglium* L. und anderen Wolfsmilchgewächsen gewonnen wird, vor [136]. Der Phorboldiester (siehe Abbildung 19) ähnelt DAG (siehe Abbildung 20), welches im Organismus durch die PLC vermittelte Hydrolyse des Membranlipids PIP_2 entsteht (siehe Kap. 1.4.3). PMA aktiviert wie DAG als second messenger die PKC, welche zur Enzymfamilie der Proteinkinasen gehört und eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion besitzt. Sie überträgt Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen verschiedener Proteine und beeinflusst sie somit in deren Funktion. PMA aktiviert hierüber eine Vielzahl von Zellen wie PMN oder Thrombozyten. Als Aktivator der PKC wird PMA auch in der Krebsforschung als Tumorpromoter eingesetzt [137,138].

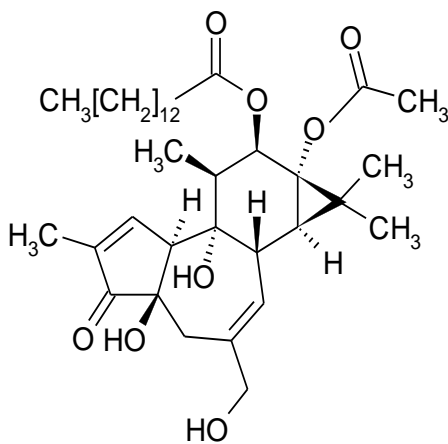


Abbildung 19 Struktur von PMA [137]

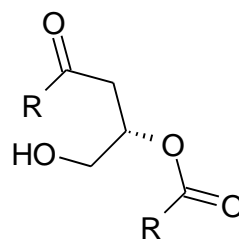


Abbildung 20 Struktur von DAG [139]

(R = Fettsäurereste Capryl, Oleyl, Palmityl, Arachidonyl, Stearyl)

1.6 Staphylococcus aureus

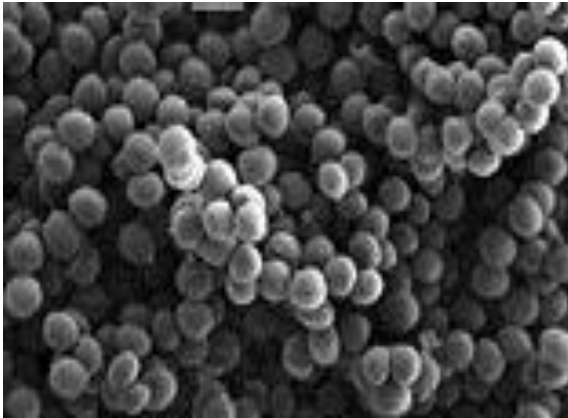


Abbildung 21 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Staphylococcus aureus* [140] (2000 x Vergrößerung)

Staphylococcus aureus ist ein grampositives, fakultativ anaerobes, kugelförmiges Bakterium. Die 0,5-1,5 μm großen Kokken sind in Haufen oder Trauben angeordnet (siehe Abbildung 21) und bilden goldgelbe, runde Kolonien. Der katalase-positive Erreger ist unbeweglich und bildet keine Sporen. Eine hohe pH-Toleranz und Widerstandsfähigkeit gegenüber Austrocknung machen das Bakterium vergleichsweise unempfindlich. *S. aureus* kommt nahezu ubiquitär vor. Auch auf der menschlichen Haut und besonders auf den Schleimhäuten der oberen Atemwege findet bei 15-40% der Menschen eine asymptomatische Besiedlung statt. Bei geschwächtem Immunsystem und vorhandener Eintrittspforte kann der Keim zu lokalen, eitrigen Infektionen der Haut und Weichteile bis hin zu lebensbedrohlichen invasiven Erkrankungen, wie Endokarditis und Sepsis führen. Die Inzidenz von *S. aureus* Bakteriämien stieg in den letzten Jahren in den USA und Europa dramatisch an. Besonders die sogenannten Multi- bzw. Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme sind gefürchtet. Diese sind gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika resistent und zählen zu den häufigsten Erregern von nosokomialen Infektionen [141,142].

Je nach Stamm bildet das Bakterium eine Vielzahl von Exotoxinen, die bestimmte Krankheitsbilder verursachen können. Zu den toxinbedingten Erkrankungen gehört das toxische Schock Syndrom (TSS), welches durch das als Superantigen wirkende toxische-Schock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1) verursacht wird. Des Weiteren kann es durch die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die mit den hitzestabilen Enterotoxinen des Keims kontaminiert sind, zu Lebensmittelvergiftungen kommen. Die exfoliativen Toxine A, B und C verursachen durch ihre Proteaseaktivität die sogenannte staphylogene toxische epidermale Nekrolyse (TEN, auch staphylococcal scalded skin syndrome oder Ritter-Erkrankung), welche mit einer intraepidermalen Blasenbildung der Haut, Rötung und Juckreiz einhergeht und oft bei Säuglingen und immunsupprimierten Patienten auftritt [143].

Die Pathogenität des Keims ist durch seine vielen Virulenzfaktoren, die in Stresssituationen noch hochreguliert werden können, sehr groß. So schützt das auf der Polysaccharidkapsel vorhandene Protein A das Bakterium, indem es Antikörper an deren Fc-Fragment bindet, vor der Opsonisierung und anschließender Phagozytose. Über fibronectinbindende Proteine kann *S. aureus* an Integrin $\alpha 5 \beta 1$ binden und somit rezeptorvermittelt in die Wirtszelle eindringen. Koagulase und Verklumpungsfaktor-A bewirken eine lokale Gerinnung von Fibrin, welches den Erreger umgibt und ihn vor dem Immunsystem schützt. Des Weiteren zerstören die bakteriellen Enzyme DNase, Hyaluronidase, Lipase sowie die exfoliativen Toxine und die Hämolyse (α -, β -, γ -, δ -Toxin) Bindegewebe und erleichtern damit ein invasives Vordringen des Keims in tiefere Gewebe. Zu den wichtigen Pathogenitätsfaktoren zählen auch Leukotoxine wie das Pantan-Valentin Leukozidin, welches Leukozyten durch Porenbildung schädigt. Auf Oberflächen wie geschädigter Haut oder Medizinprodukten bildet *S. aureus* einen Biofilm, der den Erreger vor dem Immunsystem und vor Antibiotika schützt. Alle diese pathogenen Mechanismen tragen dazu bei, dass *S. aureus* neben *E. coli* zu den häufigsten Erregern bakterieller Infektionen beim Menschen gehört [144,145].

1.6.1 α -Toxin von *Staphylococcus aureus*

α -Toxin, auch als α -Hämolysin bezeichnet, ist das am besten untersuchte Toxin von *S. aureus*. Das Toxin wird von den meisten *S. aureus*-Stämmen gebildet und als hydrophiles Exotoxin freigesetzt. Hauptangriffspunkt von α -Toxin ist die Lipiddoppelschicht von eukaryotischen Zellmembranen. Durch die Interaktion mit der Zellmembran verschiedenster Zelltypen bildet α -Toxin Poren von 1-2 nm Durchmesser innerhalb dieser aus. Diese Poren sind für die hämolytischen, dermonekrotischen, zyto- und neurotoxischen Eigenschaften des Toxins verantwortlich [146–148].

Die Bildung von α -Toxin geht eng mit der Pathogenität eines Stammes einher. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Mutanten, dessen α -Toxin codierendes Gen ausgeschaltet wurde, im Vergleich zu den Wildstämmen eine reduzierte Virulenz aufwiesen [149,150]. *Bubeck Wardenburg et al.* fanden heraus, dass die Expressionsrate von α -Toxin mit der Mortalität von *S. aureus* induzierter Pneumonie bei Mäusen korreliert. Eine passive Immunisierung der Mäuse mit anti- α -Toxin-Serum bestätigte diese Erkenntnis [151]. Auch *Menzies et al.* immunisierte Mäuse mit α -Toxin-Antiserum und stellte fest, dass diese anschließend vor sonst letalen α -Toxin Dosen und einem intraperitoneal (i.p.) verabreichten *S. aureus*-Stamm, der große Mengen an α -Toxin produzierte, geschützt waren [152].

α -Toxin wird von dem *hla*-Gen codiert. Die ersten 26 Aminosäuren des translationierten Polypeptids beinhalten eine Signalsequenz, die während der Sekretion abgespalten wird. Das fertige 33 kDa große Protein besteht schließlich aus 293 cysteinfreien Aminosäuren, die hauptsächlich in β -Faltblättern (65%) und wenigen α -Helices (10%) angeordnet sind [148].

Die Porenformation von α -Toxin verläuft über mehrere Schritte und ist noch nicht bis ins Detail geklärt (siehe Abbildung 22). Die von *S. aureus* abgesonderten wasserlöslichen Toxinmonomere binden zunächst unspezifisch an die Zellmembran. Während die membrangebundenen Monomere über mehrere Intermediate miteinander oligomerisieren, schiebt sich die porenbildende Domäne in die Lipiddoppelschicht. So entsteht schließlich eine 232,4 kDa große transmembranäre wassergefüllte Pore, welche aus sieben nicht kovalent miteinander verbundenen Monomeren besteht. Die Energie zur Porenbildung wird ATP (Adenosintriphosphat) -unabhängig über Konformationsänderungen während der Oligomerisierung der α -Toxin Moleküle gewonnen [10].

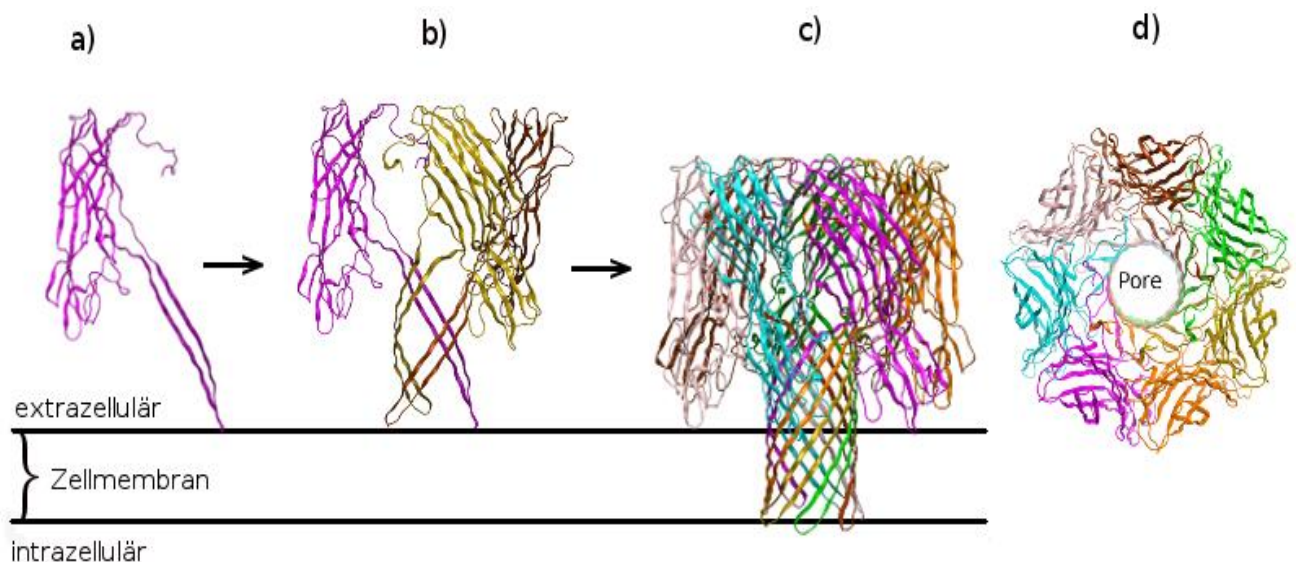


Abbildung 22 Schematische Darstellung der Porenformation von α -Toxin (modifiziert nach [10])

- α -Toxin Monomere adhäreren unspezifisch an die Zellmembran.
- Die membrangebundenen Monomere oligomerisieren miteinander. (hier am Beispiel von drei Monomeren dargestellt)
- Über mehrere Intermediate entsteht schließlich die heptamer α -Toxin-Pore. Die sieben nicht kovalent miteinander verbundenen Monomere sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. (nach PDB 7ahl)
- Blick von oben auf die α -Toxin Pore. (nach PDB 7ahl).

Während der Porenformation erfahren die hydrophilen α -Toxin Monomere eine beträchtliche Konformationsänderung, die ihnen erlaubt mit der amphiphilen Zellmembran zu interagieren. Die Außenseite der Pore wird von amphiphilen Aminosäuren gebildet, welche sich gut in die Lipiddoppelschicht integrieren. Die Innenseite der Pore ist mit polaren Aminosäuren ausgekleidet und somit hydrophil [153].

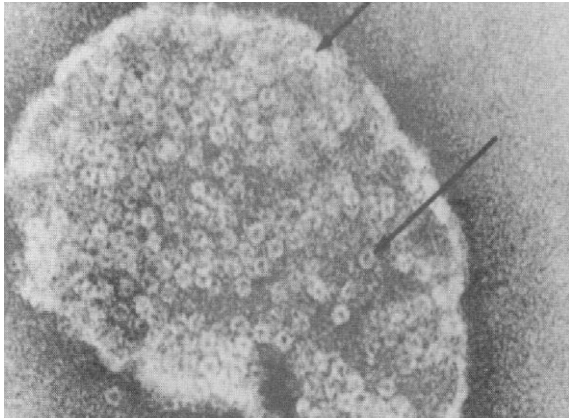


Abbildung 23 Negativkontrastfärbung von α -Toxin lysierten Kaninchen-Erythrozyten [154]

Abgebildet ist ein Fragment von α -Toxin lysierten Kaninchen Erythrozyten. Die Pfeile markieren beispielhaft einige der entstandenen α -Toxin Poren.

Das Zytolysin interagiert mit nahezu allen Säugetierzellen (siehe Abbildung 23). Dies jedoch in unterschiedlich starker Ausprägung. So lysiert α -Toxin Kaninchenerythrozyten in einer tausendfach niedrigeren Dosierung als humane Erythrozyten. Da diese Zellen so sensitiv auf das Toxin ansprechen wird vermutet, dass α -Toxin auf zwei Arten an die Zellmembran binden kann. In niedriger Dosierung (< 50 nM) soll das Exotoxin an einen spezifischen Rezeptor bzw. eine spezifische Bindungsstelle, dessen genaue Identität noch nicht geklärt ist, binden. In höheren Konzentrationen (> 200 nM) jedoch adhärirt das Toxin unspezifisch sowohl an Zellmembranen und proteinfreien Lipiddoppel- und Einzelschichten als auch an cholesterolfreie Membranen unter Bildung von Poren [147].

Obwohl α -Toxin immunogen wirkt und somit nahezu jeder Mensch Antikörper gegen das Toxin aufweist, konnten schon ab einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ α -Toxin pathophysiologische Effekte beobachtet werden. Die Zytotoxizität von α -Toxin perforierten Zellmembranen ergibt sich durch den Ausstrom von lebenswichtigen intrazellulären Ionen bzw. kleineren Molekülen (M_R 1000-4000). Hierdurch wird das intrazelluläre Milieu gestört und die Zelle kann ihre metabolischen Prozesse nicht mehr aufrechterhalten. Wenn die permeabilisierten Zellen einen hohen Gehalt an Makromolekülen aufweisen, wie es bei Erythrozyten der Fall ist, kommt es durch den Einstrom von Wasser über die Poren zur osmotischen Zellyse. Zellen mit einem niedrigeren Gehalt an Makromolekülen wie Thrombozyten, Endothelzellen und Monozyten schwellen lediglich an. Bei solchen Zellen können die transmembranären Poren pathophysiologisch bedeutende sekundäre zelluläre Effekte verursachen. Besonders der Einstrom von Calcium-Ionen, die aufgrund des hohen extra/-intrazellulären Konzentrationsgefälles schnell in die Zellen diffundieren, vermittelt vielfältige sekundäre Reaktionen. So aktiviert Calcium die Phospholipase C (PLC) in Thrombozyten (siehe auch Kap. 1.4.3), Leukozyten und Endothelzellen, die daraufhin potente Lipidmediatoren der Arachidonsäure-Kaskade, wie Prostaglandine und Leukotriene freisetzen. Grandel et al. fanden heraus, dass α -Toxin die kardiale Perfusion sowie die kontraktile Funktion durch Freisetzung von vasoaktiven Eicosanoiden an isolierten Rattenherzen erniedrigt [155]. Weiterhin kann es zum programmierten Zelltod durch die calciumabhängige Aktivierung von Endonukleasen kommen. Monozyten reagieren auf das Toxin unter Freisetzung von Zytokinen, wie IL- 1β [154]. Neben Monozyten und Endothelzellen reagieren Thrombozyten unter den humanen Zellen besonders sensitiv auf das Toxin. *Siegel und Cohen* entdeckten, dass die Applikation von α -Toxin im Konzentrationsbereich von $1-2,5 \mu\text{g/ml}$ zu plättchenreichem Plasma (PRP, von engl. platelet rich plasma) zu einer Aggregation und Degranulation der Thrombozyten führte. Auch konnte eine prokoagulatorische Wirkung von α -Toxin durch Aktivierung der thrombozytären Prothrombinase nachgewiesen werden. Dies bekräftigt die Aussage, dass die Toxizität von α -Toxin zu einem großen Teil durch dessen Wirkung auf Zellen der Hämostase bedingt ist [156].

1.7 Streptococcus pyogenes

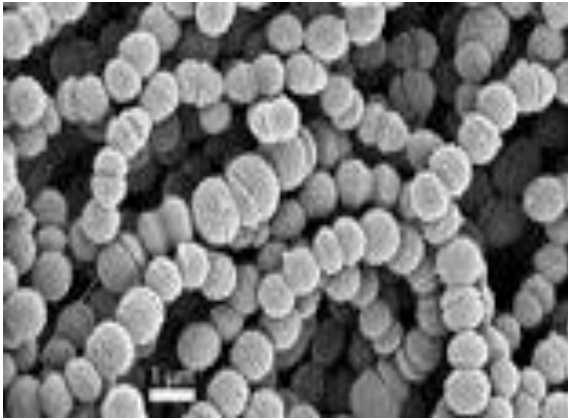


Abbildung 24 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Streptococcus pyogenes* [157] (2000 x Vergrößerung)

Streptococcus pyogenes ist ein grampositives, kettenbildendes fakultativ-anaerobes Bakterium (siehe Abbildung 24). Die rundlichen Zellen sind 0,6 bis 1 μm groß, bilden keine Sporen und können sich nicht aktiv bewegen. Hinsichtlich des Hämolyseverhaltens wird *S. pyogenes* zu den sogenannten β -hämolisierenden Streptokokken, welche zur vollständigen Erythrozytenlyse führen, gezählt. Nach dem Lancefield-Schema (nach Rebecca Lancefield 1895-1981), welches den Erreger aufgrund der antigenen Unterschiede des zellwandständigen C-Polysaccharids in einzelne Serogruppen (A-H/ K-V) unterteilt, gehört der Keim zur Gruppe der A-Streptokokken (GAS). Anhand des M-Proteins erfolgt die weitere Unterteilung in über 80 Serotypen [158].

S. pyogenes kommt weltweit vor und ist neben seinem natürlichen Vorkommen als Bestandteil der Hautflora auch ein typischer Schleimhautparasit. Bei 20% der Bevölkerung ist eine asymptomatische Besiedelung mit dem Keim nachweisbar. Der Mikroorganismus befällt nur den Menschen und wird durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. *S. pyogenes* besitzt viele Virulenzfaktoren, wie eine Kapsel aus Hyaluronsäure und das M-Protein, die den Erreger vor der Phagozytose von Immunzellen schützen. Das Bakterium bildet außerdem viele extrazelluläre Produkte, welche die Ausbreitung des Keims im Gewebe erleichtern und die systemische sowie lokale Toxizität bedingen. Dazu gehören Streptolysin-O (SLO) und Streptolysin-S (SLS), welche Zellen durch Zerstörung ihrer Zellwände lysieren können. Die Freisetzung von Proteasen, Hyaluronidasen, Streptokinasen und DNasen geht häufig mit einer Eiterbildung und Gewebeerstörung einher [159].

S. pyogenes ist häufigste Erreger von akuten eitrigen Haut- und Atemwegsinfektionen, kann aber auch gefährliche systemische Infekte, wie die Sepsis sowie schwerwiegende immunologische Spätfolgen, verursachen [160]. Typische lokale Infekte der Haut sind Impetigo contagiosa (ansteckende Borkenflechte, Pyodermie), das Erysipel, eine phlegmonöse Entzündung des Subkutangewebes und die nekrotisierende Faszitis (auch flesh eating disease), bei der oberflächliche und zum Teil tiefer gelegene Muskeln betroffen sind. Atemwegsinfekte treten häufig in Form einer Pharyngitis und Tonsillitis auf. Solche lokalen Infekte können nach Eindringen des Erregers in die Blutbahn und bei geschwächtem Immunsystem bis hin zur Sepsis generalisieren. Wird das Bakterium von einem Bakteriophagen infiziert, kann es mit dessen Virusgenom drei pyrogene Streptokokken-Exotoxine (PSE-A, -B, und -C) exprimieren. PSE-A und -C sind Superantigene, die eine Dysregulation des Immunsystems bewirken und das makulöse Exanthem beim Scharlach hervorrufen. Das Streptokokkeninduzierte toxische Schock-Syndrom (STSS) wird ebenfalls durch Toxine des Keims ausgelöst und weist durch Schock und Multiorganversagen eine Letalitätsrate von 30% auf. Auch die immunologischen Spätfolgen einer A-Streptokokken Infektion sind gefürchtet. Nach Hautinfektionen mit dem Erreger kann es zur akuten Glomerulonephritis kommen. Hierbei kommt es zur Schädigung der Niere durch Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen in den Glomeruli. Bei dem rheumatischen Fieber, welches Spätfolge einer Pharyngitis ist, kommt es durch eine Kreuzreaktion zwischen Antigenen der Streptokokken und körpereigenen Strukturen, besonders Kollagen IV, hauptsächlich zu Entzündungen am Herzen (Endo-

karditis, Myokarditis, Perikarditis), in den Gelenken (Arthritis), im Gehirn (Chorea minor) und in der Haut (Erythema). Hautinfektionen durch *S. pyogenes* und deren Folgeerkrankungen treten gehäuft saisonal in den Sommermonaten auf und werden von anderen Stämmen verursacht als Rachenentzündungen und das rheumatische Fieber, die eher in den Wintermonaten auftreten [161].

1.7.1 Streptolysin-O von *Streptococcus pyogenes*

Streptolysin-O ist eines der bedeutendsten Toxine von *S. pyogenes*. Das 65 kDa große Polypeptid wird von den meisten Streptokokken der Gruppe A freigesetzt. Es gehört zu den cholesterolbindenden Zytolysinen, besitzt eine starke hämolytische Aktivität und wirkt zytolytisch bzw. zytotoxisch auf eukaryotische Zellen. Die Aktivität von SLO wird als hämolytische Aktivität durch den Ausdruck Hämolytische Units pro Milliliter (HU/ml) quantifiziert. Definitionsgemäß lysiert eine HU 50% einer 2%igen Erythrozytensuspension in phosphatgepufferter Salzlösung nach 30 Minuten bei 37°C und einem pH von 7,4. Da das Exotoxin vergleichsweise große Poren in Zellmembranen ausbildet, wird es molekularbiologisch zur Zellperforation eingesetzt, um große Proteine, wie Immunglobuline oder Endonukleasen in Zellen zu schleusen oder das intrazelluläre Milieu zu beeinflussen [162].

SLO ist der Prototyp der thiolaktivierten porenformenden Zytolysine, auch sulfhydrylaktivierte Toxine genannt, welche durch Reduktionsmittel, wie den namensgebenden Thiolen, aktiviert werden. Zu dieser Gruppe gehören weitere 15 genetisch verwandte von grampositiven Keimen produzierte Toxine, die strukturelle sowie sequenzielle Homologien aufweisen, etwa das Tetanolysin, Listeriolysin O, Pneumolysin und Perfringolysin O [163].

Eine gemeinsame Eigenschaft der thiolaktivierten Zytolysine ist ihre Immunogenität. Nach einer Infektion mit SLO freisetzenden Stämmen können Antikörper gegen das Toxin (Anti-SLO) im Blut erfasst werden. Dieser Anti-SLO Titer kann zur Diagnose und Verlaufskontrolle einer Streptokokkeninfektion herangezogen werden. Des Weiteren kann SLO, wie alle thiolaktivierten Toxine, reversibel oxidiert bzw. reduziert werden. Für die biologische Wirksamkeit des Toxins ist die freie Thiolgruppe (SH-Gruppe) der Aminosäure Cystein, die sich in einem hochkonservierten Bereich im Molekül befindet, wichtig. Die biologische Aktivität sinkt durch Oxidation der im Protein enthaltenen Thiolgruppen zu Disulfidbrücken (S-S-Brücke) bei Exposition mit atmosphärischen Sauerstoff und anderen Oxidationsmitteln. Auf die Empfindlichkeit von SLO gegenüber Sauerstoff weist auch der vom Entdecker des Toxins Edgar William Todd im Jahre 1938 gewählte Namenszusatz „O“ hin. Durch das Einwirken von Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (DTT), Cystein, Schwefelwasserstoff oder 2-Mercaptoethanol werden die Disulfidbrücken im Protein wieder zu Thiolgruppen reduziert und SLO erreicht innerhalb kürzester Zeit seine maximale biologische Wirksamkeit zurück (siehe Abbildung 25) [164,165].

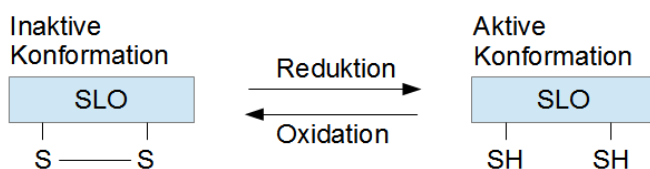


Abbildung 25 Schematische Darstellung der reversiblen Oxidation bzw. Reduktion von SLO [164]

Das biologisch aktive SLO enthält Thiol-Gruppen (SH). Durch Oxidation dieser Thiol-Gruppen bilden sich Disulfidbrücken (S-S), sodass SLO in seiner biologisch inaktiven Konformation vorliegt. Dieser Prozess lässt sich durch Zugabe von Reduktionsmitteln schnell umkehren.

Eine weitere gemeinsame Eigenschaft der thiolaktivierten Toxine ist die irreversible Hemmung ihrer zytolytischen und zytotoxischen Aktivität durch Hitzeeinwirkung oder Preinkubation mit winzigen Mengen an Cholesterol oder strukturverwandten Sterolen, welche eine 3β-OH-Gruppe und eine aliphatische Seitenkette am 17. Kohlenstoffatom aufweisen [166].

Die Porenformation von SLO ähnelt dem Mechanismus von α-Toxin. Jedoch bindet das wasserlösliche SLO-Monomer nur an cholesterolhaltige Zellmembranen. Dort oligomerisiert das Toxin spon-

tan zu amphiphilen, ringähnlichen Strukturen mit 50-80 Untereinheiten, welche in die apolare Lipiddoppelschicht penetrieren. Es entstehen transmembranäre, hydrophile Poren mit über 30 nm Durchmesser, die den Austausch von großen Ionen und Makromolekülen zulassen (siehe Abbildung 26). Der C-Terminus des einsträngigen Polypeptids ist für die Porenformation besonders wichtig. Dort befindet sich eine hochkonservierte Domäne aus hydrophoben Aminosäuren, welche dem Molekül seinen amphiphilen Charakter verleiht. In Untersuchungen zeigte sich, dass diese Domäne, im Gegensatz zum N-Terminus für die Membranbindung sowie die spezifische Aktivität des Toxins verantwortlich ist [10,167].

Da durch die großen von SLO verursachten Poren auch Makromoleküle die Zelle verlassen können, beruht die Erythrozytenlyse unter SLO-Zusatz im Gegensatz zur α -Toxin vermittelten Hämolyse nicht auf osmotischen Vorgängen, sondern wird durch den direkten Austritt von Hämoglobin aus den Poren verursacht. Die zytotoxischen Wirkungen von SLO auf eukaryotische Zellen können durch den Verlust lebensnotwendiger Moleküle über die SLO-Poren erklärt werden [168].

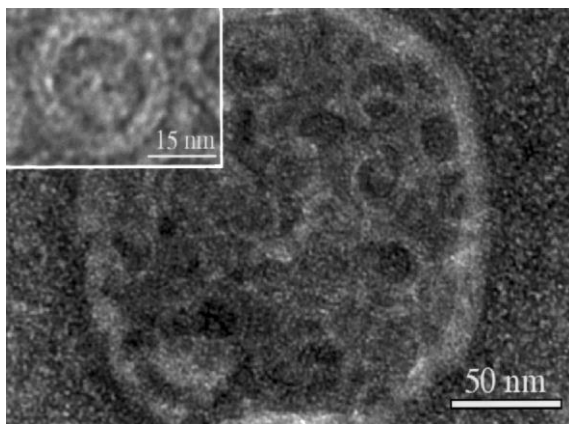


Abbildung 26 Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von SLO lysierten Thrombozytenmembranen [167]

Membranen von Thrombozyten wurden mit 12500 HU/ ml SLO inkubiert. Zur Kontrastierung wurden diese mit einer 1% wässrigen Uranyl-Acetat Lösung gefärbt. Zu sehen sind viele ringförmige SLO-Poren. Im eingefügten Fenster ist eine vergrößerte SLO-Pore dargestellt.

Die toxischen Effekte von SLO konnten auch in vielen Tierversuchen bewiesen werden. So führt die intravenöse Gabe des Hämolysins beim Kaninchen zu einer Kontraktion der Blutgefäße, einer erhöhten kapillaren Durchlässigkeit, massiven intravaskulären Thrombosen, dermatischen Nekrosen, zu Kardiotoxizität und schließlich zum Tod. Auch scheint das Toxin für die Virulenz des Keims eine nicht unbedeutende Rolle zu spielen. *Sierig et al.* berichteten, dass die Expression von SLO die bakterielle Virulenz in einem in vitro Maus-Modell nach einer invasiven GAS-Infektion erhöhte [169]. Auch *Lim-bago et al.* bemerkten, dass ein SLO-defizienter *S. pyogenes*-Stamm nach subkutaner Injektion bei Mäusen eine signifikant schwächere Wirkung zeigte, als der SLO-freisetzende Wildstamm [170]. Zu den wichtigsten Mechanismen der Virulenzhöhung durch SLO gehört die lokale Zerstörung von Gewebe sowie von dort befindlichen Immunzellen. Da das Bakterium an beschädigten Zellmembranen besser adhären kann, wird die Ausbreitung der Infektion durch SLO geschädigte Zellen noch begünstigt. Der Inhalt lysierter Zellen begünstigt eine weitere Inflammation des Gewebes, indem weitere Immunzellen wie PMN und Monozyten angelockt werden. Diese verstärken wiederum die Inflammation und zerstören Gewebe, wodurch der Keim noch weiter ins Gewebe vordringen kann [160]. Ein wichtiger Mechanismus SLO vermittelter Virulenz ist die Translokation von virulenzfördernden Substanzen. Hierbei werden durch die von SLO verursachten Poren zytotoxische Substanzen, wie die NAD-Glykohydrolase in die Wirtszelle geschleust und somit die Zytotoxizität erhöht [171]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass SLO sowohl die Phagozytose von Makrophagen inhibiert als auch die Produktion von TNF- α und IL-1 β von Monozyten stimuliert. Je nach Konzentration führt SLO zum Anschwellen und zur Degranulation von PMN bzw. zu deren Lyse. Auch die Chemotaxis von PMN ist unter SLO beeinträchtigt. Das Toxin ist weiterhin in der Lage den klassischen Weg der Komplementkaskade zu aktivieren [172]. Auch die vielfältigen sekundären Reaktionen der angegriffenen Zellen, welche Kurz- und Langzeiteffekte auf den Makroorganismus haben können, verstärken die Pathogenese der bakteriellen Infektion [10].

1.8 Escherichia coli



Abbildung 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Escherichia coli* [173]

Das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* wurde im Jahre 1885 von seinem Namensgeber, dem deutschen Kinderarzt, Theodor Escherich entdeckt. Mittlerweile ist der Keim eine der am besten untersuchten Lebensformen und das meistgenutzte Bakterium in der Molekularbiologie und Forschung [174]. *E. coli* zählt auch zu den häufigsten Erregern von humanen Infektionskrankheiten und nimmt einen wichtigen Stellenwert in der Medizin ein. So sind die uropathogenen *E. coli*-Stämme die häufigsten Erreger von Harnwegsinfekten. Neben *S. aureus* ist *E. coli* auch häufigster Erreger nosokomial erworbener Sepsen [175].

E. coli ist ein 2-6 µm langes fakultativ anaerobes, peritrich begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium aus der Familie der Enterobakterien (siehe Abbildung 27). Man unterscheidet im Wesentlichen drei Serotypen. 180 verschiedene O-Antigene sind als Oligosaccharidanteile von LPS auf der bakteriellen Oberfläche zu finden. Bei den circa. 80 K-Antigenen handelt es sich um Antigenstrukturen der Kapselsubstanz. Die 56 H-Antigene stellen Geißelproteine dar [176].

Die *E. coli* Stämme umfassen apathogene, fakultativ pathogene und obligat pathogene Erreger. Die apathogenen und fakultativ pathogenen Keime sind ein typischer Bestandteil der physiologischen Darmflora von Warmblütern. Liegt ein geschwächtes Immunsystem vor und gelangen fakultativ pathogene *E. coli* vom Darm oder von der Außenwelt in andere Körperregionen des Menschen, so können diese pathogen werden. Ein besonders wichtiger Pathogenitätsfaktor von fakultativ pathogenen Stämmen ist das LPS der bakteriellen Zellwand. LPS ist ein Endotoxin, welches bei extraintestinalen Infektionen eine Aktivierung des Komplementsystems, eine Verbrauchskoagulopathie und die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie TNF- α und IL-1 β zur Folge haben kann und somit eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Sepsis bzw. des septischen Schocks spielt. Auch *Pridmore et al.* bewiesen mit ihren Untersuchungen, dass LPS einen potenten Virulenzfaktor darstellt. So isolierten sie einen LPS-defizienten Bakterien-Stamm, der um den Faktor zehn weniger die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in humanen Makrophagen als der Wildstamm anregte [177].

Die obligat darmpathogenen Stämme werden in fünf Pathogruppen unterteilt, die sich im Erregerspektrum, ihrer Epidemiologie und ihren Pathomechanismen unterscheiden. Die Erreger werden durch unsauberes Trinkwasser sowie verunreinigte Lebensmittel übertragen und verursachen weltweit bis zu 160 Millionen Durchfallerkrankungen mit einer Million Todesfälle pro Jahr [178]. Die erste Gruppe, die Enteropathogenen *E. coli* heften sich mit Adhäsionsproteinen an Enterozyten. Ihre Toxine führen zu heftigen Durchfällen. Die Enterohämorrhagischen *E. coli* produzieren das von einer Phage codierte entero- und zytotoxische Shiga-Toxin. Dieses verursacht schwere Gastroenteritiden, hämorrhagische Kolitis sowie das hämolytisch-urämisches Syndrom. Die von Enterotoxischen *E. coli* freigesetzten Toxine sind der Hauptgrund für Reisedurchfälle. Enteroinvasive *E. coli* penetrieren in die Epithelzellen des Kolons und verursachen Entzündungen, Geschwüre sowie blutig-schleimige Durchfälle. Die letzte Gruppe, die enteroaggregativen *E. coli* setzen Enterotoxine frei, die sowohl akute, als auch chronisch rezidivierende Durchfälle mit Erbrechen und Fieber auslösen [179].

1.8.1 Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide sind ein wichtiger Hauptbestandteil der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien. Sie zählen zu den Endotoxinen und werden im Gegensatz zu bakteriellen Exotoxinen nur in geringen Mengen von den Erregern abgesondert. Der Hauptteil von LPS wird während der Desintegration des Bakteriums z.B. durch Autolyse, komplementvermittelt oder während der Phagozytose freigesetzt. Das amphiphile Glykolipid hat ein Molekulargewicht von circa 10 kDa und unterscheidet sich in seiner chemischen Zusammensetzung sowohl zwischen den Bakterienarten, als auch innerhalb der einzelnen Bakterienstämme. Im Tierversuch rufen injizierte gramnegative Erreger oder gereinigtes LPS vielfältige pathophysiologische Reaktionen von Fieber, DIC, Hypotension, Schock bis hin zum Tod hervor [180]. LPS aktiviert das Immunsystem unter Freisetzung inflammatorischer Substanzen und spielt eine zentrale Rolle als potenter mikrobieller Mediator in der Pathogenese der Sepsis und des septischen Schocks [181,182].

LPS ist aus drei miteinander verbundenen Teilbereichen aufgebaut (siehe Abbildung 28). Das hydrophobe Lipid A, welches die biologischen Effekte des Endotoxins vermittelt, ist in der äußeren Membran des Bakteriums verankert. Es ist hochkonserviert und unterscheidet sich nur anhand der zumeist sechs verschiedenen gesättigten Fettsäuren, welche an phosphorylierte Glucosamin-Disaccharide gebunden sind. An das Lipid A schließt sich die Kernregion an. Diese besteht im Wesentlichen aus den Zuckern 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO) und Heptose, an die gewöhnliche Zucker, wie Glucose, Galactose und N-Acetylglucosamin gebunden sind. KDO und Heptose sind mit negativ geladenen Molekülen, wie Pyrophosphat verknüpft, welche die negative Ladung des Endotoxins bedingen. Den anschließenden äußeren Bereich bildet das sogenannte O-Polysaccharid, dessen Zusammensetzung und Größe je nach Bakterienart stark variiert. Es dient der serologischen Identifizierung des Erregers und besteht aus einer Kette von 20-40 sich wiederholenden Saccharid-Einheiten, die oft verzweigt sind [183].

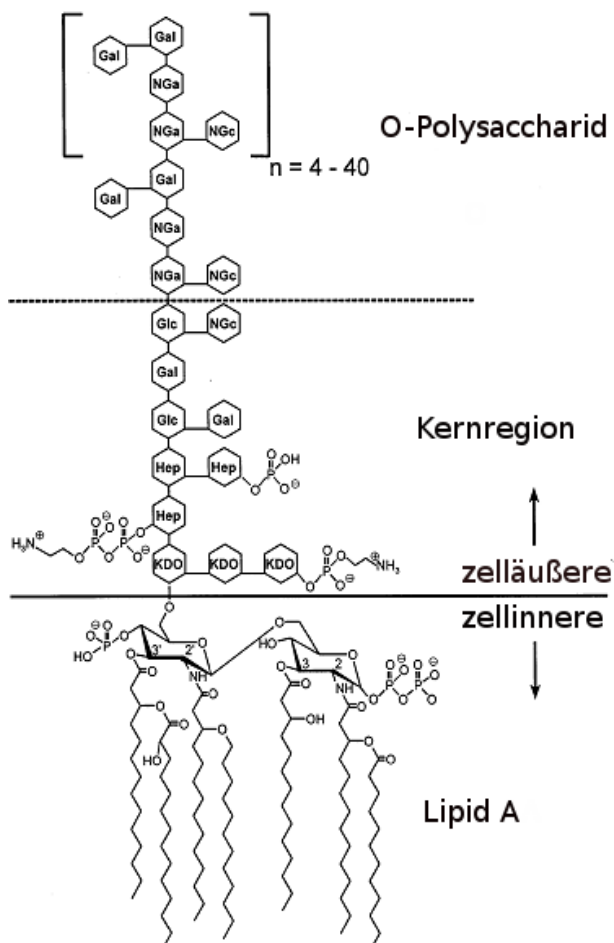


Abbildung 28 Struktur von E. coli O111:B4 LPS modifiziert nach [184]

LPS besteht aus drei Teilbereichen. Das hochkonservierte Lipid A, ist für die Endotoxin-Wirkung verantwortlich. Die darauffolgende Kernregion sorgt für die negative Ladung des Moleküls, welche viele biologische Eigenschaften von LPS beeinflusst. Der dritte äußere Bereich ist hochvariabel und dient zur Serotypisierung der Bakterien.

Hep = Heptose, Gal = Galaktose, Glc = Glucose, KDO = 2-Keto-3-desoxy-octonat, NGa = N-Acetylgalactosamin, NGc = N-acetylglucosamin

Gelangt LPS in die Blutbahn, so bindet es zunächst an das im Serum enthaltene Lipopolysaccharidbindende-Protein (LBP, auch Septin genannt) (siehe Abbildung 29). Dieses akut-Phase-Protein wird in Hepatozyten generiert und kontinuierlich in die Blutbahn abgegeben, wo es LPS mit einer hohen Affinität bindet und zu dem auf Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Endothelzellen und PMN membrangebundenen CD14-Rezeptor transferiert [185–188]. In vielen Studien konnte bewiesen werden, dass der LPS-LBP-Komplex eine viel höhere biologische Aktivität als das unkomplexierte LPS aufweist. So fand *Schuhmann et al.* beispielsweise, dass die TNF- α Expression in Kaninchen-Makrophagen um ein Vielfaches erhöht ist, wenn LPS im Komplex mit Septin vorliegt [189]. CD-14 vermittelt anschließend den Transport von LPS zu dem ebenfalls membranständigen Komplex aus TLR-4 und dem extrazellulären myeloiden Differenzierungsprotein 2 (MD2). Die Familie der TLRs gehört zu den leuzinreichen Rezeptoren und erkennt hochkonservierte mikrobielle Strukturen, wie LPS und Peptidoglykane und spielt somit eine wesentliche Rolle im angeborenen Immunsystem. Mittlerweile sind zehn verschiedene TLR-Rezeptoren bekannt, die jeweils unterschiedliche bakterielle Bestandteile erkennen. Die Signalwege aller TLRs gehen über den myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88, von engl. myeloid differentiation factor 88). Dies erklärt die ähnlichen klinischen Symptome einer durch grampositive bzw. negative Bakterien und Pilze verursachten Sepsis [190,191]. Nach der Bindung von LPS dimerisiert der Komplex mit einem weiteren TLR-4-Rezeptor. Daraufhin werden intrazelluläre Signalwege in Gang gesetzt. Über MyD88 und den Toll/ IL-1-Rezeptordomäne IFN-induzierenden Adaptor-Signalweg (TRIF, von engl. TIR (toll-Interleukin-1-Rezeptor) domain-containing adaptor protein inducing IFN- β) werden die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) sowie der interferonregulierende Faktor (IRF) aktiviert und zum Zellkern transloziert. Diese aktivieren dort die Genexpression von Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren, wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ und - β sowie PAF und NO. Neben dem CD14-MD2-TLR-4-Komplex bindet LPS auch an das Integrin CD11/CD18 auf Leukozyten und die sogenannten Scavenger-Rezeptoren (auch HDL-Rezeptoren, von engl. high-density lipoprotein). Die dadurch freigesetzten inflammatorischen Mediatoren tragen wesentlich zu der generalisierten Entzündung im Geschehen einer Sepsis bei [192].

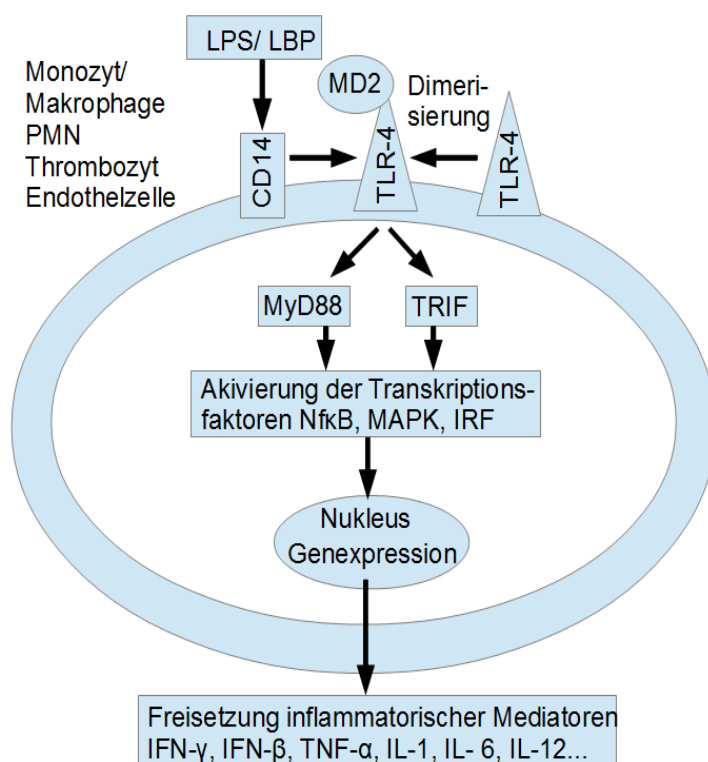


Abbildung 29 Schematische Darstellung der LPS-TLR-4 Signalkaskade (modifiziert nach [190,192])

Nachdem LPS in die Blutbahn gelangt, bindet es an das LBP. Dieses transferiert LPS zum membranständigen CD 14, welches LPS wiederum zum TLR-4-MD2-Komplex transportiert. Nach der Bindung von LPS dimerisiert der TLR-4 und setzt eine Signalkaskade in Gang, die über MyD88 und TRIF zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und schließlich zur Expression von inflammatorischen Substanzen führt.

1.9 Zielstellung

Die Sepsis gehört, trotz medizinischer Fortschritte, mit einer steigenden Inzidenz zu den weltweit häufigsten Todesursachen. Auch bei der infektiösen Endokarditis, die ein septisches Krankheitsbild aufweist, kann eine steigende Inzidenz beobachtet werden. *S. aureus* zählt mit Abstand zu dem häufigsten Erreger einer Sepsis bzw. Endokarditis. Auch die Keime *E. coli* und Keim *S. pyogenes* gelten als Verursacher dieser komplexen Krankheiten. Besonders die freigesetzten Toxine der Erreger vermitteln zahlreiche pathophysiologische Vorgänge im Zuge des septischen Prozesses, in dem die Aktivierung von Thrombozyten und PMN eine entscheidende Rolle einnimmt.

Um die bakteriell induzierte Aktivierung durch α -Toxin, SLO und LPS auf die Thrombozyten und PMN bzw. deren Interaktion miteinander zu bestimmen, sollten verschiedene Aktivierungsparameter untersucht werden. Die Hauptfunktion von Thrombozyten zu aggregieren sollte am Aggregometer sowie durch die Detektion des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa bestimmt werden. Auch die thrombozytäre Degranulation, die zur para- und autokrinen Aktivierung von Thrombozyten und anderer Zellen führt, sollte anhand der Expression des Granulaproteins P-Selektin untersucht werden. Die bakteriell induzierte Bildung von Mikropartikeln scheint ebenfalls eine Rolle im Pathomechanismus der Sepsis zu spielen und sollte näher betrachtet werden.

Neben ihrer Funktion in der Hämostase, Thrombose und Inflammation konnten in den letzten Jahrzehnten weitere Funktionen der Plättchen entdeckt werden. So sind die Thrombozyten in der Lage signalabhängig Proteine zu exprimieren. Diese de novo Proteinexpression unter Toxineinfluss sollte anhand des Proteins Bcl-3, dessen genaue Funktion noch unklar ist, bestimmt werden.

Die Aktivierung von PMN, die sowohl im Zuge einer Sepsis als auch bei einer Endokarditis vermehrt beobachtet wird, sollte durch Parameter, wie der CD11b Expression erfolgen. Die Bildung von PMN-Aggregaten ist ein Anzeichen für deren Aktivierung und sollte ebenso ermittelt werden. Die folgenden Fragestellungen dieser Arbeit sollten mit Aggregationsmessungen, Western Blot Analysen und anhand von durchflusszytometrischen Untersuchungen geklärt werden. Diese Arbeit soll somit dazu beitragen die pathophysiologischen Grundlagen zu verstehen und neue Ansätze für pharmakologische Interventionen zu entwickeln.

Aktivieren die bakteriellen Toxine humane Thrombozyten und neutrophile Granulozyten bzw. führen die Toxine zu einer synergistischen Verstärkung der Interaktion zwischen PMN und Plättchen?

Können die bakteriellen Exo- und Endotoxine eine Aggregation von PMN oder Plättchen induzieren?

Lässt sich die bakteriell induzierte Aggregation durch Substanzen, die auf unterschiedlichen Ebenen wirken, inhibieren?

Hemmen diese Inhibitoren die bakteriell induzierte Thrombozytenaggregation in ähnlicher Konzentration wie die physiologischen Agonisten?

Kommt es durch die Interaktion zwischen Toxin stimulierten Thrombozyten und PMN zu einer synergistischen Verstärkung der Aggregation?

Sind die bakteriellen Toxine in der Lage Thrombozyten bzw. PMN anderweitig zu aktivieren?

Führt die Interaktion von Thrombozyten und PMN zu einer synergistischen Aktivierung der Zellen?

Beeinflussen bakterielle Toxine die thrombozytäre Proteinexpression?

Können bakterielle Toxine die de novo Proteinsynthese von Bcl-3 in humanen Thrombozyten induzieren? Welchen Einfluss haben unterschiedliche Adhäsionsmatrices auf die Bcl-3 Expression?

Gibt es zeitliche und konzentrationsabhängige Einflüsse auf die Bcl-3 Expression? Wie wird die bakteriell induzierte Proteinsynthese reguliert?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Glasware

Tabelle 6 Folgende Geräte wurden verwendet:

Geräte	Hersteller
AGFA Snapscan 1236s (Scanner)	AGFA
APACT-4 (Aggregometer)	Rolf Greiner Biochemica
Axioskop 2 plus (Mikroskop)	Zeiss
Canon Power shot G6 (Kamera)	Canon
Electrophoresis Powersupply SE 600 15-1,5	Amersham Pharmacia Biotech
Eppendorf Reference Pipetten	Eppendorf
Eppendorf Zentrifuge 4517R	Eppendorf
FACSCalibur	Becton Dickinson
FBC 620 (Durchlaufkühler)	Fischerbrand
FI3100 (Laborwaage)	Fischerbrand
Heraeus Instruments-Inkubator B5060 EC-CO2	Heraeus
Hoefer SE 600 Dual Vertical Unit Complete (Gelkammer)	Amersham Pharmacia Biotech
LaminAir HBB 2472 (Sterilbank)	Heraeus Instruments
Micromat (Mikrowelle)	AEG
Millipore Direct Q3 UV (Wasseraufbereitungsanlage)	Millipore
MP 220 (pH-Meter)	Mettler-Toledo
Pipetus-standard (automatische Pipettierhilfe)	Hirschmann
Polymax 2040 (Linearschüttler)	Heidolph Instruments
Precisa 40SM-200A (Präzisionswaage)	PAG Oerlikon AG
Reax 2000 (Vortexer)	Heidolph Instruments
Rotina 48 RC (Zentrifuge)	Hettich
Spectralphotometer S.250	Secoman
Thermomixer 5437	Eppendorf
Vacupack plus (Folienschweißgerät)	Krups
Variomag (Magnetrührer)	Roth
Wasserbad	Julabo

Tabelle 7 Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Verbrauchsmaterialien	Artikelnummer	Hersteller
Amersham Hyperfilm™ ECL (Röntgenfilm)	28-9068-37	GE Healthcare
Butterfly-Blutentnahmesystem (21 G)	367287	Becton Dickinson
Cell Scraper	541070	Rolf Greiner Biochemica
Combi Stopper	4495101	Braun
Cryoröhrchen	E292.1	Roth
Einmal-Küvetten	759015	Plastibrand
Einweg-Pasteurpipetten (unsteril) 2 ml	EA61.1	Roth
6 ml	EA70.1	

ep T.I.P.S. [®] Pipettenspitzen	0,5-20 µl	0030000.854	Eppendorf
	2-200 µl	0030073.428	
	20-300 µl	0030073.444	
	50-1000µl	0030073.460	
Gefrier-Kochfolie		0278.1	Roth
Immobilon-P Transfer Membrane		IPVH00010	Millipore
Magnetrührstäbe für Apact Aggregometer		70186	Roth
Mikroküvetten für Apact-4 Aggregometer		90.000.0098	Haemochrom Diagnostika
Multi R-SafeSealR Tubes	1,5 ml	7080.1	Roth
	2 ml	7083.1	
Parafilm		PM-996	Pechiney
Pipetten	5 ml	356543	Becton Dickinson
	10 ml	356551	
	25 ml	356525	
Reaktionsgefäße 1,5 ml		30125150	Eppendorf
Proberöhrchen für Durchflusszytometrie		352052	Becton Dickinson Falcon
Rotilabo [®] -Reaktionsgefäße 1,5 ml		EA84.1	Roth
Schlinggazetupfer		3723288	Fuhrmann
Spritzen Luer Lock 5 ml		SS-05LE1	Terumo
Spritzen Luer Lock 20 ml		SS+20L1	Terumo
Sterican [®] Insulin (Kanüle) G 30x1/2 "		4656300	Braun
Sterican [®] zur Blutentnahme G 19x1,5"		4657799	Braun
BD Falcon [™] 24 Multiwell-Zellkulturplatten		734-0949	VWR
Zentrifugenröhrchen	15 ml	AN77.1	Roth
	50 ml	AN79.1	
Zentrifugenröhrchen 15 ml		N458.1	Roth
Zentrifugenröhrchen 8 ml mit Deckel		352027	Becton Dickinson Falcon

Tabelle 8 Folgende Glaswaren wurden verwendet:

Glaswaren	Hersteller
Bechergläser 250 ml, 500 ml, 10000 ml	Roth
Deckgläschen	Menzel Gläser
Exmire Microsyringe (Mikroliter-Pipette 10 µl, 20 µl, 50 µl)	Roth
Flaschen mit Schraubdeckel 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott
Glasauflaufformen	Pyrex/Schott
Glasplatten für Gelelektrophorese	GE Healthcare
Messzylinder 100 ml, 1000 ml, 2000 ml	Schott
Messbecher 500 ml, 1000 ml	Roth
Messkolben 1000 ml	Roth
Objektträger Superfrost Plus	Menzel Gläser
Rotilabo [®] -Gewindefläschchen ND8	Roth
Zählkammer improved nach Neubauer	Kühn und Bayer

Wasserqualität

Zur Herstellung von Lösungen und Reaktionsansätzen wurde destilliertes Wasser verwendet, welches bei Bedarf mit UV-Licht sterilisiert wurde. (Wasseraufbereitungsanlage: Millipore Direct Q3 UV, Millipore)

2.1.2 Chemikalien und eingesetzte Versuchssubstanzen

Tabelle 9 Folgende Reagenzien bzw. Puffer wurden verwendet:

Reagenzien bzw. Puffer	Artikelnummer	Hersteller
Aceton	5025.2	Roth
40% Acrylamide/ Bis Solution (29:1)	01708	Sigma Aldrich
ADP	05366	Rolf Greiner Biochemica
Albumin Standard	23209	Pierce
Amidoschwarz 10 B	N-3393	Sigma Aldrich
Ammoniumchlorid	A9434	Sigma Aldrich
Ammoniumpersulfat	161-0700	BioRad
Arachidonsäure	5364	Rolf Greiner Biochemica
Benzonase® 10 KU	1.01694.0001	Merck
CHAPS	1479.3	Roth
Citronensäure-Monohydrat	1.00242.0500	Merck
Complete Mini	11.836.153.001	Roche
Dinatriumhydrogenphosphat	1.05586.0500	Merck
Dulbecco's PBS (1x) ohne Calcium/Magnesium	H15-002	PAA
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	RPN 2209	Amersham
Epinephrin	5367	Rolf Greiner Biochemica
Essigsäure 100%	3738.1	Roth
Ethanol absolut	32205	Sigma Aldrich
Fibrinogen (from human plasma)	341576	Calbiochem
Glucose	G-7021	Sigma Aldrich
Glycin 99%	G8898	Sigma Aldrich
Harnstoff	A120.1	Roth
Hank's BSS (1x) mit Calcium/ Magnesium	H15-008	PAA
Isopropylalkohol	6752.3	Roth
Jurkat nuclear extract	sc-2132	Santa Cruz
Kaliumhydrogencarbonat	237205	Sigma Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	1.04873.1000	Merck
Kodak Fixer	P-6557	Kodak
Kodak processing Chemicals D-19 Developer	P-5670	Kodak
Kollagen (für Aggregometrie)	5368	Rolf Greiner Biochemica
Kollagen Typ I (from human placenta)	C7774	Sigma Aldrich
L-Cystein	C7352	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	T145.2	Roth
Methanol	32213	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	A3597	AppliChem
Natrium-EDTA	159294	Merck
Natriumhydroxid Plättchen	6771.1	Roth
Paraformaldehyd	0335.1	Roth
Phorbol-12-Myristinsäure-13-Acetat	P1585	Sigma Aldrich
Phosphorsäure 85%	9079.1	Roth
Polymorphprep™	1114683	Axis-Shield
Ponceau S-Lösung	P7170	Sigma Aldrich
Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	161-0304	BioRad
Prostaglandin E ₁	P5515	Sigma Aldrich
Puromycin Dihydrochlorid	P8833	Sigma Aldrich

Rapamycin	553210	Calbiochem
RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser)	A9041	Sigma Aldrich
Ristocetin	5199	Rolf Greiner Biochemica
Roti-® Load 1 (vierfach konzentriert)	K929.1	Roth
Salzsäure, rauchend 36%	4625.1	Roth
SDS Solution 10% (w/v)	161-0416	BioRad
SDS ultra pure Pulver	2326.3	Roth
Temed	161-0801	BioRad
Thioharnstoff	T-7875	Sigma Aldrich
Thrombin (from human plasma)	T6884	Sigma Aldrich
tri-Natriumzitat-Dihydrat	3580.1	Roth
Tris	4855.2	Roth
Trypanblau	T-0776	Sigma Aldrich
Tween 20	P-9419	Sigma Aldrich

Tabelle 10 Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Artikelnummer	Hersteller
CD11b-FITC (Mouse monoclonal IgG1 K)	01-0113	eBioscience
CD62P-PE (Mouse monoclonal IgG1 K)	12-0628	eBioscience
β-Aktin (C4) HRP-konjugiert	sc-47778	Santa Cruz
Bcl-3 (H-146) rabbit polyclonal	sc-13038	Santa Cruz
CD45-PE (Mouse monoclonal IgG2a)	ab1176	Abcam
CD42a-FITC (Mouse monoclonal IgG1)	ab30398	Abcam
CD42b-PE (Mouse monoclonal IgG1)	ab30402	Abcam
Goat anti Rabbit (HRP-konjugiert)	sc-2004	Santa Cruz
Mouse IgG2a-PE Isotype Control	ab74490	Abcam
Mouse IgG1-FITC Isotype Control	11-4714	eBioscience
Mouse IgG1-PE Isotype Control	12-4714	eBioscience
PAC-1-FITC (Mouse monoclonal IgMκ)	340507	Becton Dickinson

Tabelle 11 Folgende bakterielle Toxine wurden verwendet:

Toxine	Artikelnummer	Hersteller
α-Toxin (Hemolysin) von Staphylococcus aureus	H9395	Sigma Aldrich
LPS Escherichia coli Serotype O127:B8	L3129	Sigma Aldrich
LPS Salmonella enterica Serotyp abortus equi	L5886	Sigma Aldrich
Streptolysin-O (SLO) von Streptococcus pyogenes	S5265	Sigma Aldrich

Tabelle 12 Folgende Medikamente wurden verwendet:

Medikamente	PZN	Hersteller
Heparin-Natrium Braun 25.000 IE/ 5 ml	2540309	Braun
Human-Albumin 20% Behring, salzarm	51-52/2000	CSL Behring
Indocid PDA (Indometacin sodium trihydrate)	Import aus USA	Ovation (Merck)
Nipruss® (Nitroprussid-Natrium)	4746699	Schwarz Pharma
ReoPro® (Abciximab)	7123941	Lilly
Ventavis® (Iloprost)	4674942	Bayer Schering Pharma
Voltaren® Injekt	1977843	Novartis Pharma

2.2. Methoden

2.2.1 Isolierung humaner Thrombozyten aus Vollblut

Da bei den Western Blots, sowie bei den durchflusszytometrischen Messungen, nur thrombozytäre Proteine detektiert werden sollten, mussten die Thrombozyten gewaschen, also von den restlichen Bestandteilen des Blutes befreit werden. Um möglichst effizient qualitativ und quantitativ Thrombozyten aus humanem Vollblut zu isolieren, wurden zunächst verschiedene Protokolle getestet. Nach jeder der angewandten Isolationsprozeduren wurden die Thrombozyten mikroskopisch und durchflusszytometrisch auf ihren Aktivierungsstatus sowie ihre Ausbeute untersucht. Im Folgenden wird nun die Effizienteste der getesteten Methoden beschrieben (siehe

Abbildung 30).

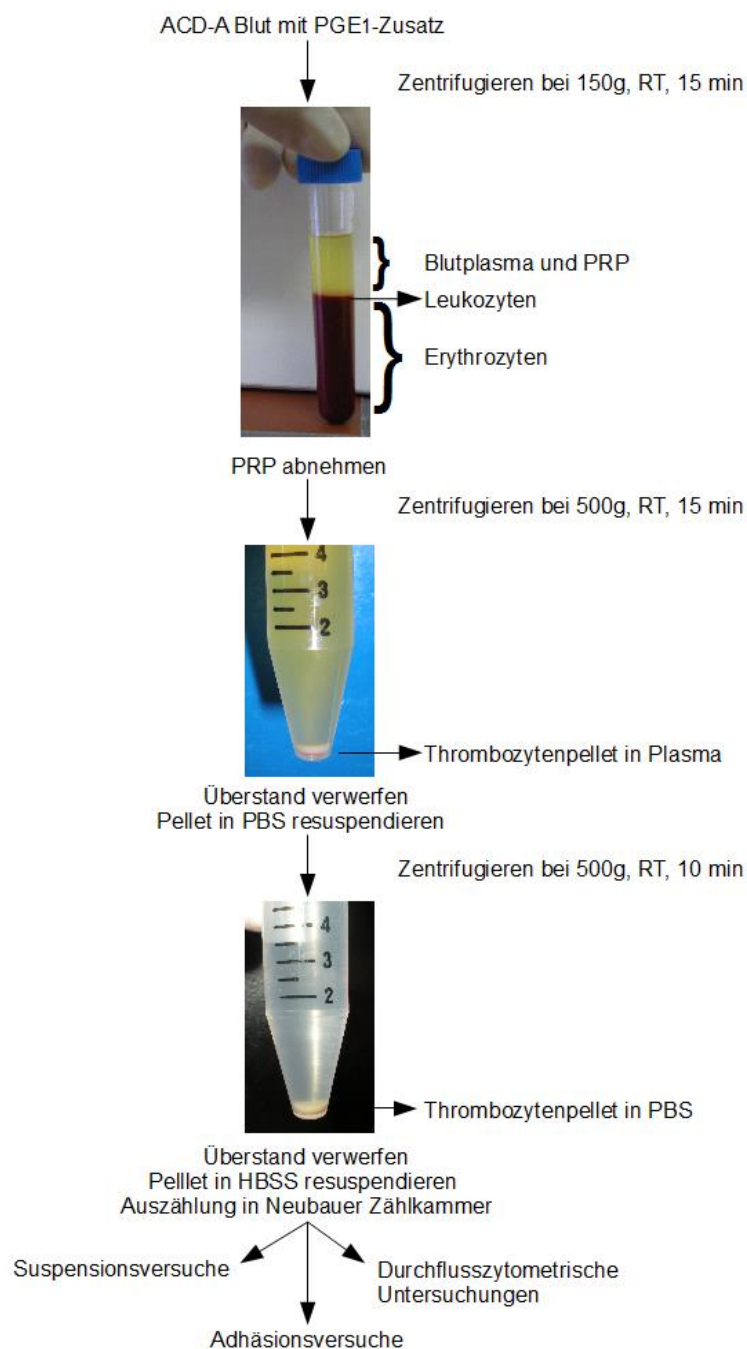


Abbildung 30 Schematische Darstellung der Isolation von Thrombozyten aus humanen Vollblut

Zur Isolierung von Blutplättchen aus humanen Vollblut wurden 80 ml Blut von gesunden männlichen Spendern mit Hilfe eines Butterfly-Abnahmesystems aus einer mittleren Vene der Ellenbeuge oder einer Vene des Handrückens entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Spender keine die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Medikamente, wie Acetylsalicylsäure oder andere Thrombozytenaggregationshemmer innerhalb der letzten zehn Tage bzw. nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR), Antihistaminika o.ä. innerhalb der letzten zwei Tage vor der Blutentnahme eingenommen hatten. Um eine frühzeitige Thrombozytenaktivierung zu verhindern, erfolgte die Blutentnahme nur bei Spendern in körperlicher Ruhe. Außerdem wurde das Blut bei einer leichten Stauung und unter Verwendung einer Butterfly-Nadel mit relativ großem Durchmesser (21 G) abgenommen, um den Scherstress auf die Thrombozyten und somit deren Aktivierung zu verringern. In diesem Sinne wurden die Blutplättchen möglichst zügig präpariert und keinerlei großen Erschütterungen oder Temperaturschwankungen ausgesetzt. Da Thrombozyten an negativ geladenen Oberflächen wie Glas aktiviert werden, wurden nur Materialien aus Kunststoff oder silikonisiertem Glas verwendet.

Zur Thrombozytenisolation wurde das Blut langsam in 20 ml-Spritzen, die mit jeweils 3 ml einer Zitronensäure-Natriumzitat-Glukose-Mischung (ACD-A, von engl. acid-citrate-dextrose-A, siehe Tabelle 13) und 0,25 µg/ml Prostaglandin E₁ (PGE₁, auch Alprostadil, siehe Tabelle 14) befüllt wurden, gezogen. Danach wurden die Spritzen sofort vorsichtig geschwenkt, um die vorgefüllten Lösungen besser zu verteilen. Anschließend wurden diese bis zur weiteren Verarbeitung mit Combi-Stoppfern verschlossen, um ein Austrocknen und Gerinnen des Blutes durch Luftsauerstoff zu verhindern.

Tabelle 13 Zusammensetzung der ACD-A-Lösung nach der United States Pharmacopeia (USP)

Bestandteil	Menge
Natriumcitratdihydrat	2,2 g
Zitronensäure	0,73 g
Glucose	2,45 g
Aqua dest. (UV-sterilisiert)	ad 100 ml
pH = 5, kühl bei 4°C aufbewahren	

Das in die Spritzen vorgefüllte ACD-A dient als Antikoagulant. Mit dem darin enthaltenen Citrat werden freie Calcium-Ionen durch Chelat-Bildung abgefangen und somit die Calcium-abhängige Gerinnung des Blutes verhindert. Eine Stabilisierung des pH-Wertes wird durch Zitronensäure erreicht. Diese sorgt nach Mischung mit dem Blut für einen pH-Wert im neutralen Bereich. Die im ACD-A befindliche Glucose stellt eine Energiequelle für die Thrombozyten dar. Aufgrund dieser Eigenschaften wird ACD-A speziell für die Herstellung von PRP verwendet [193]. PGE₁ ist ein Fettsäurederivat der Dihomogammalinolensäure (DGLA). Es wirkt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren als Gewebshormon vasodilatatorisch und hemmt die Thrombozytenaggregation. Letzteres wird genutzt, um eine Aktivierung der Thrombozyten während der Isolationsprozedur zu verhindern. Es wurde erst kurz vor der Blutabnahme zum ACD-A gegeben, da es leicht an Kunststoff adhärert und im Tageslicht instabil ist [194].

Tabelle 14 Zusammensetzung der PGE₁-Lösung

Bestandteil	Menge
PGE ₁	1 mg
Ethanol	ad 5 ml
Aliquotieren und bei -20°C lichtgeschützt in Glasgefäßen lagern	

Nach der Blutabnahme wurden jeweils 5 ml Blut in Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 150 g und Raumtemperatur für 15 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Dabei ordneten sich die Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten und durch die auf sie einwirkende Zentripetalkraft in kontinuierlichen Schichten an (siehe

Abbildung 30). Die oberste Schicht bestand aus nahezu zellfreiem Blutplasma. Diese ging kontinuierlich in das PRP, in dem sich ca. 75% der Thrombozyten des Blutes befinden, über [195]. Darunter war eine Schicht aus Leukozyten, der sogenannte *Buffy coat* zu sehen. In der untersten Schicht ordneten sich die Erythrozyten an.

Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das PRP mit einer Pipette entnommen. Dabei kann es häufig zur Verschmutzung durch die darunter angeordneten Leukozyten des *Buffy coats* kommen. Um die Leukozytenkontamination des PRP zu bestimmen wurde dieses am Durchflusszytometer untersucht. Im Durchschnitt wurden hierbei weniger als zwei Leukozyten pro 1.000 Thrombozyten detektiert, welches einer geringen Leukozytenkontamination entspricht.

Das abpipettierte PRP wurde nun in zwei 15 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei 500 g und Raumtemperatur für weitere 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das durch die erhöhte Zentripetalkraft entstandene Thrombozytenpellet in einer calcium- und magnesiumfreien, phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, von engl. phosphate-buffered saline) (siehe Tabelle 15) resuspendiert. Nach diesem Waschschrift erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 500 g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Erneut wurde der Überstand abgenommen und das Thrombozytenpellet im Versuchsmedium Hank's gepufferter Salzlösung (HBSS, von engl. Hank's Balanced Salt Solution) (siehe Tabelle 16) resuspendiert. HBSS ist wie Blut ein Puffer, es dient zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes während der Inkubationsversuche und sorgt mit seinen Salzen für eine Isotonie. Es enthält neben der physiologischen Konzentration an Calcium- und Magnesiumsalzen weitere wichtige anorganische Salze, die für eine Aktivierung der Thrombozyten und den Zellmetabolismus benötigt werden. Die enthaltene Glucose stellt die Energiequelle für die Blutplättchen während der Versuche dar.

Tabelle 15 Zusammensetzung von PBS

Bestandteil	Menge
Kaliumchlorid	0,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,2 g
Natriumchlorid	8 g
Dinatriumhydrogenphosphat	1,15 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tabelle 16 Zusammensetzung von HBSS

Bestandteil	Menge
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	0,18544 g
Kaliumchlorid	0,4 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,06 g
Magnesiumsulfat	0.09767 g
Natriumhydrogencarbonat	0,35 g
Natriumchlorid	8 g
Dinatriumhydrogenphosphat	0.04788 g
D-Glucose	1 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Nach dem Aufnehmen der Thrombozyten in das Versuchsmedium wurde die Thrombozytenzahl im Puffer mit Hilfe einer Neubauer improved Zählkammer (siehe Abbildung 31) bestimmt und auf einen durchschnittlichen physiologischen Wert von 250.000 Thrombozyten/ μ l HBSS eingestellt. Hierzu wurde ein Teil der Thrombozytensuspension entnommen und in einer 1:100 Verdünnung auf die Zählkammer aufgebracht. Unter dem Mikroskop wurden fünf Gruppenquadrate ausgezählt, der Mittelwert gebildet und die Thrombozytenzahl pro Mikroliter mittels folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert der Thrombozyten der fünf Gruppenquadrate} \times \text{Verdünnung}}{0,04} = \text{Plättchen}/\mu\text{l}$$

Die aufgereinigte Thrombozytensuspension konnte anschließend für die in den nächsten Kapiteln beschriebenen Suspensionsversuche, Adhäsionsversuche oder durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet werden. Die Translationsinhibitoren Puromycin und Rapamycin wurden dabei für eine halbe Stunde mit den Thrombozyten vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte der Zusatz der bakteriellen Toxine und die weitere Inkubation der Plättchen. Der Zusatz von Thrombozyteninhibitoren, wie Abciximab, Iloprost und NPN erfolgte zeitgleich mit den bakteriellen Toxinen.



Abbildung 31 Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer Zählkammer

Die mit Trypanblau gefärbte Zellsuspension wurde in die Zählkammer aufgebracht und anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.2 Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten aus Vollblut

Die Isolierung humaner neutrophiler Granulozyten mit PolymorphprepTM erzielte von den getesteten Methoden (Isolation mit Histopaque[®]1119 und Histopaque[®]1077, Dextranedimentation mit anschließender Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll[®]) die besten Ergebnisse im Hinblick auf die Ausbeute und Vitalität der Zellen. PolymorphprepTM ist eine viskose, sterile und endotoxinfreie Lösung, die aus 13,8% (w/v) Natriumdiatrizoat und 8% (w/v) Dextran 500 besteht. Wird Vollblut auf die PolymorphprepTM-Lösung geschichtet und zentrifugiert, bilden sich selbstständig drei kontinuierlich ineinander übergehende Schichten unterschiedlicher Dichte aus, in denen sich die Blutzellen entsprechend ihrer Dichte bandenförmig anordnen. Gute Trennergebnisse wurden mit heparinisiertem Vollblut erreicht. Die Verwendung von ACD-A Blut führte nicht zu der gewünschten Trennschärfe. Um eine vorzeitige Aktivierung der PMN zu verhindern erfolgte die Blutentnahme wie in Kapitel 2.2.1. beschrieben. Weiterhin wurde mit Materialien aus Kunststoff oder silikonisiertem Glas gearbeitet, da auch Leukozyten durch unbehandeltes Glas in hohem Maße aktiviert werden und an diesem adhären.

Für die Isolation (siehe Abbildung 32) wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen vorsichtig jeweils 5 ml heparinisierendes Vollblut (17,5 IE Heparin/ml Blut) auf 5 ml vorgelegtes PolymorphprepTM geschichtet und bei 600 g und Raumtemperatur für 35 Minuten zentrifugiert. Der sich nun ausbildende Dichtegradient ergab sich aus dem unterschiedlich hohen Wasserverlust der Erythrozyten in der hyperosmolaren PolymorphprepTM-Lösung. Aufgrund der auf sie einwirkenden Zentripetalkraft sinken Erythrozyten im Laufe der Zentrifugation in die PolymorphprepTM-Lösung ein bzw. stetig weiter hinab. Sobald die roten Blutkörperchen in die hyperosmolare Lösung gelangen, wird ihnen Wasser entzogen und sie verdünnen die sie umgebende Lösung signifikant. Es entsteht eine erste Gradientenschicht. Durch den erfolgten Wasserverlust ist die osmotische Differenz zwischen den Erythrozyten

und der tieferliegenden Lösung geringer, folglich verlieren sie weniger Wasser. Je tiefer die roten Blutkörperchen nun sinken, umso weniger stark verdünnen sie die umgebende Lösung. Auf diese Weise entsteht eine zweite Gradientenschicht.

In der untersten Zone der PolymorphprepTM-Lösung ist die osmotische Differenz geringer, sie wird am wenigsten verdünnt und bildet die dritte Gradientenschicht [196]. Nach der Zentrifugation lagen die Blutzellen ihrer Dichte entsprechend in drei Banden aufgetrennt vor (siehe Abbildung 32). Die oberste Bande bestand aus mononuklearen Zellen. Darauf folgte die Bande mit den PMN. In der untersten Schicht befanden sich die Erythrozyten.

Die PMN-Bande wurde anschließend in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abpipettiert und mit dem gleichen Anteil einer 0,45%igen Kochsalzlösung versetzt, um wieder isoosmotische Bedingungen zu erreichen und die PMN zu waschen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 500 g und Raumtemperatur für 10 Minuten. Um verbleibende Erythrozyten-Kontaminationen zu entfernen, wurde das PMN-Pellet nach Entfernen des Überstandes in 10 ml Ammoniumchlorid-Lysepuffer (siehe Tabelle 17) re-suspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln lysiert.

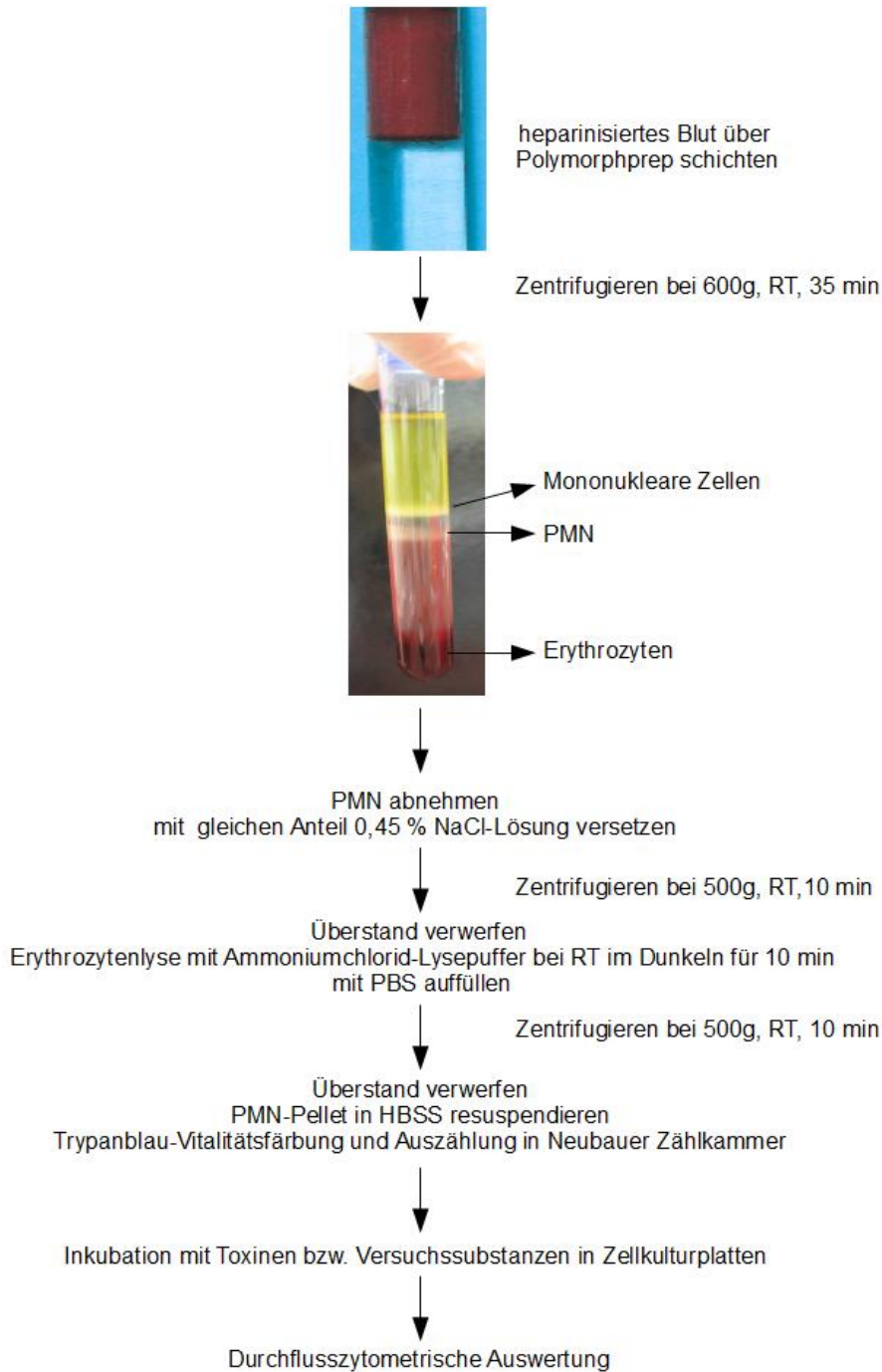


Abbildung 32 Schematische Darstellung der Isolation von PMN aus humanen Vollblut

Tabelle 17 Zusammensetzung des Ammoniumchlorid-Lysepuffers

Bestandteil	Menge
Ammoniumchlorid	0,829 g
Kaliumhydrogencarbonat	0,1 g
Natriumedetat	0,00372 g
Aqua dest. UV-sterilisiert	ad 100,0 g
pH-Wert auf 7,3 einstellen mit 1M NaOH, kühl bei 4°C aufbewahren	

Im Anschluss wurde das Zentrifugenröhrchen mit PBS aufgefüllt und erneut bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen, die PMN im Versuchsmedium HBSS resuspendiert und in der Neubauer improved Zählkammer ausgezählt, um eine physiologische Konzentration von 6000 PMN/ μ l einzustellen. Für die Auszählung wurden die Zellen 1:20 in Trypanblau-Lösung (siehe Tabelle 18) aufgenommen und die vitalen PMN in den vier großen Eckquadraten der Zählkammer ausgezählt. Die Berechnung der PMN-Anzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Mittelwert der vitalen PMN in den vier Eckquadraten} \times \text{Verdünnung}}{0,1} = \text{PMN}/\mu\text{l}$$

Tabelle 18 Zusammensetzung der Trypanblau-Lösung

Bestandteil	Menge
Trypanblau	0,14 g
PBS	ad 50 ml
gut schütteln, dann abfiltrieren und bei Raumtemperatur lagern	

Für die Zellzählung wurde Trypanblau eingesetzt. Aufgrund der hohen Zytotoxizität des Diazofarbstoffes musste die Zellzählung unmittelbar nach dessen Zugabe erfolgen. Trypanblau wird von abgestorbenen Zellen, deren Membran geschädigt ist, aufgenommen, färbt jedoch keine lebendigen PMN (siehe Abbildung 33). Mit dieser Färbemethode kann man somit überprüfen, ob die Isolation der PMN erfolgreich war und erfasst nur die vitalen, ungefärbten Zellen bei der Zellzählung [197]. Im Durchschnitt wurden hierbei 98% vitale PMN ausgezählt.

Nach der PMN-Isolation wurde die erhaltene Suspension für unterschiedlich lange Zeiträume mit den verschiedenen Toxinen oder anderen Versuchssubstanzen in Zellkulturplatten inkubiert und danach am Durchflusszytometer vermessen.

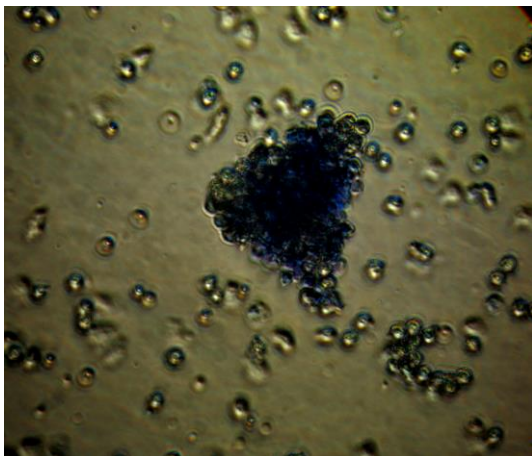


Abbildung 33 Trypanblau gefärbte PMN
Mittig angeordnet sieht man tote Trypanblau gefärbte aggregierte PMN. Das Aggregat ist z.T. von vitalen, nicht gefärbten Zellen umgeben. (400 x vergrößert)

2.2.3 Suspensionsversuche in Fibrinogen

Wie in den Kapiteln 1.4.3 und 1.4. näher erläutert, spielt das sowohl im Blut enthaltene als auch bei der Aktivierung von Thrombozyten aus deren α -Granula freigesetzte Fibrinogen für dessen weitere Aktivierung und Proteinexpression eine wichtige Rolle. Über das aktivierte Integrin α IIb β 3 können Thrombozyten an immobilisiertem Fibrinogen adhären bzw. über Fibrinogenbrücken untereinander aggregieren. Dabei wird ein Signal in die Plättchen geleitet (outside-in signaling), welches sie schließlich zur Expression von Proteinen befähigt. Aus diesem Grund wurde Fibrinogen, welches aus humanem Plasma gewonnen wurde, bei diesen Versuchen in physiologischer Konzentration zu den

gewaschenen Blutplättchen zugesetzt. Wie bei allen folgenden Versuchsreihen wurden die weiteren Umstände so gewählt, dass diese ebenfalls möglichst den physiologischen Bedingungen entsprechen. So wurden durch die Verwendung geeigneter Puffermedien isotonische und isoosmotische Verhältnisse, wie sie im Blut vorkommen, geschaffen. Die Inkubation der Thrombozyten mit den Versuchssubstanzen erfolgte entweder bei 37°C und 5%iger CO₂-Sättigung im Inkubator oder bei 37°C im Thermomixer unter leichtem Schwenken.

Für die Suspensionsversuche in Fibrinogen wurde zunächst eine Fibrinogen-Lösung hergestellt. Dafür wurde das Fibrinogen-Lyophilisat vorsichtig auf eine sterile 37°C warme 0,9%ige (m/V) Kochsalzlösung gegeben, so dass eine Endkonzentration von 1 mg/ml erhalten wurde. Anschließend wurde das Fibrinogen bei leichtem Schwenken für vier bis sechs Stunden im 37°C warmen Wasserbad gelöst. Die aufgereinigte Thrombozytensuspension (Präparation siehe Kap. 2.2.1) wurde dann zu je 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt und mit 100 µg/ml der Fibrinogen-Lösung versetzt. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße, je nach Versuchsprotokoll, mit den verschiedenen Toxinen bzw. Versuchssubstanzen versetzt und für den vorgesehenen Versuchszeitraum bei 37°C unter leichtem Schwenken im Thermomixer inkubiert. Danach erfolgte die Proteinextraktion (siehe Kap. 2.2.5).

2.2.4 Adhäsionsversuche mit Kollagen und Fibrinogen

Neben dem im Blut vorhandenen Fibrinogen spielt auch Kollagen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung (siehe Kap. 1.4.3 und 1.4.4) und Proteinexpression in Thrombozyten (siehe Kap. 1.4.6). An Kollagen adhärente Thrombozyten vermitteln ein Signal zur Proteinexpression über ihr Integrin $\alpha_2\beta_1$. Kollagen befindet sich allerdings nicht wie Fibrinogen im Blut, sondern wird erst bei einer verletzten Gefäßwand freigelegt. Das Strukturprotein besteht aus drei Polypeptidketten, die in einer Tripelhelix angeordnet sind [198]. Wenn Thrombozyten das subendotheliale Kollagen über ihre Kollagenrezeptoren GPVI und GPIIb/IIIa binden, kommt es zu deren Aktivierung und zur Adhäsion an dem verletzten Gefäß. Um diese pathophysiologischen Umstände der Thrombozytenadhäsion zu imitieren, wurden Zellkulturplatten mit Kollagen vom Typ I beschichtet. An diesem Kollagen konnten nun die gewaschenen Thrombozyten unter Einfluss der bakteriellen Toxine oder anderer Versuchssubstanzen, ähnlich wie an einer verletzten Gefäßwand, adhären. Obwohl Fibrinogen kein Bestandteil der Gefäßwand ist, lagert es sich an diese an. Um diesen Zustand nachzuahmen wurden auch Versuche mit Fibrinogen beschichteten Zellkulturplatten durchgeführt.

Für die Adhäsionsversuche mit Kollagen wurde zunächst eine Kollagen-Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml hergestellt. Dazu wurde Kollagen in 0,5%iger Essigsäurelösung (pH = 3) gelöst, aliquotiert und bei 4°C gelagert. Die Aliquots wurden am Tag des Versuches mit 0,5%iger Essigsäurelösung weiter verdünnt, bis eine Endkonzentration von 50 µg/ml erreicht wurde. Für die Adhäsionsversuche wurden entweder am Tag zuvor 6-Loch-Zellkulturplatten unter der Sterilbank mit je 1 ml dieser Kollagen-Lösung (50 µg/ml) versehen und über Nacht im Kühlschrank beschichtet oder die Kulturplatten wurden am selben Tag des Versuches mit je 1 ml der Kollagen-Lösung versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurde die überschüssige Kollagen-Lösung vorsichtig abgesaugt und die 6-Loch-Platten mit je 1 ml einer 1%igen humanen Serum Albumin (HSA)-Lösung befüllt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach vier Stunden Inkubationszeit bei 37°C wurde die HSA-Lösung verworfen und die Zellkulturplatten drei Mal mit PBS gespült. Nun konnten die Zellkulturplatten für die jeweiligen Versuchszeiträume mit 1 ml der aufgereinigten Thrombozytensuspension (Präparation siehe Kap. 2.2.1) und den Toxinen bzw. anderen Versuchssubstanzen befüllt und bei 37°C und 5%iger CO₂-Sättigung inkubiert werden. Anschließend wurde die Thrombozytensuspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt bzw. adhären Plättchen durch Abkratzen und wiederholtes Spülen der Zellkulturplatten mit PBS gewonnen.

Für die Adhäsionsversuche mit Fibrinogen wurden entweder am Tag zuvor 6-Loch-Zellkulturplatten mit je 1 ml der Fibrinogen-Lösung (1 mg/ml) versehen und über Nacht im Kühlschrank beschichtet oder die Zellkulturplatten wurden am selben Tag mit je 1 ml Fibrinogen-Lösung versetzt und eine

Stunde bei 37°C inkubiert. Die nächsten Schritte entsprechen denen der Versuchsreihe mit adhären-ten Kollagen (siehe Kap. 2.2.4). Im Anschluss an die Adhäsionsversuche erfolgte die Proteinextraktion für die Western Blot-Analysen (siehe Kap. 2.2.5).

2.2.5 Proteinextraktion aus Thrombozyten

Um intrazelluläre Proteine mittels Western Blot erfassen zu können, wurden die Thrombozyten ly-siert. Hierzu wurde die Thrombozytensuspensionen nach deren Inkubation mit den bakteriellen Toxi-nen bzw. anderen Versuchssubstanzen für zwei Minuten bei 4°C und 20800g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Thrombozytenpellet mit PBS gewaschen. Es folgte ein wei-terer Zentrifugationsschritt für zwei Minuten bei 4°C und 20800g. Nach dem Verwerfen des Über-standes wurde das Thrombozytenpellet mit 100 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 19) sowie 100U/ml Ben-zonase versetzt, gut durchgemischt für eine Stunde bei 4°C lysiert.

Tabelle 19 Zusammensetzung des Lysepuffers zur Proteinextraktion aus Thrombozyten

Bestandteil	Menge
Harnstoff	17 g
Thioharnstoff	6,1 g
CHAPS	1,6 g
Tris	0,194 g
Complete mini®	4 Tabletten
Aqua dest. (UV-sterilisiert)	ad 40 ml
aliquotieren und bei -20°C lagern	

Das im Lysepuffer enthaltene zwitterionische Tensid CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat) dient der Zerstörung der Lipidbiomembran der Plättchen und setzt somit die intrazellulären Proteine dieser frei. Harnstoff dient der besseren Solubilisierung des Thio-harnstoffs und denaturiert die thrombozytären Proteine durch Zerstörung von Wasserstoffbrücken-bindungen. Da Harnstoff nicht in der Lage ist alle Proteine, wie etwa integrale Membranproteine zu denaturieren, wurde zusätzlich das aggressivere Denaturierungsmittel Thioharnstoff eingesetzt [199]. Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, auch Tromethamin oder Trometamol) wird hierbei als Puf-fersubstanz verwendet. Es besitzt eine gute Pufferkapazität zwischen pH 7,2 – 9. Complete mini® ist eine Mischung von Protease-und Phosphataseinhibitoren, welche die Proteine in den Proben vor deren Degradation durch zelleigene Enzyme schützen. Die zugesetzte Benzonase dient schließlich dem DNA-Abbau. Das Enzym entfernt die störende, hochviskose DNA der Thrombozyten.

Nach der Thrombozytenlyse erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für eine Stunde bei 4°C und 20800g. Danach wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Im Anschluss wurden die Proteine der Proben, wie folgend beschrieben, nach Popov quantifiziert.

2.2.6 Proteinbestimmung nach Popov

Auf ein analytisches Gel wurden jeweils 100 µg Protein von jeder Probe aufgetragen. Die erforderliche Quantifizierung der Proteinmenge der einzelnen Proben erfolgte nach Popov. Diese Methode beruht auf der Ausfällung von Proteinen als unlösliche Farbstoffkomplexe mit saurer, methanolischer Amidoschwarz 10 B-Lösung.

Tabelle 20 Übersicht über die verwendeten Lösungen für die Proteinquantifizierung nach Popov

Lösung I	0,65 g Amidoschwarz 10 B in 50 ml Lösung II
Lösung II	30 ml Eisessig in 450 ml Methanol
Lösung III	Lösung I mit Lösung II 1:10 verdünnen

Für die Bestimmung wurden drei Lösungen angesetzt (siehe Tabelle 20). Für jede neu angesetzte Lösung I wurde eine Eichkurve erstellt. Dazu wurde eine bovine Serum Albumin (BSA)-Stammlösung (2 mg/ml) mit Aqua dest. auf 100-, 250-, 500-, 1000- und 1500 µg/ml verdünnt. Diese Verdünnungen wurden weiterhin wie die Proben behandelt. 200 µl der Verdünnungen für die Eichkurve bzw. der im Verhältnis 1:20 mit Aqua dest. verdünnten Proben wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Durch den Zusatz von 600 µl Lösung III wurde ein Komplex aus Protein und Amidoschwarz ausgefällt (siehe Abbildung 34).

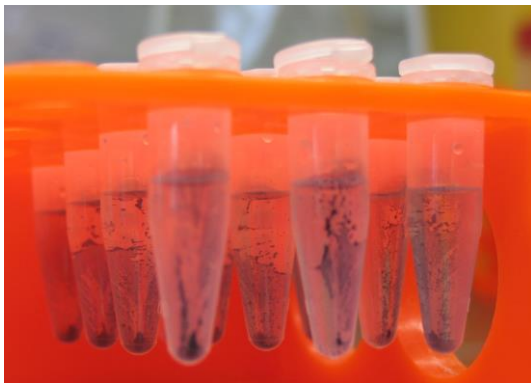


Abbildung 34 Ausgefällter Amidoschwarz-Protein-Komplex

Im sauer, methanolischen Milieu bildet Amidoschwarz 10 B mit Proteinen blau gefärbte unlösliche Komplexe. Nach Lösen der Komplexe in 0,1 M Natronlauge kann der Proteingehalt UV-spektroskopisch bestimmt werden.

Die Proben wurden anschließend bei 4°C für 5 min und 20800g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig drei Mal mit 750 µl Lösung II gespült. Ein zweiter Zentrifugationsschritt bei 4°C für 5 min bei 20800g folgte. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde der Komplex in 0,1 M Natronlauge gelöst. Es entstand eine, je nach Proteingehalt, mehr oder weniger intensiv blau gefärbte Lösung. Diese wurde in Halbmikroküvetten gefüllt und UV-spektroskopisch bei 620 nm vermessen. Die Eichgerade wurde aus den Absorptionswerten der Eichproben bestimmt und die Konzentration der Proben durch Extrapolation derselbigen gewonnen.

2.2.7 Grundlagen des Western Blot

Einen Überblick über die allgemeinen Abläufe beim Western Blot anhand der Detektion von Bcl-3 gibt Abbildung 35.

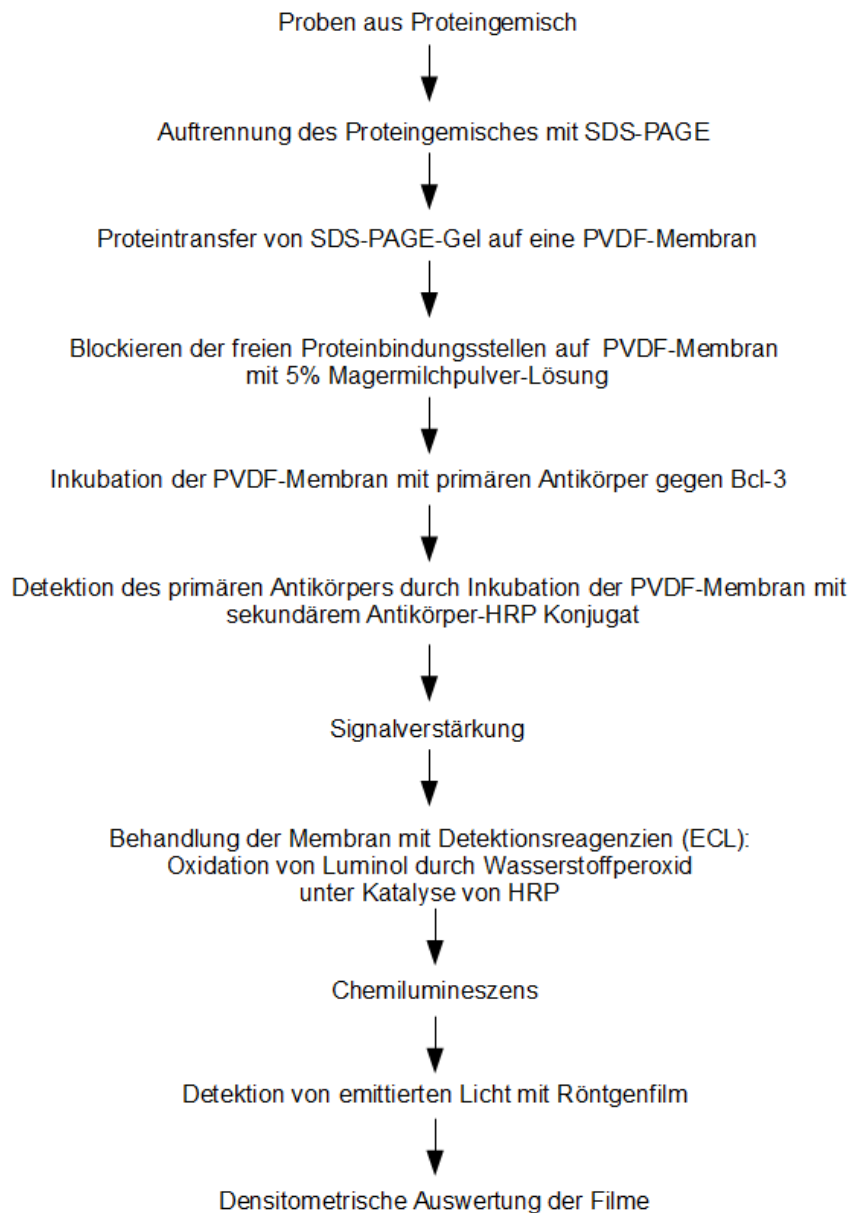


Abbildung 35 Schematische Darstellung der Abläufe beim Bcl-3 Western Blot

2.2.7.1 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Vor dem eigentlichen Western Blot wurde das Proteingemisch der Proben durch eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, von engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) nach Laemmli (1970) aufgetrennt [200,201]. Dieses Verfahren wird speziell für die Auftrennung von Proteingemischen mit einem Molekulargewicht von 5 bis 2000 kDa angewendet. Hierbei wandern die Proteine, die durch Komplexbildung mit dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, auch Natriumlaurylsulfat, von engl. sodium dodecyl sulfate) eine negative Ladung erhalten, entlang eines elektrischen Feldes zunächst durch ein Sammelgel, in dem sie aufkonzentriert werden. Im darauffolgenden Trenngel werden die Proteine auf dem Weg zur Anode ihrer Größe nach aufgetrennt

Für die SDS-PAGE wurden zunächst zwei 140 mm x 140 mm x 1 mm große 9%ige Polyacrylamid-Trenngele (siehe Tabelle 21 bzw. Tabelle 22) angesetzt. Hierbei wurde beachtet, dass Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (Temed) zeitgleich zuletzt zur Mischung zugegeben wurden und danach ein sofortiges Mischen der Lösung erfolgte, um ein gleichmäßig polymerisiertes Gel zu erhalten.

Tabelle 21 Zusammensetzung von zwei 9%igen Polyacrylamid-Trenngelen (140 mm x 140 mm x 1 mm)

Bestandteil	Menge
40% Acrylamid/ Bis (29:1)	13,5 ml
Trenngelpuffer	5,62 ml
10% SDS	450 µl
Aqua dest.	23,25 ml
Temed	22,5 µl
15% APS	2,25 ml
Temed und APS zeitgleich am Ende zugeben, gut mischen und zügig in Gelkammern gießen	

Tabelle 22 Zusammensetzung des Trenngelpuffers

Bestandteil	Menge
Tris	363 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH-Wert auf 8,8 einstellen	

Das Polyacrylamid-Gel entsteht durch die Polymerisation von flüssigem Acrylamid. APS initiiert als starker Radikalbildner diese Polymerisations-Kettenreaktion. Temed wird als Katalysator eingesetzt. Die Porengröße und damit der Trennbereich der Gele hängt von der Acrylamid-Konzentration und dem Vernetzungsgrad mit N,N'-Methylen-Bisacrylamid (Bis) ab.

Nachdem die Gelglasplatten sorgfältig gereinigt und zusammengesetzt wurden, erfolgte die Befüllung der Kammern mit der Trenngelmischung. Die Mischung wurde bis ca. 0,5 cm unterhalb der Gelkammeröffnung gefüllt. Während der Befüllung wurde darauf geachtet, dass die Gelkammern möglichst schnell und mit einem Mal mit der Trenngelmischung versehen wurden, um ebenfalls eine ungleichmäßige Polymerisation zu verhindern. Danach wurden die Gele zügig mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Geloberfläche zu erhalten. Die Trenngele wurden anschließend für eine halbe Stunde erschütterungsfrei bei Raumtemperatur gelagert. Während dieser Zeit erfolgte die Polymerisationsreaktion. Danach wurde der Alkohol mit Filterpapier entfernt und die Geloberfläche mit Aqua dest. gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Geloberfläche erneut mit Aqua dest. versehen, um ein Austrocknen der Geloberfläche zu verhindern.

Anschließend wurde die Mischung für das Sammelgel (siehe Tabelle 23 bzw. Tabelle 24) zubereitet. Auch hier erfolgte die Zugabe von Temed und APS zeitgleich am Ende des Mischprozesses. Das Sammelgel wurde ebenfalls zügig auf das Trenngel, welches vorher vom Aqua dest. befreit worden war, gegeben. Schnell wurden die Gelkämme, die die späteren Probestaschen formen, eingesetzt. Im Anschluss wurden die Gele für eine dreiviertel Stunde zum Auspolymerisieren bei Raumtemperatur erschütterungsfrei aufbewahrt.

Tabelle 23 Zusammensetzung von zwei Sammelgelen

Bestandteil	Menge
40% Acrylamid/ Bis (29:1)	2,5 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
10% SDS	200 µl
Aqua dest.	11,3 ml
Temed	15 µl
15% APS	1 ml
Temed und APS zeitgleich am Ende zugeben, gut mischen und zügig in Gelkammern gießen	

Tabelle 24 Zusammensetzung des Sammelgelpuffers

Bestandteil	Menge
Tris	60 g
Aqua. dest.	ad 1000 ml
pH-Wert auf 6,8 einstellen	

Während das Sammelgel auspolymerisierte, erfolgte die Vorbereitung der Proben. Die mittels Popov ermittelten Probenmengen wurden zu einem Drittel mit Roti®-Load 1 versetzt und bei 95°C für 5 min im Thermomixer denaturiert.

Roti®-Load 1 ist ein nach Laemmli modifizierter reduzierender Proteinauftragspuffer. Das Phosphatpuffersystem hält den pH-Wert der Proben über einen weiten Temperaturbereich während der Probenvorbereitung konstant. Das im Probenpuffer enthaltene SDS sorgt im Überschuss zugesetzt mit dem Erhitzen der Proben und dem ebenfalls enthaltenen β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken durch Reduktion zu Thiolen spaltet, für eine Denaturierung der enthaltenen Proteine.

Während der Denaturierung werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zerstört, wodurch diese aufgefaltet werden und SDS proportional zu ihrer Länge adsorbieren. Die negativen Sulfatgruppen von SDS stoßen sich gegenseitig ab, was die Proteinlinearisierung weiterhin fördert. Durch die Komplexbildung mit SDS erhalten alle Proteine eine konstant negative Ladung, die Eigenladung der Proteine kann vernachlässigt werden. Entsprechend ihrer Kettenlänge, welche der Molekülmasse proportional ist, wandern die negativ geladenen Proteine nun unterschiedlich schnell durch die poröse Gelmatrix zur positiven Anode. Dadurch werden sie aufgetrennt und ordnen sich bandenförmig an. Jede Bande stellt dabei Proteine derselben Molekülmasse dar. Kleine Moleküle wandern am schnellsten durch die siebartigen Poren des Polyacrylamidgels, sie befinden sich somit am unteren Gelende. Große Proteine werden durch das Gel zurückgehalten und wandern langsamer, sie ordnen sich im oberen Gelbereich an. Im Proteinauftragspuffer sind des Weiteren der Farbstoff Bromphenolblau sowie Glycerol enthalten. Bromphenolblau wandert aufgrund seiner geringen Molekülgröße schnell durch das Gel, läuft somit vor der Proteinfrent und macht so die Lauffront des Gelendes sichtbar. Glycerol dient als Beschwerungsmittel bei der Probenauftragung.

Bei dem diskontinuierlichen Verfahren nach Laemmli werden die Proben nicht direkt in das Trenngel, sondern in ein zusätzliches zweites aufpolymerisiertes Sammelgel gegeben. Dadurch erhält man schärfere Proteinbanden und kann größere Probenvolumina auftragen. Das Sammelgel unterscheidet sich in Hinblick auf die Ionenstärke, den pH-Wert und die Porengröße von dem Trenngel. Während die Proteine im neutralen, weitporigen Sammelgel zur Anode wandern, werden sie zwischen den Chloridionen von Tris-HCl und dem Glycin, die im Proteinauftragspuffer enthalten sind, aufkonzentriert. Die SDS Protein-Komplexe haben eine mittlere elektrophoretische Mobilität und wandern als scharfe Bande begrenzt zwischen den Chlorid-Ionen (Leitungen), die eine höhere elektrophoretische Mobilität zeigen und dem Glycin (Folgeionen), welches eine niedrigere elektrophoretische Mobilität aufweist, bis zum Trenngel. Erst im basischen, engporigen Trenngel erfolgt die Trennung der Proteine nach ihrer Größe [200,201].

Vor dem Beladen der Geltaschen mit den Proben, wurden die Gelkämme vorsichtig aus den Sammelgelen gezogen. Danach wurden die Geltaschen drei Mal mit Elektrophoresepuffer, einem Tris-Glycin-Puffer (siehe Tabelle 25), gespült. Um die während des Erhitzens verdampften und wieder im Reaktionsgefäß kondensierten Probenflüssigkeiten zu erhalten, wurden die Probengefäße kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und nacheinander in die Geltaschen pipettiert. Auch eine Beladung des Gels mit einem Größenmarker, der Proteine bekannter Molekülmasse enthält, erfolgte. Dieser ermöglicht später die Molekülmasse der Proteinbanden abzuschätzen.

Tabelle 25 Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers

Bestandteil	Menge
Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH-Wert auf 8,3 einstellen	

Die Gelkassetten wurden dann in das Elektrophoresegerät gesetzt und mit Elektrophoresepuffer umschwämmt. Danach wurde das Gel für 20 Minuten bei 40 mV fokussiert und lief anschließend zumeist für fünf Stunden bei 80 mV bis die mit Bromphenolblau markierte Lauffront das Gelende erreicht hatte. Im Anschluss erfolgte, wie im nächsten Kapitel beschrieben, der Proteintransfer auf eine Trägermembran.

2.2.7.2 Proteintransfer

Beim Western Blot, auch Immunblot genannt, handelt es sich um eine Übertragung von Proteinen entlang eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran. Um die Proteine des SDS-PAGE Gels zu übertragen, wurde eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF), an der die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, verwendet [202]. Für den Transfer der Gele wurden jeweils zwei 140 mm x 140 mm große PVDF-Membranen, sowie gleich große Filterpapiere zurechtgeschnitten. Der Transferpuffer (siehe Tabelle 27) wurde aus zehnfach konzentriertem Tris-Glycin-Puffer (siehe Tabelle 26) durch Verdünnung und Methanol-Zusatz erhalten.

Tabelle 26 Zusammensetzung des zehnfach konzentrierten Tris-Glycin-Puffers

Bestandteil	Menge
Tris	30,29 g
Glycin	144 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Tabelle 27 Zusammensetzung des Transferpuffers

Bestandteil	Menge
zehnfach konzentrierter Tris-Glycin-Puffer	100 ml
Methanol	200 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH-Wert auf 8,3 einstellen	

Ungefähr 20 Minuten vor Ende der SDS-PAGE wurden die PVDF-Membranen kurz in Methanol getaucht und anschließend mit den benötigten Filterpapieren und Schwämmen in Transferpuffer zur Äquilibration aufbewahrt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele entnommen und nach Entfernen des Sammelgels in Transferpuffer gelegt. Anschließend wurde die Transferkassette möglichst luftblasenfrei im folgenden Sandwich-Aufbau zusammengesetzt:

Abstandhalter → Silberelektrode (-) → Abstandhalter → Schwamm → Filterpapier → erstes Trenngel → erste Transfermembran → Filterpapier → zwei Schwämme → Filterpapier → zweites Trenngel → zweite Transfermembran → Filterpapier → Schwamm → Abstandhalter → Platinelektrode (+) → Abstandhalter → Deckel

Die so zusammengesetzte Transferkassette wurde in die Transferkammer eingebaut und mit Transferpuffer umspült. Der Transfer lief über Nacht unter Kühlung auf Eis bei 0,5 A und zusätzlich am nächsten Morgen für eine Stunde bei 1 A. Nach dem Transfer erfolgte die Proteinfärbung mit Ponceau S [203].

2.2.7.3 Proteinfärbung mit Ponceau S

Für die Proteinfärbung mit Ponceau S wurden die geblotteten Membranen für zwei Minuten, mit der Proteinseite nach oben zeigend, in der Farbstofflösung geschwenkt. Dabei bindet der rote Azofarbstoff Ponceau S reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine. Im Anschluss wurde die Lösung wieder abgenommen und die Membranen für weitere zwei Minuten in 10%iger Essigsäurelösung geschwenkt. Dabei wurde der nicht an den Proteinen haftende Farbstoff von der Membran gespült und die rot gefärbten Proteinbanden wurden sichtbar. Nun konnte überprüft werden, ob der Transfer gleichmäßig erfolgte.

Da bei den hier geblotteten Membranen die β -Aktin Bande (siehe Abbildung 36) gut zu erkennen war, diente die Proteinfärbung mit Ponceau S schon an dieser Stelle zur Abschätzung, ob die laut Popov bestimmten gleichen Mengen an Proteinen aufgetragen wurden (siehe Kap. 2.2.6). Außerdem konnten durch die Proteinfärbung mit Ponceau S ungefärbte Molekulargewichtsmarker auf der Membran erkannt und markiert werden.

Zuletzt wurden die Membranen in Aqua dest. gewaschen und wie in Kapitel 2.2.7.4 beschrieben weiter detektiert.

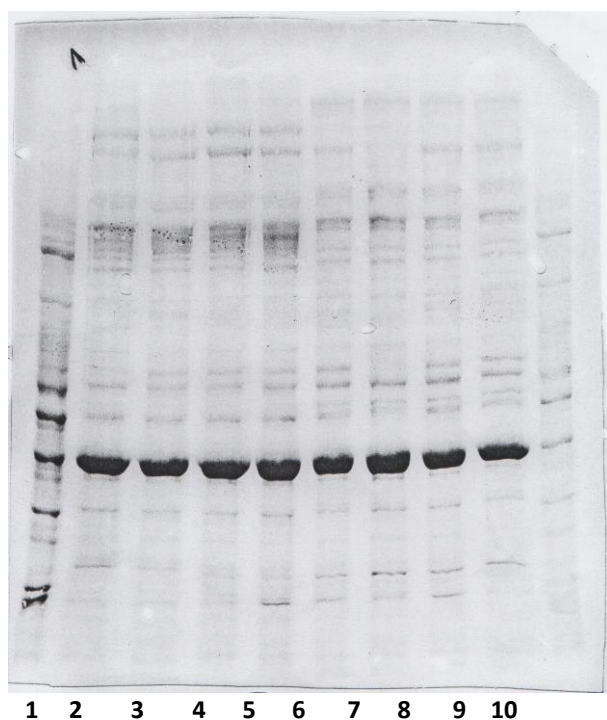


Abbildung 36 Ponceau S gefärbte PVDF-Membran

Dargestellt ist eine Ponceau S gefärbte PVDF-Membran. Die Reihe 1. ist die Proteinbande des Markers. Die Reihen 2.-9. sind die Proteine der aufgetragenen Proben. Reihe 10. entspricht der Positivkontrolle. Als dicke schwarze Banden sieht man β -Aktin-Proteine.

→ β -Aktin Bande

2.2.7.4 Immunologischer Nachweis des Bcl-3 Proteins

Für den Nachweis des Bcl-3 Proteins wurde zunächst aus einer zehnfach konzentrierten Tris-gepufferten Salzlösung (TBS, von engl. Tris-Buffered Saline) (siehe Tabelle 28) durch Verdünnen und Zusatz des Detergenzes Tween 20 eine Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween (TBST, von engl. Tris-Buffered Saline Tween) (siehe Tabelle 29) hergestellt. Diese wurde wiederum mit getrocknetem, fettfreiem Milchpulver versetzt, um einen 5%igen Blockierungspuffer (siehe Tabelle 30) zu erhalten. Die Membranen wurden anschließend, wie immer mit der Proteinseite nach oben zeigend, für eineinhalb Stunden in jeweils 50 ml des 5%igen Blockierungspuffers geschwenkt. Das Milchpulver blockierte dabei unspezifische Bindungsstellen und verhinderte so eine falsch-positive Bindung der Antikörper an die Membran.

Tabelle 28 Zusammensetzung der zehnfach konzentrierten TBS

Bestandteil	Menge
Tris	24,2 g
Natriumchlorid	180 g
Aqua dest.	ad 2000 ml

Tabelle 29 Zusammensetzung von TBST

Bestandteil	Menge
zehnfach konzentrierte TBS	200 ml
Tween 20	2 ml
Aqua dest.	ad 20000 ml

Tabelle 30 Zusammensetzung des 5%igen Blockierungspuffers

Bestandteil	Menge
Magermilchpulver	5 g
TBST	ad 100 ml

Danach wurden die Membranen mit jeweils 12,5 ml des 5%igen Blockierungspuffers, dem der primäre Antikörper gegen humanes Bcl-3 im Verhältnis 1:250 zugesetzt wurde, in Folie eingeschweißt und für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert. Der Nachweis des Bcl-3-Proteins erfolgte mit einem polyklonalen IgG-Antikörper, der aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde. Dieser detektiert die Aminosäuren 301-446 des Bcl-3 Proteins.

Im nächsten Schritt wurden die Membranen sechs Mal für fünf Minuten in TBST geschwenkt, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Danach wurden die Membranen mit jeweils 25 ml eines 1%igen Blockierungspuffers (siehe Tabelle 31), der 1:1000 mit dem sekundären Antikörper versetzt wurde, in Folien geschweißt und für eineinhalb Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Das sekundäre Antikörperkonjugat aus Ziegen Serum bindet dabei spezifisch an den primären Antikörper, da es die Fc-Region von Kaninchenantikörpern erkennt (goat-anti-rabbit).

Der sekundäre Antikörper ist weiterhin mit einer Peroxidase aus Meerrettich (HRP, von engl. horseradish peroxidase) konjugiert, die in der anschließenden Detektionsreaktion Verwendung findet. Da der sekundäre Antikörper mehrere Epitope des primären Antikörpers erkennt, also viele sekundäre Antikörper an den primären Antikörper binden, kommt es durch ihn zu einer Signalverstärkung.

Tabelle 31 Zusammensetzung des 1%igen Blockierungspuffers

Bestandteil	Menge
Magermilchpulver	0,5 g
TBST	ad 50 ml

Nachdem die Membranen vier Mal für fünf Minuten in TBST gewaschen wurden, erfolgte die Behandlung mit ECL-Lösung (verstärkte Chemolumineszenz, von engl. enhanced chemiluminescence). ECL besteht aus zwei voneinander getrennt aufzubewahrenden Reagenzien. Zum einen aus Luminol und zum anderen aus Wasserstoffperoxid und einem Phenol. Diese zwei Reagenzien wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und für eine Minute mit den PVDF-Membranen geschwenkt. Währenddessen oxidierte das Wasserstoffperoxid im alkalischen Milieu unter Katalyse von HRP des sekundären Antikörpers das Luminol. Es entstand ein Intermediat, welches unter Lichtemission zerfällt. Der Phenolzusatz (Verstärker, engl. enhancer) verstärkte die Reaktion. Die Intensität der emittierten Chemolumineszenz war dabei proportional zur Proteinmenge.

Da die Intensität des emittierten Lichtes mit der Zeit abnimmt, musste innerhalb von einer Stunde die Detektion mittels Röntgenfilm erfolgen. Dazu wurden die in ECL geschwenkten Membranen zunächst in Folie gelegt. In der Dunkelkammer wurde der Film dann über der Membran platziert und für wenige Minuten in der Fotokassette belichtet. Im Anschluss wurde der Film so lange in der Entwickler-Lösung geschwenkt, bis die Banden gut zu sehen waren. Danach wurde dieser gut mit Wasser gespült und fixiert. Die übrigen Membranen wurden eingeschweißt und bei 4°C gelagert. Nachdem die Membranen gestrippt, also der primäre und sekundäre Antikörper abgewaschen wurden, konnten sie erneut z.B. zum Nachweis von β -Aktin verwendet werden. Zuletzt erfolgte die densitometrische Auswertung der Filme mit ImageJ. Dabei wurde die Intensität der schwarzen Bandenfärbung, die proportional zum emittierten Licht und damit proportional zur Proteinmenge ist, erfasst [203].

2.2.7.5 Immunologischer Nachweis von β -Aktin

B-Aktin (48 kDa) ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen. Dort kommt es als eines der häufigsten Proteine vor. Anhand des immunologischen Nachweises von β -Aktin kann man abschätzen, ob alle Proben zu gleichen Teilen auf das Gel geladen wurden und somit Unterschiede in der Bandenintensität zwischen den Proben wirklich auf eine unterschiedliche Proteinexpression beruhen und nicht auf Lade- oder Transferfehlern [204].

Für den Nachweis von β -Aktin wurde die für die Bcl-3 Detektion verwendete Trägermembran gestrippt. Dazu wurde die Membran zwei Mal für 10 Minuten in TBST gespült. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 5%igen Blockierungspuffer (siehe Tabelle 30) für eineinhalb Stunden. Im Anschluss wurde die Membran mit 1%igen Blockierungspuffer (siehe Tabelle 31), der mit einem Antikörper gegen humanes β -Aktin im Verhältnis 1:1000 versetzt wurde, für ebenfalls eineinhalb Stunden inkubiert. Da dieser Antikörper bereits mit HRP konjugiert war, konnte schon an dieser Stelle die Detektion mit ECL erfolgen.

2.2.8 Thrombozytenaggregometrie nach Born

Die Messung der Thrombozytenaggregation nach Born (1963) [205] erfolgte turbidimetrisch durch die Ermittlung der Lichttransmission während der Plättchenaggregation. Noch im heutigen Klinikalltag ermöglicht diese Methode Erkrankungen, die mit einer Fehlfunktion der Plättchen in Zusammenhang stehen, wie angeborene Thrombozytendysfunktionen etwa bei Hämophilie A oder dem von-

Wille-brand-Syndrom bzw. durch Medikamente erworbene Blutungsneigungen, zu diagnostizieren. Für die thrombozytenaggregometrischen Untersuchungen wurde zunächst wie in Kapitel 2.2.1. und folgend beschrieben Blut abgenommen, um daraus PRP bzw. die PMN zu gewinnen. Da die Thrombozyten nicht so starken Aktivierungskräften, wie während des Waschvorgangs ausgesetzt waren, erfolgte hier jedoch kein Zusatz von PGE_1 . Zunächst wurde PRP aus dem ACD-A Blut durch Zentrifugation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 100g gewonnen. Das PRP wurde abgenommen und bei 37°C gelagert. Der Rückstand wurde erneut bei 1000g für 15 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, um das sogenannte plättchenarme Plasma (PPP, von engl. platelet poor plasma) zu erhalten. Die Plättchenanzahl im PRP wurde dann in der Neubauer improved Zählkammer ausgezählt und durch Zugabe von PPP auf einen physiologischen Wert von 250.000 Plättchen/ μl eingestellt. Da nach der Blutabnahme eine kontinuierliche Aktivierung der Plättchen stattfindet, welche in der ersten Stunde nach Blutentnahme am höchsten ist, wurden alle Messungen nach mindestens einer Stunde und maximal drei Stunden durchgeführt.

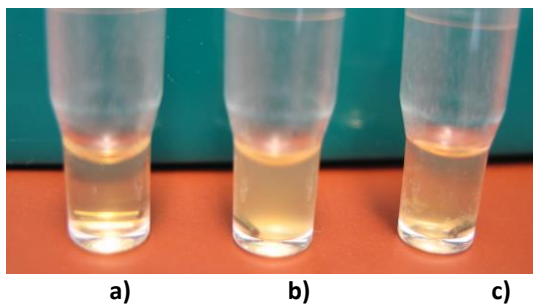


Abbildung 37 Messküvetten gefüllt mit PPP, PRP und durch α -Toxin aggregiertes PRP

- a) relativ klares PPP
- b) durch suspendierte Plättchen getrübbtes PRP
- c) geklärtes PRP nach Zugabe von $3 \mu\text{g/ml}$ α -Toxin

PRP besteht aus Plasma, in dem viele Thrombozyten suspendiert sind. Daher erscheint es im Gegensatz zum PPP trüb (siehe Abbildung 37). PRP hat somit eine niedrigere Lichtdurchlässigkeit als PPP. Wird nun ein Aggregationsagonist zum PRP hinzugegeben, kommt es zur Aggregation der Blutplättchen. Dadurch klärt sich das PRP und die Lichttransmission erhöht sich. Die Erhöhung der Lichtdurchlässigkeit ist dabei direkt proportional zur Thrombozytenaggregation.

Um die Aggregation zu messen, musste das Apact 4 (Automated Platelet Aggregation Coagulation Tracer)-Aggregometer kalibriert werden. Für die Kalibrierung wurde PPP verwendet, da die Lichttransmission des klaren PPP zu 100% aggregiertem PRP entspricht. Für die Bestimmung des 100%igen Aggregationswertes wurde $250 \mu\text{l}$ PPP in eine lichtdurchlässige Küvette gefüllt und im Probenkanal vermessen. Der 100%ige Aggregationswert für die aggregometrischen Untersuchungen mit PMN-Zusatz ergab sich aus der Lichttransmission von insgesamt $250 \mu\text{l}$ Zellsuspension bestehend aus PPP und der jeweiligen Versuchsmenge an PMN. Mit $250 \mu\text{l}$ PRP bzw. insgesamt $250 \mu\text{l}$ PRP mit PMN-Zusatz wurde der Wert für eine 0%ige Aggregation kalibriert. Zur Messung der Thrombozytenaggregation wurden $250 \mu\text{l}$ des gewonnenen PRP bzw. insgesamt $250 \mu\text{l}$ PRP mit PMN-Zusatz für eine Minute unter Rühren in den 37°C temperierten Gerätekanal inkubiert. Danach erfolgte die Applikation der Testsubstanzen und die Aufzeichnung der Aggregationskurve über einen Zeitraum von drei Minuten. Die Aggregationswerte wurden als Aggregation in Prozent angegeben [205].

2.2.9 Durchflusszytometrische Messungen

Die Durchflusszytometrie wird neben dem verbreiteten Einsatz in der klinischen Routinediagnostik auch vielseitig in der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Sie wird zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA verwendet. Für die Messungen werden suspendierte Zellen durch einen Laserstrahl geleitet. Trifft das Laserlicht auf eine Zelle, so wird es gestreut. Dieses Streulicht wird als sogenanntes Vorwärtsstreu-

licht (FSC, von engl. Forward Scatter), welches Informationen über die Zellgröße gibt und als Seitwärtsstreulicht (SSC, von engl. Side Scatter), welches die Granularität der Zellen und Faltung der Zelloberfläche beschreibt, erfasst. Eine Vielzahl von Antigenen kann mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert werden [206]. Bei den hier verwendeten Fluorochromen handelt es sich um Phycoerythrin (PE) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC). Für die Aktivitätsuntersuchungen wurden Thrombozyten mit dem sogenannten FITC konjugierten PAC-1 Antikörper (CD 41) markiert. Dieser Antikörper detektiert ein Epitop auf dem Fibrinogen-Rezeptor, welches erst freigelegt wird, wenn der Rezeptor durch Thrombozytenaktivierung in seine aktive Konformation übergeht (siehe Kap. 1.4.3). Des Weiteren wurden die Thrombozyten mit PE konjugierten Antikörpern gegen CD62P markiert. CD62P, auch P-Selektin genannt, ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches in den Weibel Palade-Körperchen des Endothels und in den Membranen der thrombozytären α -Granula und dichten Granula gespeichert wird. Wenn Thrombozyten aktiviert werden, kommt es zur Verschmelzung der Granulamembran mit der Plättchenmembran. Dadurch werden die Granulainhaltsstoffe freigesetzt und P-Selektin vermehrt auf der thrombozytären Oberfläche präsentiert (siehe Kap. 1.4.3). Die PMN wurden mit FITC konjugierten Antikörpern gegen CD11b gefärbt. CD11b bildet zusammen mit CD18 den sogenannten Makrophagen-Antigen 1-Rezeptor (MAC-1, auch CD11b/ CD18 oder CR3 (Komplement-Rezeptor 3 (von engl. complement receptor 3))), der bei PMN-Aktivierung verstärkt exprimiert wird. Das Integrin MAC-1 ist ein Komplement-Rezeptor auf der Oberfläche von PMN, mit dem bakterielle Antigene erkannt werden. Infolge der MAC-1 vermittelten Erkennung werden die Bakterien anschließend von den PMN phagozytiert (siehe Kap. 1.5.2).

Die Untersuchungen wurden mit gewaschenen Thrombozyten bzw. PMN durchgeführt. Jeweils 1 ml der physiologisch konzentrierten Zellsuspension wurde in ein Zellkulturgefäßes gefüllt. Danach erfolgte, je nach Versuchsprotokoll, die Zugabe der Toxine oder anderer Versuchssubstanzen, sowie eine Inkubation bei 37°C und 5%iger CO₂-Sättigung für die festgelegten Zeiträume. Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit wurden 10 μ l der Zellsuspension in ein mit je 10 μ l mit Isotypen-Antikörpern bzw. fluoreszenzmarkierten Antikörpern vorgefülltes Rundbodenröhrchen gefüllt und bei 4°C unter Lichtausschluss für 15 Minuten gefärbt. Bevor die Zellen vermessen werden konnten, wurden diese durch Zugabe von je 250 μ l einer 4°C kühlen 2%igen Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (siehe Tabelle 32) für mindestens eine halbe Stunde fixiert. Die restlichen Zellen wurden bis zum nächsten Probeentnahmezeitpunkt weiter inkubiert.

Tabelle 32 Zusammensetzung der 2%igen PFA-Lösung

Bestandteil	Menge
PFA	2 g
PBS	ad 100 ml
zum Lösen des PFA auf 70°C erwärmen und auf pH = 7,2 einstellen, kühl bei 4°C lagern	

Die durchflusszytometrischen Einfarben-Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur. Dabei wurde ein Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und ein Dioden-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 630 nm eingesetzt. Die Grundeinstellungen des Zytometers wurden mit fluoreszierenden Standardkalibrierungskügelchen (CaliBRITE Beads) regelmäßig überprüft und justiert. Für die Auswertung mittels Quadranten-Statistik wurde das Programm WinMDI verwendet.

Da Thrombozyten relativ kleine Zellen darstellen, wurden diese bei logarithmischer Verstärkung der Detektoren vermessen. Die Messungen der größeren PMN erfolgten bei linearer Verstärkung. Von jeder Probe wurden jeweils 10.000 Ereignisse (Events) erfasst. Des Weiteren wurde eine Durchflussrate von maximal 2000 Events/ Sekunde nicht überschritten, um Koinzidenz-Ereignisse, welche die Zellzählung verfälschen können, zu verhindern. Für die Messung am Durchflusszytometer wurde zunächst ein sogenannter Dot Plot, in dem das FSC gegen das SSC in einem Diagramm aufgetragen wurde, von der zeitlich ersten unstimulierten Kontrolle erstellt. Dabei wurden die Geräteeinstellun-

gen so gewählt, dass die Thrombozytenpopulation im Mittelfeld des FSC-SSC Dot Plot lag (FSC: E00/SSC: ~335 V). Um die so erhaltene unstimulierte Population wurde anschließend ein Analysenfenster (Gate) gesetzt (siehe Abbildung 38), welches auch während der Analyse stimulierter Proben nicht verschoben wurde. Die eingegrenzte unstimulierte Zellpopulation sowie die weiteren Proben wurden dann in einem Diagramm, in dem das FSC gegen die Fluoreszenz aufgetragen wurde, vermessen. Bei der anschließenden Auswertung wurde ein Quadrant so positioniert, dass bei der zeitlich ersten Kontrollprobe 5% positive Events angenommen wurden, also 5% der unstimulierten Population im oberen rechten Quadranten anzutreffen waren (siehe Abbildung 39). Eine 5%ige Aktivierung wurde angenommen, da laut Untersuchungen zum Einen ein Teil der Thrombozyten während der Isolationsprozedur aktiviert wird und zum Anderen ein geringer Teil der zu detektierenden Rezeptoren physiologischerweise immer aktiviert vorliegt [207].

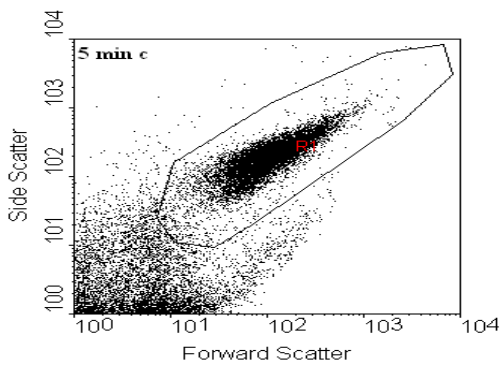


Abbildung 38 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten Thrombozyten nach fünf Minuten
Das Analysenfenster (Gate R1) wurde um die Thrombozytenpopulation gelegt.

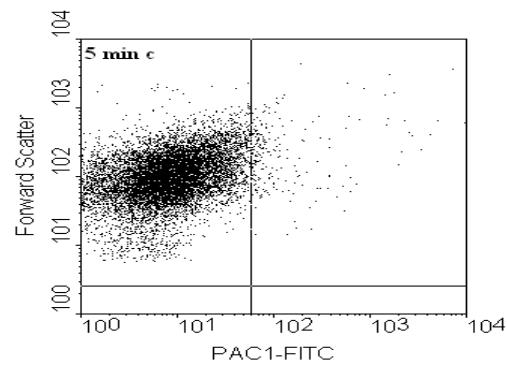


Abbildung 39 FSC-PAC-1 Dot Plot von unstimulierten Thrombozyten nach fünf Minuten.
PAC-1 negative Thrombozyten befinden sich im oberen linken Quadranten. 5% der PAC-1 positiven Events liegen im oberen rechten Quadranten.

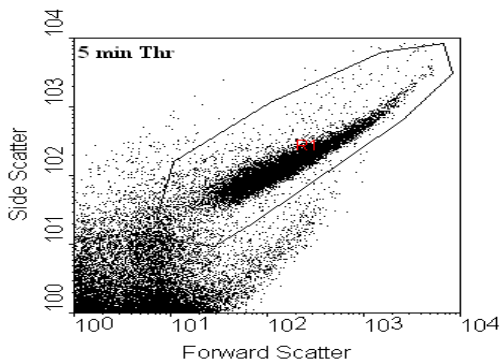


Abbildung 40 SSC-FSC Dot Plot von Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin
Das Gate R1 grenzt die mit Thrombin stimulierte Population ein.

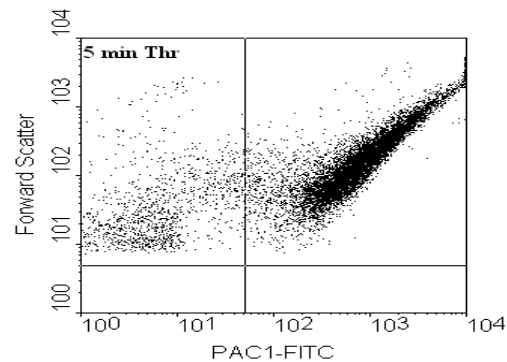


Abbildung 41 FSC-PAC-1 Dot Plot von Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin
Rechtsverschiebung der Population im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 38). 95% der gateden Zellen befinden sich im PAC-1-positiven oberen rechten Quadranten.

Die Position des Quadranten wurde zur Auswertung der restlichen Proben beibehalten. Die weiteren stimulierten Proben, sowie Kontrollproben späterer Zeitpunkte, wurden somit auf die zeitlich erste vermessene Kontrollprobe bezogen. Da aktivierte Zellen verstärkt vom Antikörper markiert wurden, stieg ihre Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle, sodass sowohl in den FSC-SSC Dot Plots (siehe Abbildung 40) als auch bei den FSC-Fluoreszenz Plots (siehe Abbildung 41) vermehrt positive Events im oberen rechten Quadranten auftraten, es kam zu einer Rechtsverschiebung der Population. War kein deutlicher Unterschied in der Anzahl der positiven

Events bei der zeitlich ersten unstimulierten Kontrolle zwischen den Quadranten zu sehen (95% versus 5%), wurde die Versuchsreihe aufgrund einer zu starken Aktivierung der Thrombozyten verworfen [207].

Werden Thrombozyten und PMN aktiviert, setzen sie Mikropartikel frei und bilden Aggregate (siehe Kap. 1.4.3 und 1.5.2). Da aggregierte Zellen größer als die Einzelzellen sind und sich die Floreszenzen überlagern, befinden sich diese rechts oberhalb der Zellpopulation. PMP (0,1-1 μm) hingegen sind kleiner und weisen eine geringere Fluoreszenz auf, sie befinden sich somit links unterhalb der Population. Für die Ermittlung der Aggregate von Thrombozyten und PMN sowie von PMP wurde nach Matzdorff *et al.* vorgegangen [208]. Die zeitlich erste unstimulierte Zellpopulation wurde im SSC-FSC Dot Plot erfasst. Diese wurde gated und anschließend noch einmal im SSC-FSC Dot-Plot ohne störende Zelltrümmer oder kontaminierende Zellen dargestellt. Nun wurden die Quadranten ebenfalls so gesetzt, dass 5% Aggregate bzw. PMP erfasst wurden. (siehe

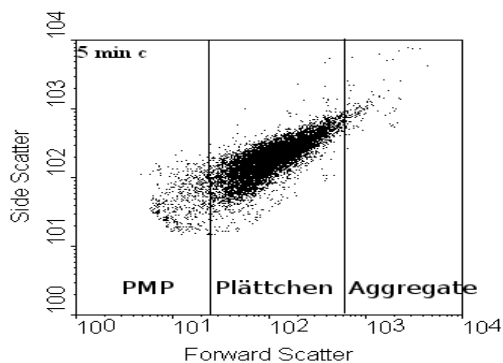


Abbildung 42 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten gateden Thrombozyten nach fünf Minuten Inkubationszeit

Links unterhalb der Zellpopulation befinden sich Mikropartikel. Rechts oberhalb der Population sind die größeren Zellaaggregate zu sehen.

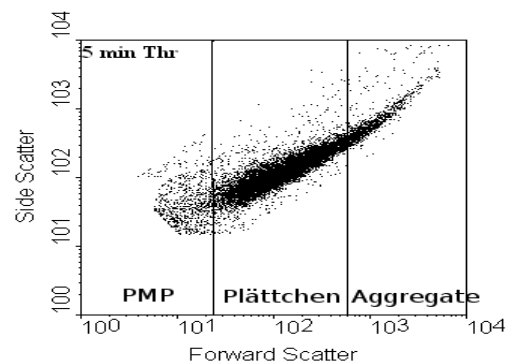


Abbildung 43 SSC-FSC Dot Plot von gateden Thrombozyten fünf Minuten stimuliert mit 0,1 U/ml Thrombin

Es ist eine leichte Erhöhung der PMP-positiven Events sowie eine deutliche Erhöhung der Aggregatbildung im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 42) zu erkennen.

Abbildung 42). Bei aktivierten Thrombozyten zog sich die Population optisch in die Länge, sodass es zu einer Erhöhung der positiven Events für Aggregate und PMP im Vergleich zur Kontrolle kam (siehe Abbildung 43).

2.2.10 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden, sofern nicht anders erwähnt, als Mittelwerte von fünf Experimenten ($n = 5$) einschließlich der Standardabweichung angegeben. Da bei der Messung der Thrombozytenaggregation die Absolutwerte je nach Blutspender physiologischerweise schwankten wurde die maximale absolute Aggregation einer Blutspenderprobe gleich 100% gesetzt und alle anderen erhaltenen Aggregationswerte darauf bezogen. Die EC_{50} - (mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird, von engl. effective concentration₅₀) bzw. IC_{50} - (mittlere Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition auftritt, von engl. inhibitory concentration₅₀) Werte wurden graphisch aus den Aggregationskurven ermittelt. Bei den Versuchen mit PMN-Zusatz wurde die von α -Toxin bzw. PMA ausgelöste absolute Aggregation der Thrombozyten gleich eins gesetzt. Die durch PMN-Zusatz erhaltenen Aggregationswerte wurden darauf bezogen. Durch einen Einstichproben-t-Test erfolgte die Bestimmung der Signifikanzwerte. Generell wurden Proben mit einem p-Wert kleiner 0,05 als signifikant (mit * markiert) angesehen. Bei den Western Blots sowie den durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die erhaltenen Werte der Kontrolle bzw. der Vergleichsprobe auf eins gesetzt, alle anderen gemessenen Werte wurden auf diesen Wert bezogen. Um zu testen, ob sich die Ergebnisse signifikant von der Kontroll- bzw. Vergleichsprobe unterscheiden, wurde ein Einstichproben-t-Test gegen den gesetzten Mittelwert von eins durchgeführt. Ein Zwei-

stichproben-t-Test wurde bei verbundenen Proben, die miteinander und nicht mit der Kontrolle bzw. Vergleichsprobe verglichen wurden, durchgeführt. Die statistische Vorgehensweise wurde auf Richtigkeit überprüft (siehe Anhang).

3. Ergebnisse

3.1 Thrombozytenaggregometrie

3.1.1 Physiologisch und durch bakterielle Toxine induzierte Thrombozytenaggregation

Um die Qualität des isolierten PRP und die Versuchsbedingungen zu überprüfen, wurden zunächst Aggregometrieversuche mit physiologischen Aggregationsinduktoren (siehe Kap. 1.4.3) durchgeführt. Auch die zu untersuchenden bakteriellen Toxine wurden auf ihre thrombozytenaggregatorische Potenz getestet. Hierdurch sollte ermöglicht werden einen Vergleich zwischen einer physiologisch und einer durch bakterielle Toxine induzierten Plättchenaggregation zu ziehen. Zur Ermittlung der relativen Thrombozytenaggregation wurden das PRP mit steigenden Konzentrationen des physiologischen Agonisten versetzt. Die maximal beobachtete Thrombozytenaggregation, auf die sich alle anderen ermittelten Aggregationswerte beziehen, wurde gleich 100% gesetzt. Anschließend wurden die relativen Aggregationswerte in Abhängigkeit von der Konzentration des zugegebenen Aggregationsinduktors graphisch erfasst. Aus diesem Diagramm wurde die EC_{50} , also die mittlere effektive Konzentration, bei der ein halbmaximaler thrombozytenaggregatorischer Effekt auftrat, ermittelt.

Mit dem physiologischen Plättchenaktivator ADP, welcher Bestandteil der Speichergranula in Thrombozyten ist und die Thrombozytenaggregation rezeptorvermittelt anregt, ergab sich ein EC_{50} -Wert von 1,91 μ M (siehe Abbildung 44). Kollagen liegt in der subendothelialen Matrix vor und wird bei Gefäßverletzungen freigelegt. Es führt zu Adhäsion und Aggregation der Plättchen an der Gefäßwand. Bei den Messungen mit Kollagen betrug der ermittelte EC_{50} -Wert 0,72 μ g/ml (siehe Abbildung 45). Die Fettsäure Arachidonsäure (AA) wird durch die COX der Plättchen in TXA_2 umgewandelt und ist somit ein wirksamer Aktivator der Thrombozyten. Die erhaltene EC_{50} betrug hier 0,1 mM (siehe Abbildung 46). Als letzte physiologische Substanz wurde Epinephrin (Adrenalin) getestet. Das Hormon stimuliert über adrenerge G-Protein gekoppelte Rezeptoren die PLC, wodurch es zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten kommt. Die Messungen mit Epinephrin ergaben eine EC_{50} von 1,2 μ M (siehe Abbildung 47). Außerdem wurde das aus dem Bakterium *Amycolatopsis lurida* gewonnene Antibiotikum Ristocetin getestet. Dieses führt nach einem noch nicht genau geklärten Mechanismus dazu, dass der vWF an den thrombozytären GPIIb-Rezeptor bindet, was letztendlich die Plättchenaggregation einleitet. Bei den Messungen mit Ristocetin wurde ein EC_{50} von 0,7 mg/ml ermittelt (siehe Abbildung 48) [209]. Während mit Kollagen und Ristocetin stimulierte Thrombozyten einen sigmoiden Kurvenverlauf in dem ausgewählten Konzentrationsbereich zeigten, konnte bei den anderen getesteten Agonisten ein hyperbelartiger Verlauf festgestellt werden.

Des Weiteren wurden auch die bakteriellen Toxine auf ihre thrombozytenaggregatorischen Eigenschaften getestet. Es ist bekannt, dass *S. aureus* α -Toxin Zellmembranen perforiert, welches zu vielfältigen Effekten bis hin zur Lyse der betroffenen Zellen führt. Mit α -Toxin stimulierte Thrombozyten schwellen jedoch lediglich an, da ihr Gehalt an Makromolekülen zu niedrig ist. Die toxinvermittelte Porenformation führt bei Blutplättchen zu sekundären Effekten, die durch den Einstrom von Calciumionen aus dem umgebenden Milieu entlang eines extra-/ intrazellulären Gefälles, verursacht werden und über die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden zur Aktivierung der Plättchen einschließlich deren Aggregation führt (siehe Kap. 1.4.4). Die Aggregationskurve von α -Toxin stimulierten Thrombozyten ergab einen sigmoiden Kurvenverlauf (siehe Abbildung 49). Bereits nach der Zugabe von circa 2 μ g/ml an α -Toxin kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Thrombozytenaggregation. Ab circa 4 μ g/ml wurde eine maximale Aggregation erreicht. Eine Konzentration von 3,04 μ g/ml α -Toxin führte zu einer 50%igen Aggregation. Mit den bakteriellen Toxinen LPS und SLO konnte in den ver-

schiedensten Konzentrationen innerhalb des Messzeitraums von drei Minuten keine Thrombozytenaggregation festgestellt werden. Dies galt auch für Messungen mit SLO, welches mit 20 mM Cystein aktiviert wurde (siehe Kap. 1.7.1). Ebenso konnte durch die Kombination von α -Toxin mit verschiedensten Konzentrationen an SLO mit und ohne Cysteinzusatz sowie LPS keine synergistische Verstärkung auf die Thrombozytenaggregation beobachtet werden.

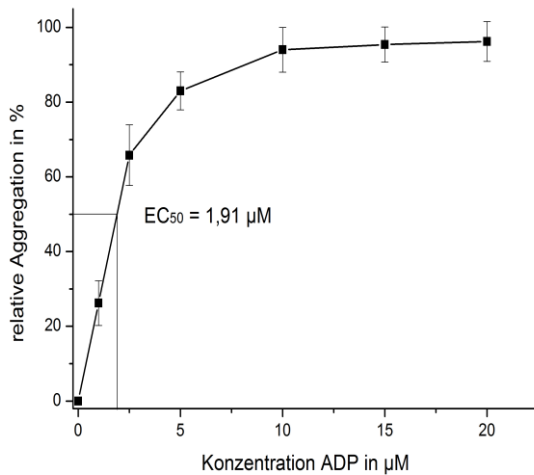


Abbildung 44 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der ADP-Konzentration

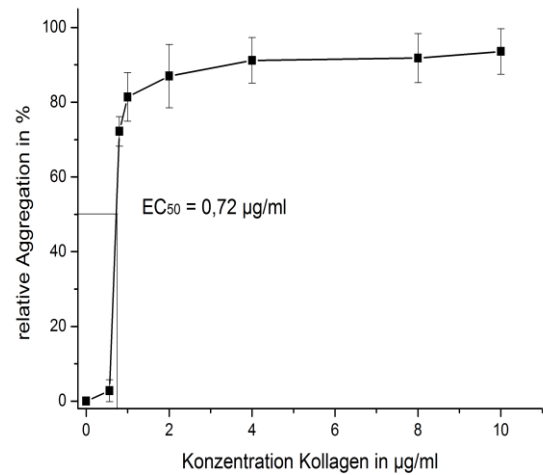


Abbildung 45 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Kollagen-Konzentration

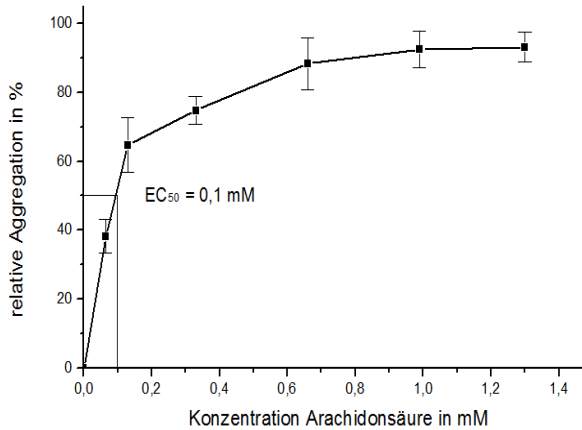


Abbildung 46 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der AA-Konzentration

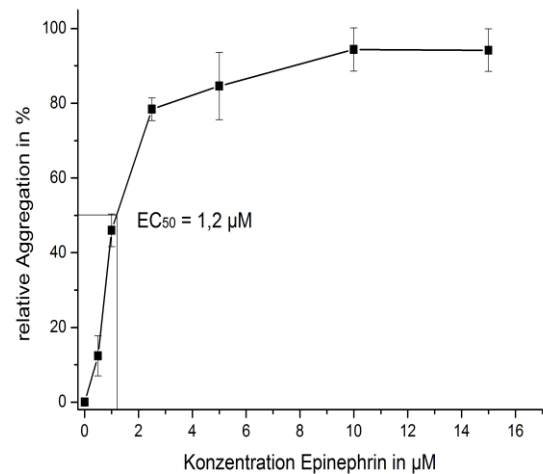


Abbildung 47 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Epinephrin-Konzentration

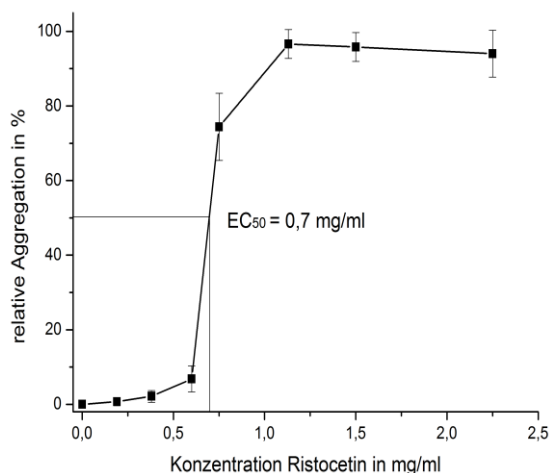


Abbildung 48 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der Ristocetin-Konzentration

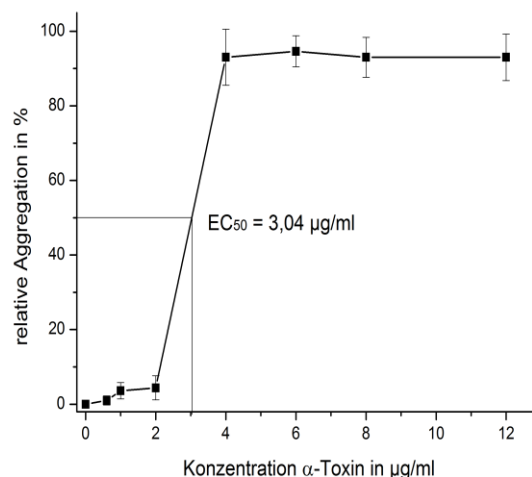


Abbildung 49 Abhängigkeit der relativen Thrombozytenaggregation von der alpha-Toxin-Konzentration

3.1.2 Inhibierung der physiologisch und Toxin-induzierten Thrombozytenaggregation

Im Anschluss wurde untersucht, ob die durch physiologische Agonisten verursachte Aggregation durch Substanzen, die auf unterschiedlichen Ebenen die Thrombozytenaggregation verhindern, inhibiert werden kann. Dabei wurde der Induktor der Thrombozytenaggregation in der üblichen submaximalen Konzentration, die bei den zuvor ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven (siehe Kap. 3.1.1) zu einer relativen Thrombozytenaggregation von etwa 80% führte, eingesetzt. Die mit dem Agonisten erhaltene maximale Aggregation wurde zu 100% gesetzt. Die relative Thrombozytenaggregation wurde dann unter Zusatz der jeweils gleichen Menge des Agonisten und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors bestimmt und graphisch erfasst. Die IC_{50} , also die mittlere Konzentration des Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition auftrat, wurde aus diesen Graphen ermittelt.

Zum Einsatz kamen Abciximab, ein monoklonaler Antikörper, der nur an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor bindet und dadurch die Bindungsstelle für Fibrinogen blockiert. Als Folge dessen können die Thrombozyten nicht mehr über Fibrinogenbrücken miteinander aggregieren (siehe Kap. 1.4.5). Die mit 5 µM ADP induzierte und mit Abciximab inhibierte, hyperbelartig abfallende Aggregation zeigte einen wesentlich höheren IC_{50} -Wert von 2,41 µg/ml (siehe Abbildung 50), als die mit 1 µg/ml Kollagen ($IC_{50} = 0,73$ µg/ml, siehe Abbildung 51) und 1mg/ml Ristocetin ($IC_{50} = 0,43$ µg/ml, siehe Abbildung 52) induzierte Aggregation. Während die Kurve mit Kollagenzusatz nahezu linear abfällt ist mit Ristocetin ein ebenfalls hyperbelartiger Abfall zu beobachten. Das Prostacyclin-Analogen Iloprost verfügt durch die rezeptorvermittelte Erhöhung des cAMP-Spiegels in Thrombozyten über inhibitorische Eigenschaften (siehe Kap. 1.4.5). Mit der durch 1mg/ml Ristocetin angeregten Aggregation konnte hierbei ein IC_{50} -Wert von 0,24 ng/ml in der fast linear abfallenden Kurve ermittelt werden (siehe Abbildung 53). NPN stimuliert die thrombozytären Guanylatzyklase, wodurch es zu einer Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels kommt, welches die Blutplättchen ebenfalls inhibiert (siehe Kap. 1.4.5). Die aus den durch NPN-Zusatz annähernd sigmoid abfallenden Kurven ermittelten IC_{50} -Werte betragen für den Agonisten Kollagen 8,29 µg/ml (siehe Abbildung 54) und für Ristocetin 3,54 µg/ml (siehe Abbildung 55). Außerdem wurde der COX-Inhibitor (siehe Kap. 1.4.3) Diclofenac getestet, welcher bis auf den sigmoidartigen Kurvenabfall mit Ristocetin, zu einem fast linearen Kurvenabfall führte. Hier war der bestimmte IC_{50} -Wert, ähnlich wie bei Abciximab, mit 8,56 µg/ml bei den ADP stimulierten Thrombozyten (siehe Abbildung 56) höher als bei den mit Kollagen ($IC_{50} = 5,61$ µg/ml, siehe Abbildung 57) und Ristocetin ($IC_{50} = 5,11$ µg/ml, siehe Abbildung 58) behandelten Blutplättchen. In Abbildung 59 ist die fast linear abfallende Kurve für den COX-Inhibitor Indometacin dargestellt. Mit Ristocetin stimulierte Thrombozyten wurden mit einer IC_{50} von 33,85 µg/ml von Indometacin inhibiert.

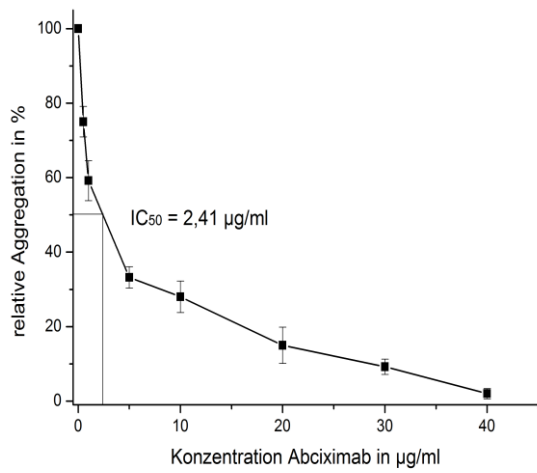


Abbildung 50 Inhibierung der mit 5 µM ADP induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration

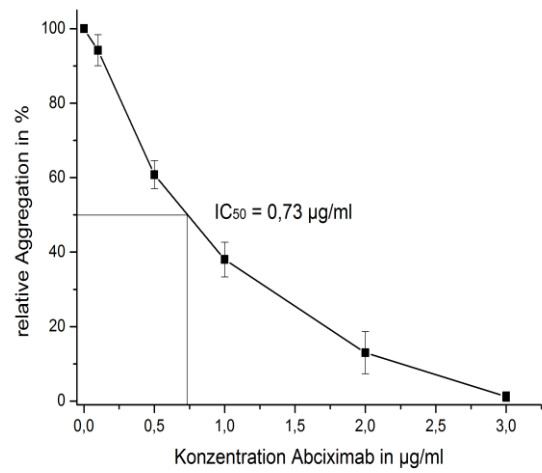


Abbildung 51 Inhibierung der mit 1 µg/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration

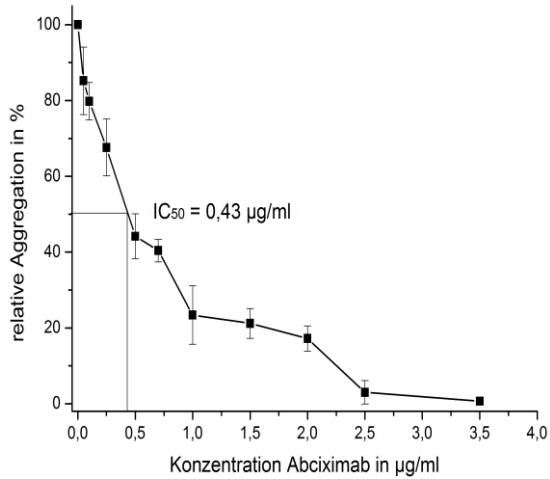


Abbildung 52 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration

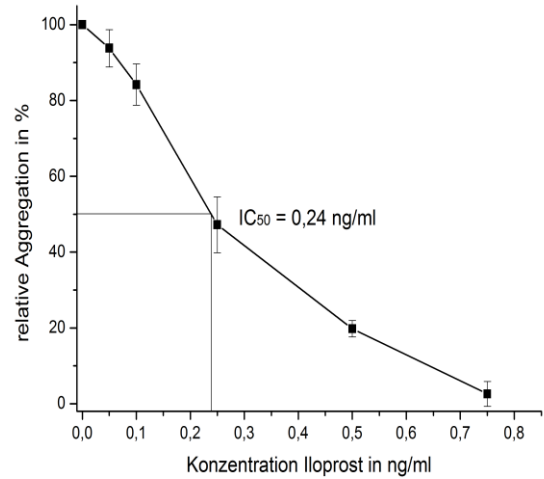


Abbildung 53 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration

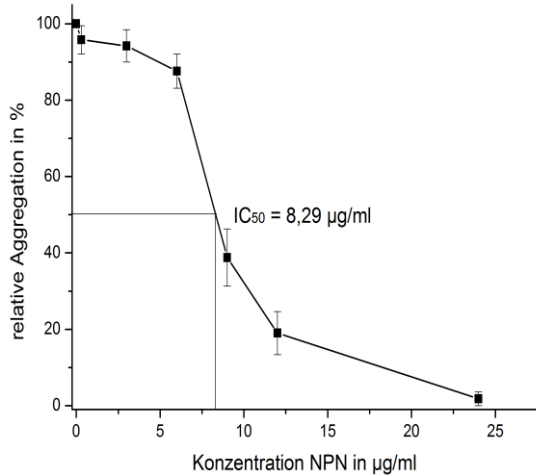


Abbildung 54 Inhibierung der mit 1 µg/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration

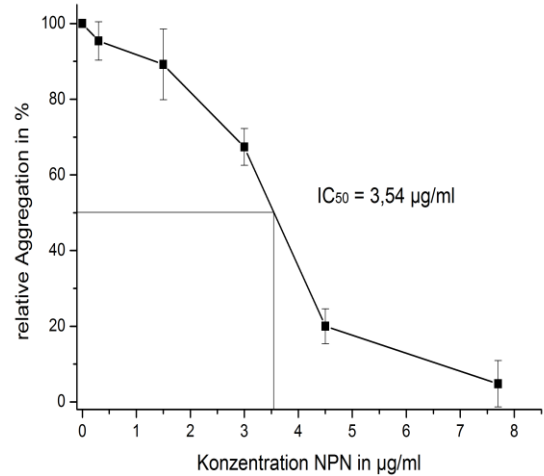


Abbildung 55 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration

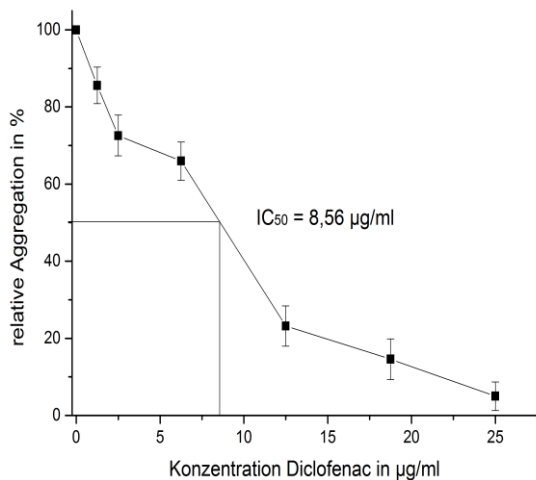


Abbildung 56 Inhibierung der mit 5 mM ADP induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration

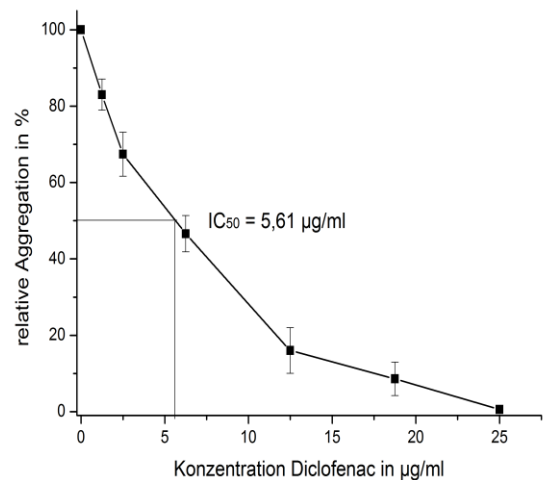


Abbildung 57 Inhibierung der mit 1 µg/ml Kollagen induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration

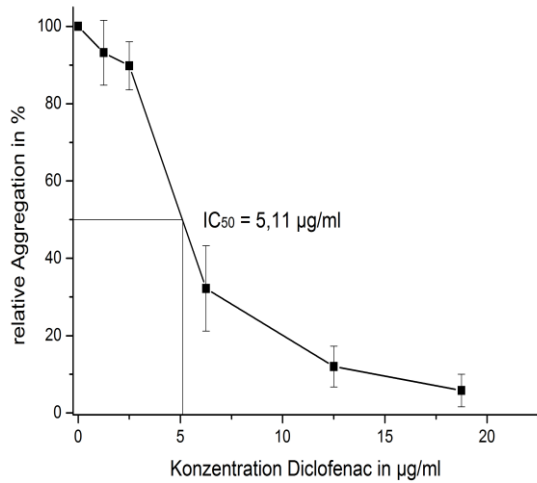


Abbildung 58 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Diclofenac-Konzentration

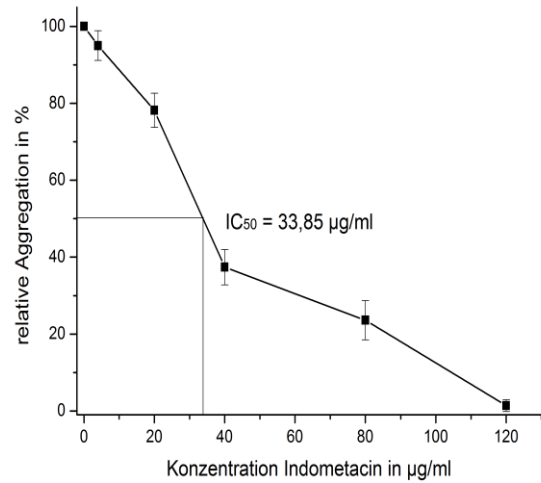


Abbildung 59 Inhibierung der mit 1 mg/ml Ristocetin induzierten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Indometacin-Konzentration

Von den getesteten bakteriellen Toxinen induzierte nur α -Toxin eine Plättchenaggregation. Als nächstes sollte diese bakteriell induzierte Aggregation näher betrachtet werden, indem untersucht wurde, ob die durch α -Toxin-Poren vermittelte Aggregation überhaupt inhibiert werden kann und wenn ja, welche Mechanismen diese Aggregation unterbinden. Außerdem sollte ein Vergleich bezüglich der Kurvenverläufe und der IC_{50} -Werte, von Thrombozyten, welche mit physiologische Agonisten bzw. mit α -Toxin stimuliert und durch die gleichen Inhibitoren gehemmt wurden, erstellt werden. Durch den Einsatz von Abciximab (siehe Kap. 1.4.5) konnte die mit 3,5 μ g/ml α -Toxin induzierte Aggregation effektiv gehemmt werden (siehe Abbildung 60). Es ergab sich eine IC_{50} von 0,85 μ g/ml, ähnlich der unter Kollagen induzierten und mit Abciximab gehemmten Aggregation ($IC_{50} = 0,73$ μ g/ml, siehe Abbildung 51). Während es sonst zu einer nahezu vollständigen Inhibition der Thrombozytenaggregation kam, konnte die mit α -Toxin induzierte und mit Iloprost (siehe Kap. 1.4.5) gehemmte Aggregation nur zum Teil verhindert werden (siehe Abbildung 61). So wurde trotz Zugabe von hohen Dosen Iloprost eine relative Aggregation von circa 20% nicht unterschritten. Mit 0,17 ng/ml Iloprost konnte hierbei eine 50%ige Inhibierung der α -Toxin ausgelösten Thrombozytenaggregation erreicht werden. Dieser Wert ähnelt der durch Ristocetin induzierten und mit Iloprost-Zusatz gehemmten Plättchenaggregation ($IC_{50} = 0,24$ ng/ml, siehe Abbildung 53). NPN (siehe Kap. 1.4.5) erwies sich als effektiver Inhibitor bei einer durch α -Toxin verursachten Plättchenaggregation (siehe Abbildung 62). Der aus den Messungen ermittelte IC_{50} -Wert betrug 6,26 μ g/ml. Dieser gleicht somit dem IC_{50} -Wert bei einer durch Kollagen ($IC_{50} = 8,29$ μ g/ml, Abbildung 54) und Ristocetin ($IC_{50} = 3,54$ μ g/ml, siehe Abbildung 55) induzierten und mit NPN gehemmten Plättchenaggregation. Bis auf die mit NPN inhibierte Thrombozytenaggregation, deren Kurvenverlauf nahezu sigmoid abfällt, konnte bei den mit Abciximab und Iloprost inkubierten Plättchen mit steigendem Inhibitorzusatz ein hyperbelartiger Abfall der Thrombozytenaggregation beobachtet werden.

Um den vermeintlichen Einfluss von unter α -Toxin de novo exprimierten Proteinen auf die Aggregation der Plättchen zu untersuchen, wurden die Proteinexpressionsinhibitoren Puromycin und Rapamycin getestet (siehe Kap. 1.4.6.1). Mit Puromycin konnte eine nahezu lineare Inhibition der Aggregation beobachtet werden (siehe Abbildung 63). Die ermittelte IC_{50} betrug 4,86 mM. Auch mit Rapamycin konnte zunächst eine effektive inhibitorische Wirkung auf die Blutplättchen festgestellt werden. Da zum Auflösen des Rapamycin-Pulvers Ethanol als Träger verwendet wurde, kam es zu einer Testung der alleinigen Trägerflüssigkeit. Hierbei zeigte sich, dass die inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation jedoch allein dem Lösungsmittel Ethanol zuzuschreiben war. Eine Testung mit COX-Inhibitoren, wie Diclofenac und Indometacin erfolgte aus zeitlichen Gründen nicht.

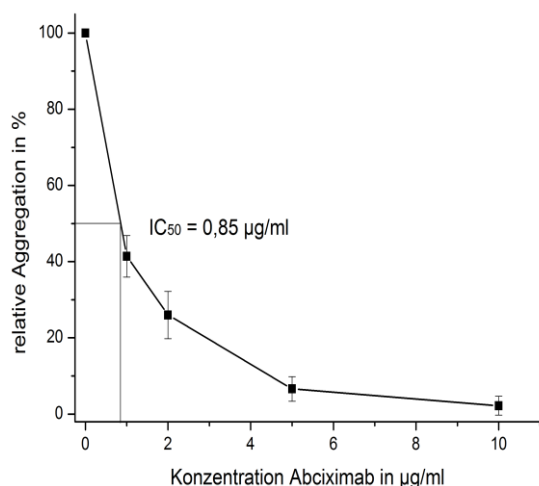


Abbildung 60 Inhibierung der mit 3,5 µg/ml α-Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration

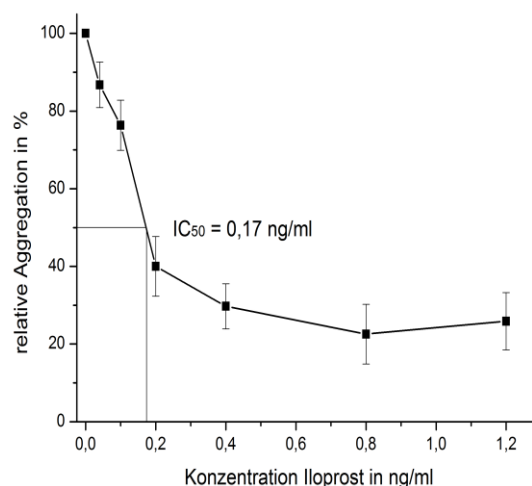


Abbildung 61 Inhibierung der mit 3,5 µg/ml α-Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Iloprost-Konzentration

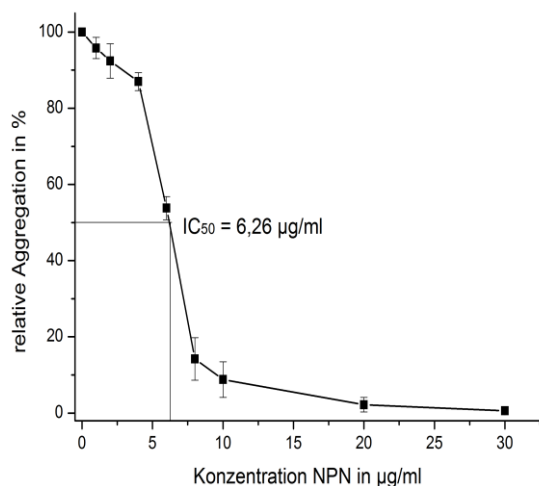


Abbildung 62 Inhibierung der mit 3,5 µg/ml α-Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der NPN-Konzentration

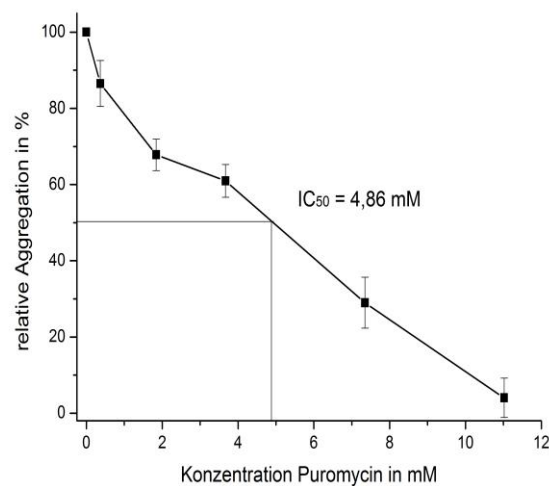


Abbildung 63 Inhibierung der mit 3,5 µg/ml α-Toxin ausgelösten relativen Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der Puromycin-Konzentration

3.1.3 Interaktion von Thrombozyten und PMN bei der Thrombozytenaggregation

Nicht nur die Thrombozyten und PMN alleine, sondern vielmehr die Interaktion zwischen diesen Zellen spielt im Sepsisgeschehen und bei der Endokarditis eine wichtige Rolle. Um zu untersuchen, ob beide Zelltypen synergistische Effekte auf die Thrombozytenaggregation haben, wurden Toxin stimulierte Plättchen mit und ohne Zusatz von PMN untersucht. Auch eine mikroskopische Betrachtung der einzeln und miteinander inkubierten Thrombozyten und PMN erfolgte.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 40-fachen Vergrößerung angefertigt. Für die Versuche wurden in jeweils physiologischer Konzentration unstimulierte oder mit Toxinen stimulierte Thrombozyten mit bzw. ohne Zusatz von PMN nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen unter dem Mikroskop betrachtet.

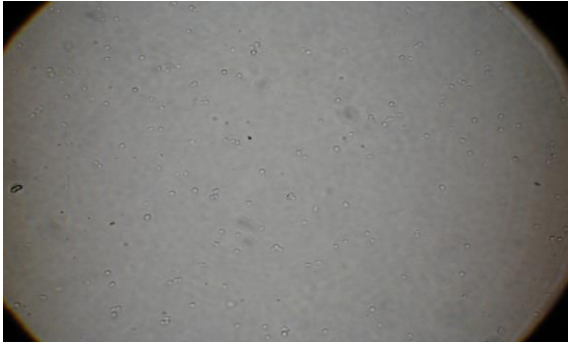


Abbildung 64 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten

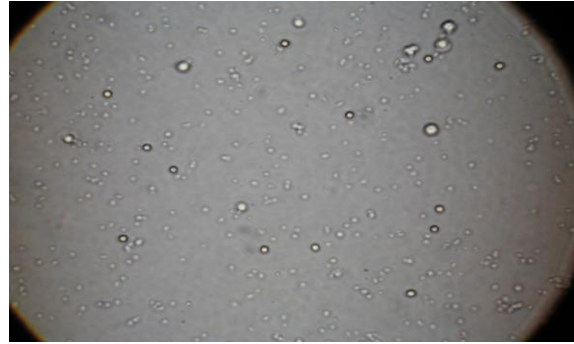


Abbildung 65 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz



Abbildung 66 Mikroskopische Aufnahme von PMA (0,5 µg/ml) stimulierten Thrombozyten

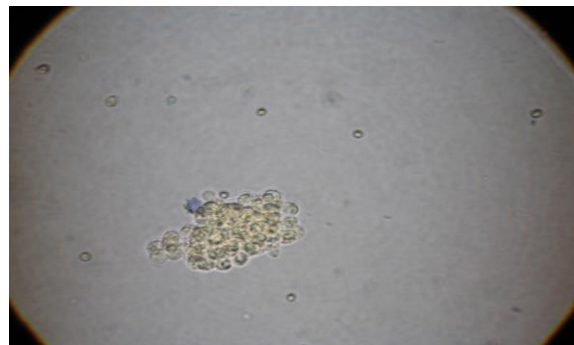


Abbildung 67 Mikroskopische Aufnahme von PMA (0,5 µg/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz



Abbildung 68 Mikroskopische Aufnahme von α-Toxin (3,5 µg/ml) stimulierten Thrombozyten

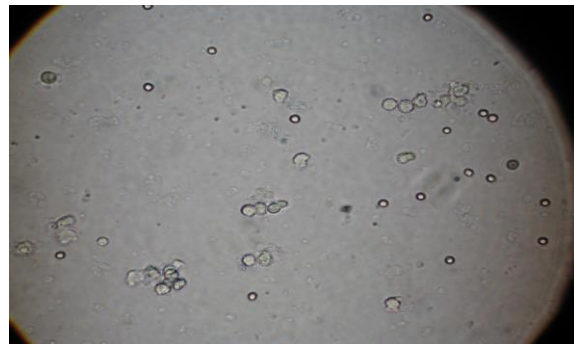


Abbildung 69 Mikroskopische Aufnahme von α-Toxin (3,5 µg/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz

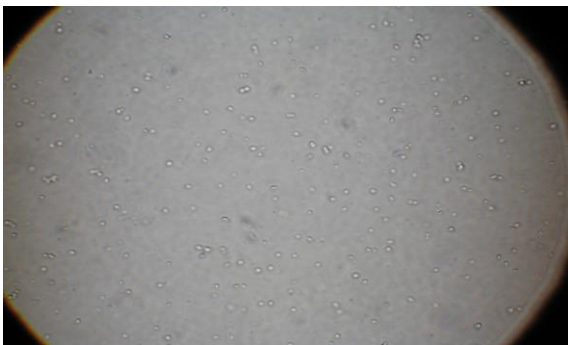


Abbildung 70 Mikroskopische Aufnahme von E.coli LPS (0,1 µg/ml) stimulierten Thrombozyten

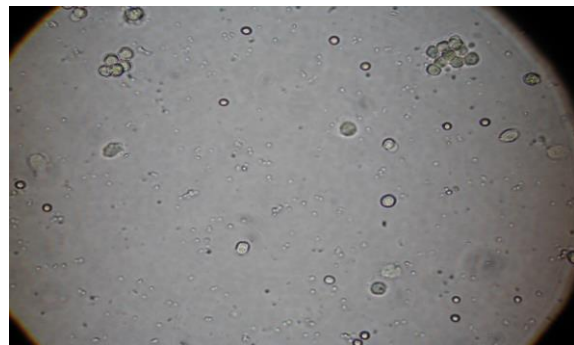


Abbildung 71 Mikroskopische Aufnahme von E.coli LPS (0,1 µg/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz

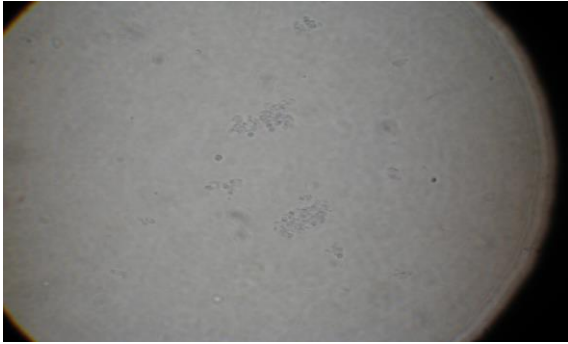


Abbildung 72 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten

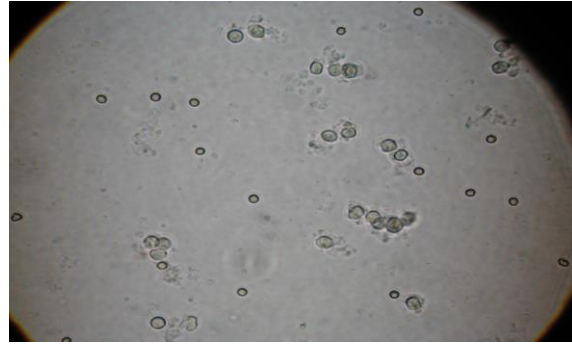


Abbildung 73 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz

Wie in

Abbildung 64 zu sehen, liegen die unstimulierten Thrombozyten nach vier Stunden gleichmäßig verteilt im Medium vor. Das gleiche Bild zeigt sich bei den unstimulierten und mit PMN-Zusatz inkubierten Plättchen (siehe

Abbildung 65). Die mit PMA stimulierten Thrombozyten liegen ebenfalls gleichmäßig suspendiert vor, obwohl PMA die thrombozytäre PKC aktiviert, welches die Plättchenaggregation induzieren sollte (siehe

Abbildung 66) [210]. In

Abbildung 67 zeigt sich deutlich, dass die mit 0,5 µg/ml PMA stimulierten Thrombozyten mit PMN-Zusatz miteinander aggregieren. Die mit jeweils 3,5 µg/ml α-Toxin und 750 HU/ml SLO stimulierten Plättchen sind nach vier Stunden gut als Aggregate zu erkennen (siehe

Abbildung 68 und

Abbildung 72). Diese Thrombozyten weisen den für α-Toxin und SLO stimulierte Thrombozyten typischen aufgequollenen Zustand auf, wodurch sie lichtdurchscheinender werden (siehe Kap. 3.2.1). Durch den Zusatz von PMN kam es bei den so stimulierten Blutplättchen zur Ausbildung von großen Thrombozyten-PMN Aggregaten (siehe

Abbildung 69 und

Abbildung 73). Die Inkubation mit LPS führte nicht, wie schon am Aggregometer beobachtet, zur Aggregation der Thrombozyten (siehe

Abbildung 70). Unter PMN-Zusatz ließen sich jedoch PMN-Aggregate und nur wenige aggregierte Thrombozyten beobachten (siehe

Abbildung 71).

Für die aggregometrischen Untersuchungen wurden die Thrombozyten mit bzw. ohne PMN-Zusatz zunächst mit PMA, einem bekannten Aktivator von PMN (siehe Kap. 1.5.3), stimuliert. Das als Positivkontrolle dienende PMA wurde hierfür in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zu den Thrombozyten mit bzw. ohne PMN-Zusatz gegeben. Danach wurde die Aggregation für drei Minuten vermessen. Der ohne PMN-Zusatz erhaltene Aggregationswert wurde gleich eins gesetzt. Dieser Wert wurde dann auf die unter Zusatz von jeweils 2000-, 4500- und 7500 PMN/µl bestimmten Aggregationswerte bezogen (siehe Abbildung 74). Die Konzentrationen der zugegebenen PMN wurden so gewählt, dass sie im Bereich der physiologischen Blutkonzentration, die 2500-7500 PMN/µl beträgt, liegen [211]. Unter Zugabe von 2000 PMN/µl zu PMA versetzten Thrombozyten ergab sich so ein Wert von $1,26 \pm 0,08$. Ein signifikanter Unterschied zur Probe ohne PMN-Zusatz konnte durch Zugabe von 4500

PMN/ μl mit $1,9 \pm 0,38$ erhalten werden. Unter Zugabe von 7500 PMN/ μl war ein noch deutlicher Unterschied mit $2,19 \pm 0,16$ zu beobachten.

Auch bei den mit $3,5 \mu\text{g/ml}$ α -Toxin stimulierten Thrombozyten wurde der erhaltene Aggregationswert gleich eins gesetzt (siehe Abbildung 75). Die nächsten Messungen erfolgten unter sonst gleichen Bedingungen und ebenfalls mit Zusatz von jeweils 2000-, 4500- und 7500 PMN/ μl . Die Zugabe von 2000 PMN/ μl konnte die Aggregation mit $1,13 \pm 0,12$ nicht signifikant erhöhen. Ein Zusatz von 4500 PMN/ μl , der im mittleren physiologischen Konzentrationsbereich liegt, erhöhte die Aggregation signifikant auf $1,75 \pm 0,23$. Durch den Zusatz von 7500 PMN/ μl konnte der Aggregationswert schließlich um mehr als das Doppelte des ursprünglichen Wertes, auf $2,27 \pm 0,16$ erhöht werden.

Die Toxine LPS und SLO mit bzw. ohne Cysteinzusatz zeigten keine thrombozytenaggregatorische Wirkung unter den zuvor getesteten Bedingungen (siehe Kap. 3.1.1). Auch durch den Zusatz von PMN zu Thrombozyten konnte mit diesen Toxinen innerhalb des Messzeitraumes von drei Minuten keine messbare Aggregation festgestellt werden.

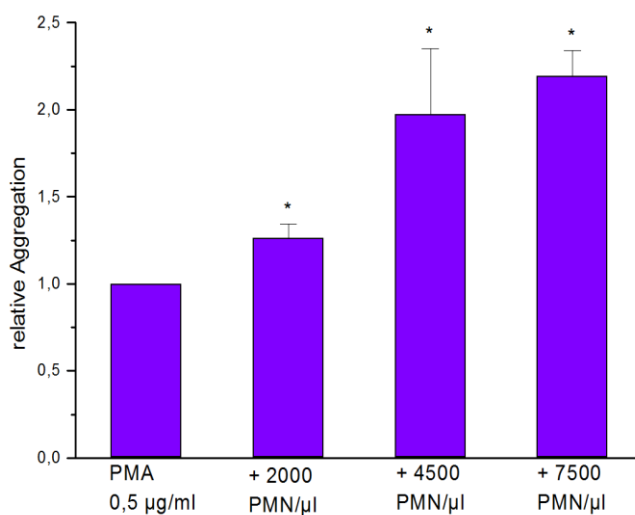


Abbildung 74 PMA ausgelöste relative Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der PMN-Anzahl

Relative Aggregation von Thrombozyten stimuliert mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ PMA sowie unter Zusatz von 2000-, 4500- und 7500 PMN/ μl .

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsgruppe (PMA $0,5 \mu\text{g/ml}$)

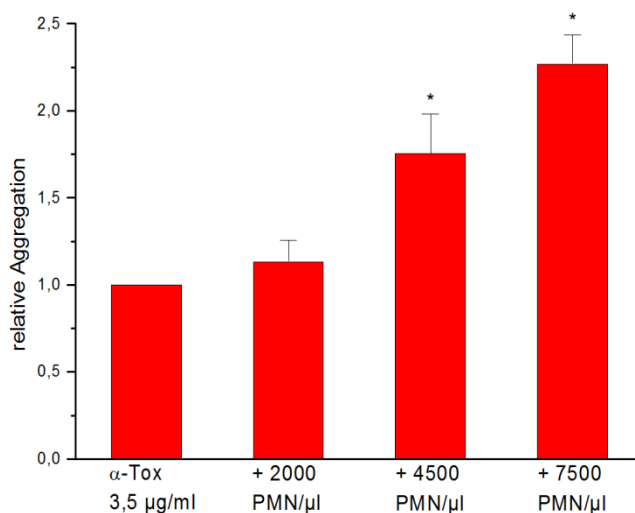


Abbildung 75 α -Toxin ausgelöste relative Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der PMN-Anzahl

Relative Aggregation von Thrombozyten stimuliert mit $3,5 \mu\text{g/ml}$ α -Toxin sowie unter Zusatz von 2000-, 4500- und 7500 PMN/ μl .

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsgruppe (α -Toxin $3,5 \mu\text{g/ml}$)

3.2 Bcl-3 Proteinexpression in humanen Thrombozyten

Der Einfluss bakterieller Toxine auf die Proteinexpression in Thrombozyten wurde mittels Western Blot Analysen untersucht. Hierzu wurde die Expression des Bcl-3 Proteins (siehe Kap. 1.4.6), welches bei der Gerinnselretraktion eine Rolle spielt, unter Einfluss von α -Toxin, SLO und LPS näher betrachtet. Als Positivkontrolle (siehe Abbildung 198) wurden Zellkernextrakte von Jurkat-Zellen verwendet, welche humane akute T-Leukämie-Zellen darstellen und dieses Protein exprimieren. Als Ladekontrolle diente der Nachweis des in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Strukturproteins β -Aktin (48 kDa) (siehe Kap. 2.2.7.5). Weisen die β -Aktin Banden des Western Blots die gleiche Intensität auf, so geht man von gleichmäßig beladenen Geltaschen aus.

Über das Molekulargewicht des Bcl-3 Proteins gibt es unterschiedliche Angaben in der Literatur. Diese reichen von 55 bis 77 kDa [105–107]. Grund hierfür sind die verschiedenen Isoformen in denen das Protein vorliegen kann. Hierdurch, sowie durch posttranslationale Modifikation, etwa durch Phosphorylierung oder Glykolisierung, ergeben sich je nach exprimierender Zellart verschiedene Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Bei den hier vorliegenden Western Blots wurde die Bcl-3 Bande bei circa 70 kDa identifiziert. Die Detektion des Bcl-3 Proteins erfolgte mit dem polyklonalen IgG Antikörper H-146, welcher die Aminosäuren C301-446 am C-terminalen Ende des Bcl-3 Proteins erkennt [212]. Da der Antikörper nicht selektiv Bcl-3 detektiert, sind viele weitere Proteine auf den Western Blots zu sehen. So sind etwa Schlieren durch Verunreinigungen mit dem im Blut vorkommenden Protein HSA (67 kDa) zu erkennen (siehe Abbildung 199). Im Folgenden werden die einzelnen Bcl-3- und β -Aktin-Banden als Ausschnitte gezeigt. Im Anhang befindet sich zu jeder Versuchsordnung ein vollständiger Western Blot samt dazugehörigem β -Aktin Blot.

3.2.1 Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen

Für die Suspensionsversuche wurden die gewaschenen Plättchen im Medium HBSS unter Fibrinogenzusatz (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resuspendiert. Danach erfolgte die Inkubation der Zellen für vier Stunden unter Zugabe der Toxine bei 37°C im Thermomixer unter leichter Bewegung. Bevor die Proben für die Western Blot Analyse weiterverarbeitet wurden, erfolgte eine mikroskopische Untersuchung. Dabei war zu erkennen, dass die mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ α -Toxin (siehe Abbildung 77) und 750 HU/ml SLO (siehe Abbildung 78) behandelten Thrombozyten im Gegensatz zur Kontrollprobe (siehe Abbildung 76) aggregiert und aufgequollen vorlagen. Die mit 0,1 U/ml Thrombin stimulierten Plättchen bildeten wie erwartet ebenfalls Aggregate aus (siehe Abbildung 79). Mit 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS versetzte Thrombozyten lagen nach vier Stunden nicht aggregiert vor (siehe Abbildung 80).



Abbildung 76 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen



Abbildung 77 Mikroskopische Aufnahme von α -Toxin (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen



Abbildung 78 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

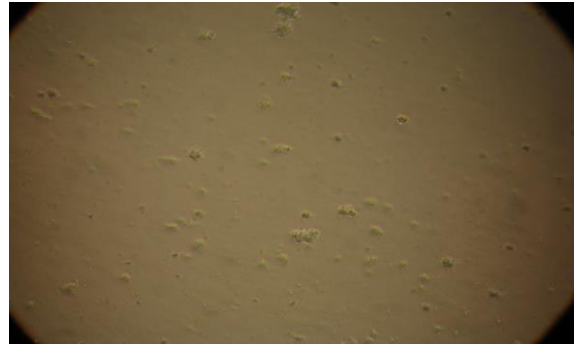


Abbildung 79 Mikroskopische Aufnahme von Thrombin (0,1 U/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen



Abbildung 80 Mikroskopische Aufnahme von mit LPS (0,1 µg/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Während der Versuche fiel auf, dass die Eppendorf-Reaktionsgefäße von stimulierten Thrombozyten, in denen die Suspensionsversuche stattfanden, im Vergleich zur Kontrollprobe lichtdurchlässiger erschienen. So erkennt man in Abbildung 81 bei den stimulierten Proben die blaue Markierung im Hintergrund der Reaktionsgefäße besser als bei der trüben Kontrollprobe. Da aggregierte Zellen eine erhöhte Lichtdurchlässigkeit in Suspension aufweisen, bestätigt dies die unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung beobachteten Bilder. Nach der Zentrifugation der Plättchensuspension fiel weiterhin auf, dass die mit α -Toxin (siehe Abbildung 82) und SLO (siehe

Abbildung 98) behandelten Thrombozyten ein deutlich größeres Pellet aufwiesen, welches für den unter dem Mikroskop beobachteten aufgequollenen Zustand dieser Zellen spricht.

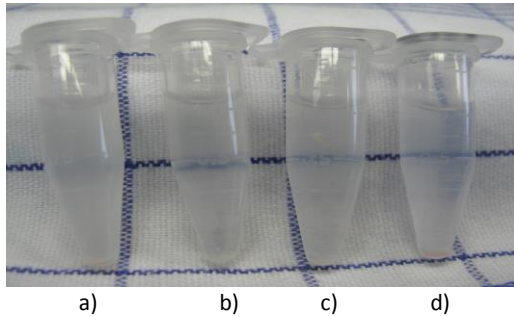


Abbildung 81 Aggregierte Thrombozyten in Suspensionen mit Fibrinogen zeigen eine erhöhte Lichtdurchlässigkeit

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (Kontrolle) (a), mit 0,5 µg/ml α-Toxin (b), 0,1 U/ml Thrombin (c) und 750 HU/ml SLO (d) für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen stimuliert. Die aggregierten Thrombozyten zeigen im Vergleich zur Kontrollprobe eine erhöhte Lichtdurchlässigkeit, wodurch die im Hintergrund befindliche blaue Markierung sichtbar wurde.

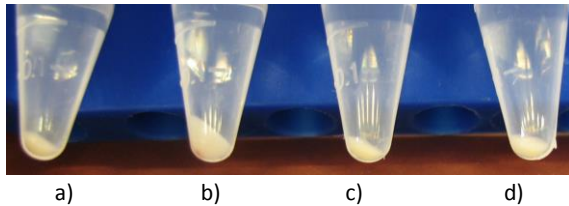


Abbildung 82 Thrombozytenpellets nach Zentrifugation von in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Plättchen

Thrombozyten wurden vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen ohne Stimuli (a), mit 0,5 µg/ml α-Toxin (b), mit 0,1 µg/ml LPS von *E. coli* (c) und 0,1 U/ml Thrombin (d) inkubiert. Die α-Toxin-Probe ist nach der Zentrifugation als deutlich größeres Thrombozytenpellet zu erkennen.

Die Ergebnisse der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen wurden als relative Signalintensitäten der Bcl-3 Expression als Balkendiagramm in Abbildung 84 dargestellt. Darüber sind jeweils die Ausschnitte der Bcl-3 Banden der Proben sowie der dazugehörige β-Aktin Western Blot zu sehen (siehe Abbildung 83). Im Balkendiagramm ist ein signifikanter Unterschied zwischen der unstimulierten Kontrollprobe, die gleich eins gesetzt wurde und den stimulierten Proben zu erkennen. Die Expression des Bcl-3 Proteins unter α-Toxin Zusatz (0,5 µg/ml) mit $3,29 \pm 0,36$ bzw. Thrombinzusatz (0,1 U/ml) mit $3,71 \pm 0,91$ unterschied sich nicht wesentlich. Deutlich ist jedoch die Expression unter SLO (750 HU/ml) Stimulation mit $12,31 \pm 1,17$ gestiegen. Mit 1 µg/ml LPS stimulierte Plättchen exprimierten mit $1,31 \pm 0,60$ am wenigsten das Bcl-3-Protein. Im Anhang befindet sich exemplarisch ein vollständig abgebildeter Western Blot zu dieser Versuchsanordnung (siehe Abbildung 200).

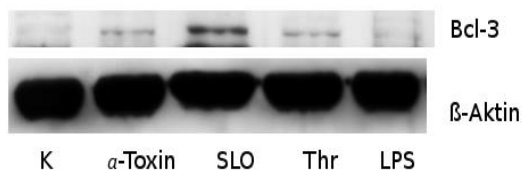


Abbildung 83 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigen β-Aktin Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 µg/ml α-Toxin, 750 HU/ml SLO; 0,1 U/ml Thrombin sowie 1 µg/ml LPS für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

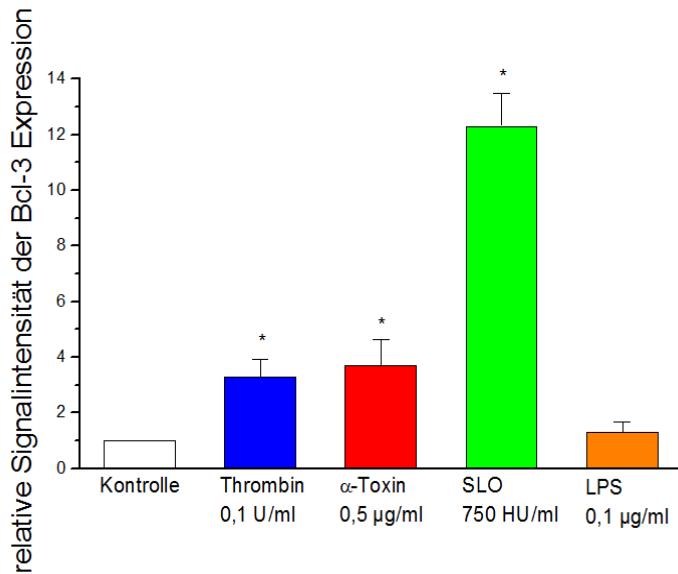


Abbildung 84 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (Kontrolle) bzw. mit 0,1 U/ml Thrombin, 0,5 µg/ml α-Toxin, 750 HU/ml SLO oder 1 µg/ml LPS für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der unstimulierten Kontrolle

In Abbildung 85 bzw. Abbildung 86 ist der Einfluss von Fibrinogen während der Thrombozyteninkubation dargestellt. Thrombozyten wurden mit 0,5 µg/ml α-Toxin und 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit oder ohne Fibrinogen inkubiert. Das Signal der mit Fibrinogen inkubierten Probe wurde gleich eins gesetzt. Ohne den Fibrinogenzusatz ergab sich mit α-Toxin stimulierten Plättchen eine Senkung der relativen Signalintensität auf $0,51 \pm 0,12$. Bei SLO behandelten Thrombozyten konnte eine Erniedrigung der Expression auf $0,38 \pm 0,09$ festgestellt werden. Die vollständigen Western Blots sind im Anhang (Abbildung 201 bzw. Abbildung 202) zu finden.

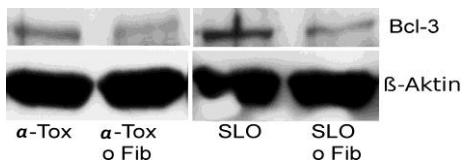


Abbildung 85 Vergleich der Ausschnitte aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigen β-Aktin Blot von Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen

Thrombozyten wurden mit 0,5 µg/ml α-Toxin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen (o Fib) inkubiert.

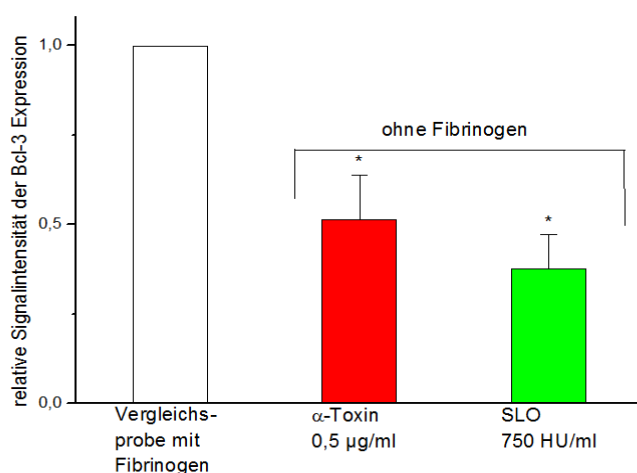


Abbildung 86 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Inkubation der Thrombozyten ohne Fibrinogen

Das Signal der mit 0,5 µg/ml α-Toxin bzw. 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Proben wurde auf eins gesetzt. Im Vergleich dazu, sieht man die relativen Signalintensitäten der Bcl-3 Expression der Proben ohne Fibrinogenzusatz.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsprobe mit Fibrinogen

3.2.2 Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärent an Fibrinogen

Bei diesen Versuchen wurde die Plättchensuspension auf Fibrinogen beschichtete Zellkulturplatten gegeben. Danach erfolgte die Zugabe der Versuchssubstanzen sowie die Inkubation der Proben für

vier Stunden bei 37°C im Inkubator. Abbildung 87 zeigt deutlich, dass die mit α -Toxin und SLO stimulierten Thrombozyten nach der Inkubationszeit an der Fibrinogenschicht adhärten. Wie in der Abbildung zu sehen ist, mussten bei diesen Proben, anders als bei der Kontroll- und Thrombin stimulierten Probe, die Zellen regelrecht von der Fibrinogenschicht abgekratzt werden, um sie im Anschluss weiterverarbeiten zu können.

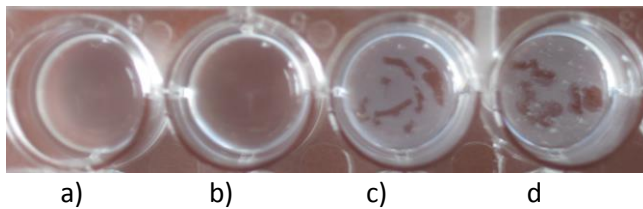


Abbildung 87 Blick auf adhärenente Thrombozyten in mit Fibrinogen beschichteten Zellkulturplatten

Die Thrombozytensuspension wurde für vier Stunden ohne Stimuli (a), mit 0,1 U/ml Thrombin (b); 0,5 µg/ml α -Toxin (c) sowie 750 HU/ml SLO (d) auf Fibrinogen inkubiert. Die α -Toxin und SLO stimulierten Plättchen adhärten an der Fibrinogenschicht und mussten zur Weiterverarbeitung abgekratzt werden.

Die Expression des Bcl-3 Proteins von adhärenenten Plättchen ähnelt der Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen, ist jedoch generell etwas niedriger (siehe Abbildung 88 und Abbildung 89). Im Vergleich zur Kontrollprobe waren die stimulierten Proben ebenfalls signifikant erhöht. Eine Messung mit LPS erfolgte nicht mehr. Mit Thrombin (0,1 U/ml) aktivierte Plättchen zeigten eine relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von $1,8 \pm 0,46$. α -Toxin (0,5 µg/ml) behandelte Thrombozyten wiesen eine nur unwesentlich erhöhte Expressionsrate von $1,99 \pm 0,63$ auf. Bei den mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Blutplättchen ergab sich wieder eine deutlich erhöhte relative Bcl-3 Expression von $7,97 \pm 0,84$. Im Anhang zeigt Abbildung 203 die vollständigen Western Blots zu diesem Versuch.

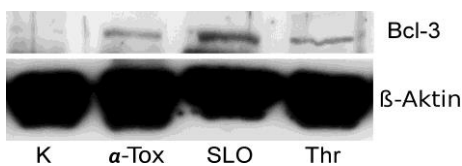


Abbildung 88 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten adhärenent an Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 µg/ml α -Toxin; 750 HU/ml SLO oder 0,1 U/ml Thrombin für vier Stunden auf Fibrinogen inkubiert.

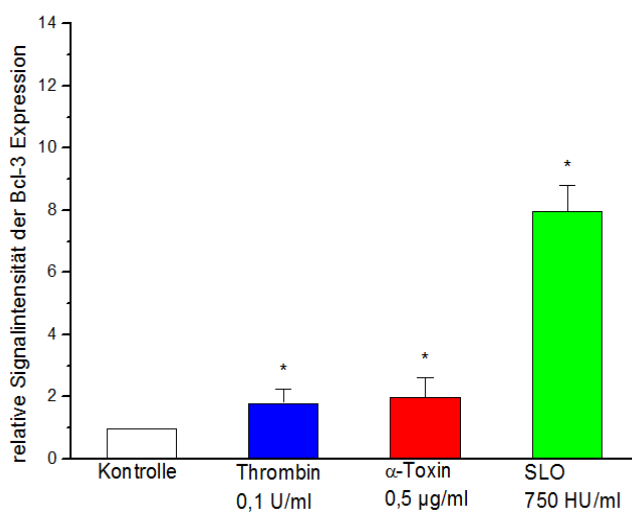


Abbildung 89 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärenent an Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (Kontrolle) bzw. mit 0,1 U/ml Thrombin, 0,5 µg/ml α -Toxin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden auf Fibrinogen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der unstimulierten Kontrolle

2.2.3 Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhärenent an Kollagen

Zur Durchführung der Kollagen-Adhäsionsversuche wurden die Zellkulturplatten nun mit Kollagen beschichtet. Im Anschluss wurden diese ebenfalls mit der Thrombozytensuspension versehen und unter Zusatz der Versuchssubstanzen für vier Stunden inkubiert. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den an Fibrinogen adhärenen Plättchen. So konnte auch beobachtet werden, dass α -Toxin (0,5 μ g/ml) und SLO (750 HU/ml) stimulierte Plättchen an der Kollagenschicht adhären. Ebenso waren die stimulierten Proben im Vergleich zur Kontrollprobe wieder signifikant erhöht (siehe Abbildung 90 und Abbildung 91). Die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression war mit $2,53 \pm 0,57$ bei den Thrombin (0,1 U/ml) und $2,85 \pm 1,05$ bei den mit α -Toxin (0,5 μ g/ml) stimulierten Plättchen etwas höher als bei den an Fibrinogen adhärenen Thrombozyten. Die Bcl-3 Expression von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten war dagegen im Durchschnitt mit $6,95 \pm 1,34$ etwas niedriger. Die Abbildung 203 zeigt hierzu die vollständigen Western Blots im Anhang.

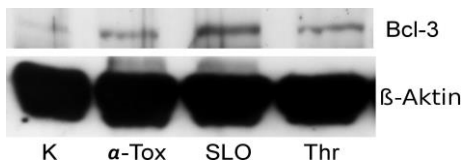


Abbildung 90 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten adhären an Kollagen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 μ g/ml α -Toxin; 750 HU/ml SLO oder 0,1 U/ml Thrombin für vier Stunden auf Kollagen inkubiert.

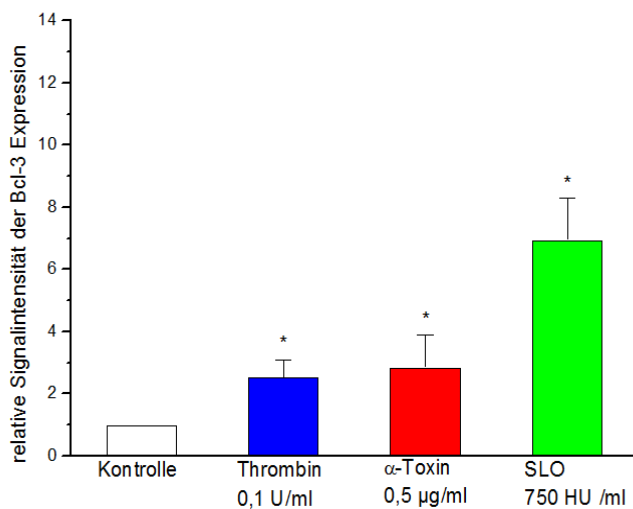


Abbildung 91 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten adhären an Kollagen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) mit 0,1 U/ml Thrombin, 0,5 μ g/ml α -Toxin oder 750 HU/ml SLO bzw. für vier Stunden auf Kollagen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der unstimulierten Kontrolle

3.2.4 Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Zeit

Nachdem festgestellt wurde, dass die untersuchten bakteriellen Toxine genauso wie der physiologische Agonist Thrombin in der Lage sind die Bcl-3 Expression in Thrombozyten anzuregen, wurde auch die Zeitabhängigkeit der Protein-Expression untersucht. Aus Zeitgründen und da SLO im Vergleich mit Thrombin und α -Toxin stimulierten Plättchen bei den Suspensions- und Adhäsionsversuchen eine deutlich erhöhte Bcl-3 Expression zeigte, schien die weitere Untersuchung der SLO vermittelte zeitabhängige Expression von Bcl-3 besonders interessant zu sein.

Die Versuche der zeitabhängigen Bcl-3 Expression wurden in Suspension mit Fibrinogen unter Zusatz von 750 U/ml SLO durchgeführt. Nach bestimmten Zeitpunkten, maximal jedoch 24 Stunden (siehe Abbildung 92 und Abbildung 93), wurde die Inkubation der Plättchen mit SLO gestoppt und die Proteinexpression mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die SLO vermittelte Bcl-3 Expression in Thrombozyten zeigt innerhalb von 24 Stunden einen Gauß'schen Kurvenverlauf (siehe Abbildung 92 und Abbildung 93). Bis auf den letzten Inkubationszeitpunkt nach 24 Stunden war zu jedem anderen gemessenen Zeitpunkt die Bcl-3 Expression im Vergleich zur Kontrollprobe signifikant erhöht. Nach vier Stunden ist eine maximale relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von $12,34 \pm 1,32$ erreicht. Danach fällt die Signalintensität bis auf $2,73 \pm 1,45$ nach 24 Stunden ab. Abbildung 204 zeigt im Anhang die vollständigen Bcl-3 und β -Aktin Western Blots.

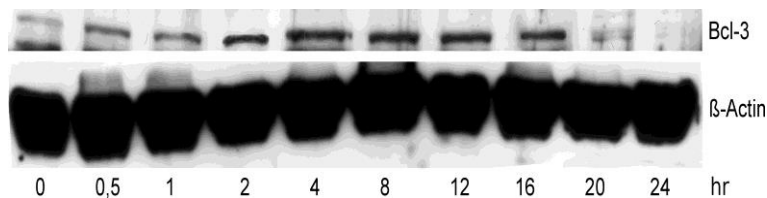


Abbildung 92 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO über einen Zeitraum von 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiträumen (in hr) wurde die Reaktion gestoppt.

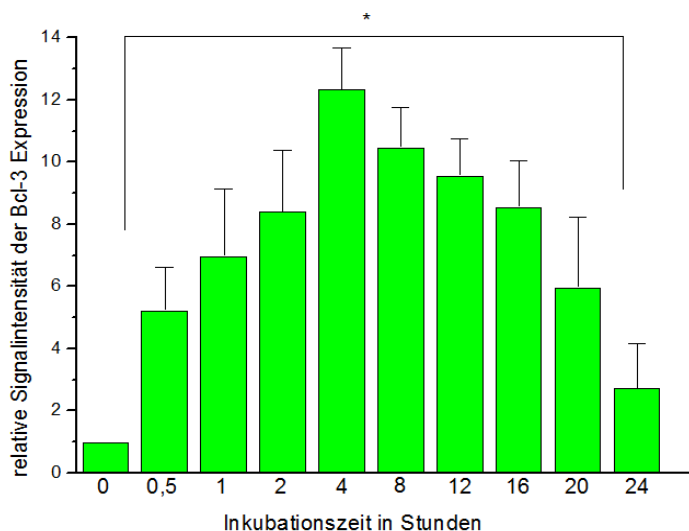


Abbildung 93 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Thrombozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO über einen Zeitraum von 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiträumen (in hr) wurde die Reaktion gestoppt.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsprobe (0 Stunden)

Vor der Weiterverarbeitung der Proben erfolgten regelmäßige mikroskopische Betrachtungen der Thrombozyten. So lagen beispielsweise die Blutplättchen der Kontrollprobe (siehe

Abbildung 94) noch nach 12 Stunden Inkubationszeit im Gegensatz zur SLO stimulierten Probe (siehe Abbildung 95) in einem unaggregierten Zustand vor.

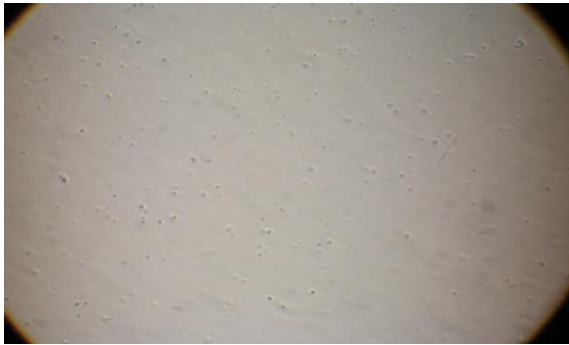


Abbildung 94 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach 12 Stunden in Suspension mit Fibrinogen



Abbildung 95 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach 12 Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Auch die Ergebnisse der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression der Kontrollproben nach vier und 24 Stunden Inkubationszeit zeigten trotz der langen Inkubationszeiträume keine signifikante Expression im Vergleich zur stimulierten Probe. Während nach vier Stunden die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von SLO (750 HU/ml) stimulierten Plättchen $12,35 \pm 1,32$ betrug, ergab sich bei der Kontrollprobe ein Wert von $1,34 \pm 0,53$. Nach 24 Stunden war der Wert der relativen Bcl-3 Expression der unstimulierten Probe mit $0,79 \pm 0,45$ immer noch kleiner als die Expressionsrate der SLO stimulierten Probe mit $2,73 \pm 1,45$. Abbildung 205 und Abbildung 206 im Anhang zeigen die vollständigen Western Blots.

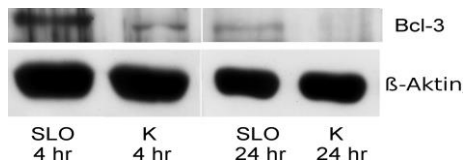


Abbildung 96 Vergleich der Ausschnitte aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β-Aktin Blot von unstimulierten und mit SLO stimulierten Thrombozyten nach vier bzw. 24 Stunden.

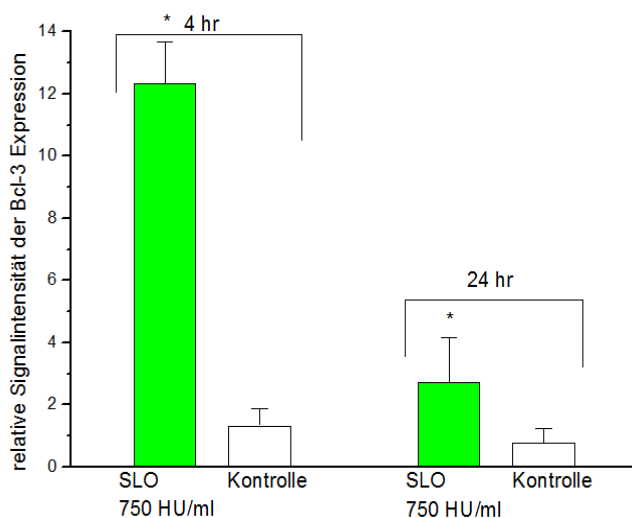


Abbildung 97 Vergleich der relativen Signalintensitäten der Bcl-3 Expression von unstimulierten und mit SLO stimulierten Thrombozyten nach vier bzw. 24 Stunden

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO bzw. ohne Stimuli (Kontrolle) für vier bzw. 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. * Werte unterscheiden sich signifikant von den Kontrollproben

3.2.5 Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO-Konzentration

Nachdem die Zeitabhängigkeit der Bcl-3 Expression betrachtet wurde, erfolgte die Untersuchung der Abhängigkeit der Bcl-3 Expression von der Toxinkonzentration. Für diese Versuche wurde die Thrombozytensuspension mit steigenden Mengen an SLO versetzt und für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Hierbei fiel auf, dass ab einer Konzentration von etwa 750 HU/ml SLO, das Thrombozytenpellet nach der Zentrifugation, ähnlich wie bei den mit α -Toxin inkubierten Thrombozyten, im Vergleich zur Kontrollprobe wesentlich größer erschien (siehe

Abbildung 98). Unter dem Mikroskop waren jedoch schon ab einer Konzentration von 250 HU/ml SLO-Zusatz aufgequollene und aggregierte Plättchen zu erkennen (siehe

Abbildung 99 bis

Abbildung 103).



Abbildung 98 Thrombozytenpellets von mit SLO in steigender Konzentration stimulierten Plättchen

Thrombozyten wurden mit (von links nach rechts) 125-, 250-, 500-, 750-, 1000-, 1500-, 2000-, 2500 HU/ml SLO versetzt und für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen suspendiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zentrifugation der Proben, wobei ab einer Konzentration von 750 HU/ml SLO vergrößerte Thrombozytenpellets auffielen.

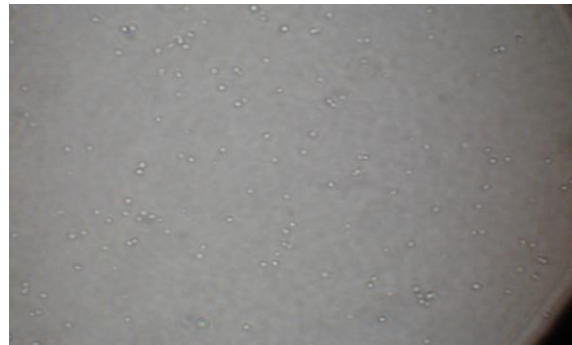


Abbildung 99 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen



Abbildung 100 Mikroskopische Aufnahme von SLO (125 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

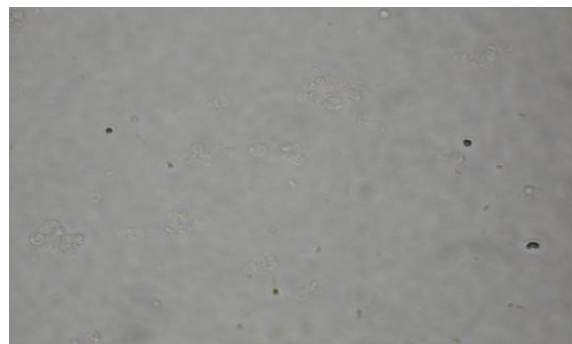


Abbildung 101 Mikroskopische Aufnahme von SLO (250 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

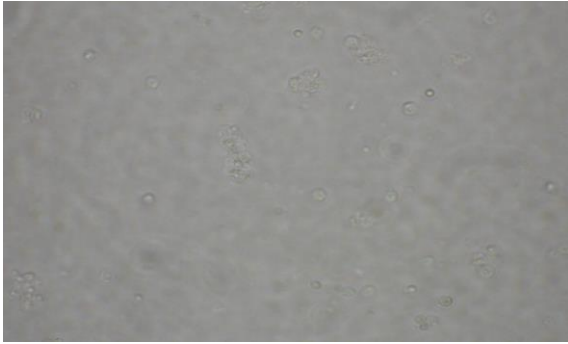


Abbildung 102 Mikroskopische Aufnahme von SLO (500 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

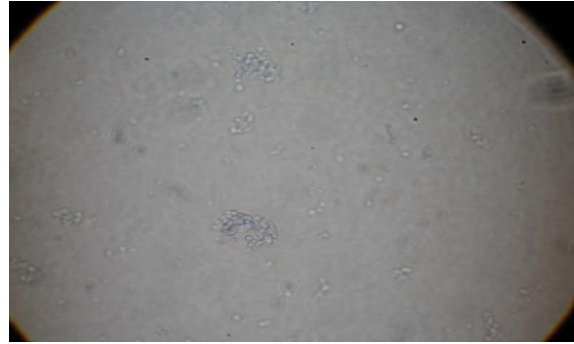


Abbildung 103 Mikroskopische Aufnahme von SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Die Abbildung 104 bzw. Abbildung 105 zeigt die konzentrationsabhängige Bcl-3 Expression. Der Wert der relativen Signalintensität steigt dabei bis zu einer Konzentration von etwa 2000 HU/ml SLO auf $21,86 \pm 2,05$ an und kann bei weiterer Erhöhung der Toxinkonzentration auf 3000 HU/ml nicht mehr signifikant gesteigert werden. Die Werte der SLO stimulierten Thrombozyten unterscheiden sich dabei signifikant von der Kontrollprobe. Bei Thrombozyten, die mit mehr als 3000 HU/ml an SLO versetzt wurden, konnte kein Western Blot durchgeführt werden, da vermutlich durch die große Anzahl gebildeter Toxinporen die intrazelluläre Proteinmenge für die Detektion zu gering war. Bei den durchflusszytometrischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich trotz dieser hohen Toxinmengen die Plättchenanzahl (Events) kaum reduzierte, was für die Perforation und gegen eine Lyse der Zellen spricht. Die im Anhang befindliche Abbildung 207 zeigt die vollständigen Bcl-3 und β -Aktin Western Blots.

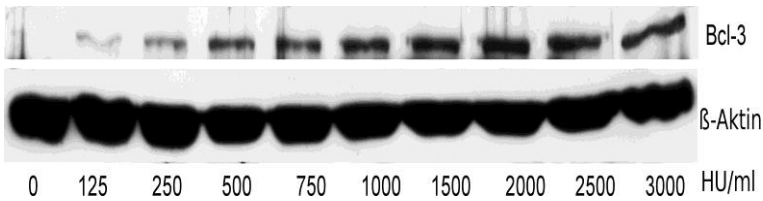


Abbildung 104 Ausschnitt aus dem Bcl-3-Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen

Thrombozyten wurden mit verschiedenen SLO-Konzentrationen (in HU/ml) für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

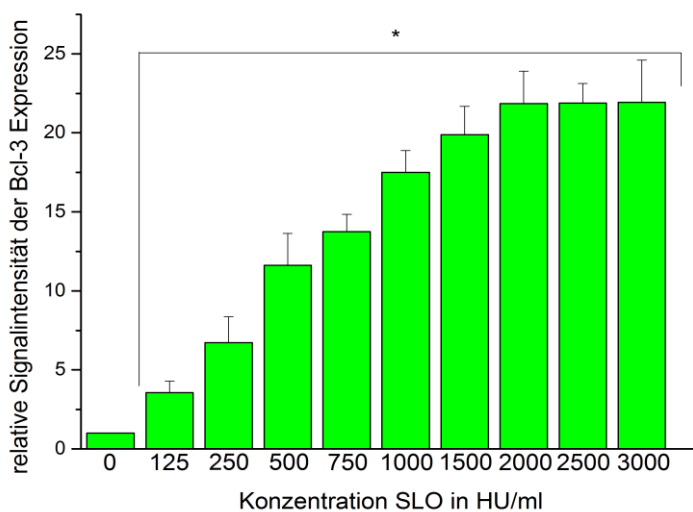


Abbildung 105 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO-Konzentration

Thrombozyten wurden mit steigenden Konzentrationen an SLO (in HU/ml) für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsprobe (0 HU/ml)

Es erfolgte auch die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Bcl-3 Expression von SLO, welches mit 20 mM Cystein versetzt, wurde. Nach etwa 1500 HU/ml wurde ein Maximalwert für die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von $21,56 \pm 4,11$ bestimmt (siehe Abbildung 106 und Abbildung 107). Obwohl das Reduktionsmittel laut Literatur die Wirkung des Toxins verstärken sollte, konnte lediglich bei einer Konzentration von 750- und 1000 HU/ml ein signifikanter Unterschied zwischen der SLO und SLO mit Cysteinzusatz vermittelten Bcl-3 Expression bestimmt werden (siehe Abbildung 108). Abbildung 208 im Anhang zeigt die dazugehörigen kompletten Western Blots.

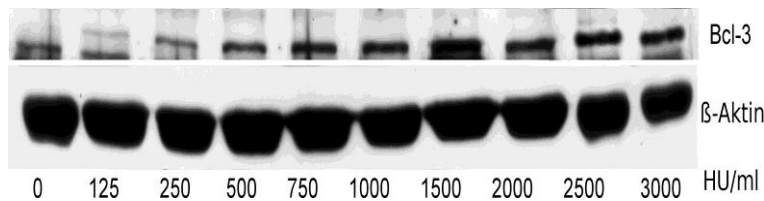


Abbildung 106 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β-Aktin Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen unter Zusatz von Cystein

Thrombozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen (in HU/ml) an SLO mit Cysteinzusatz für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

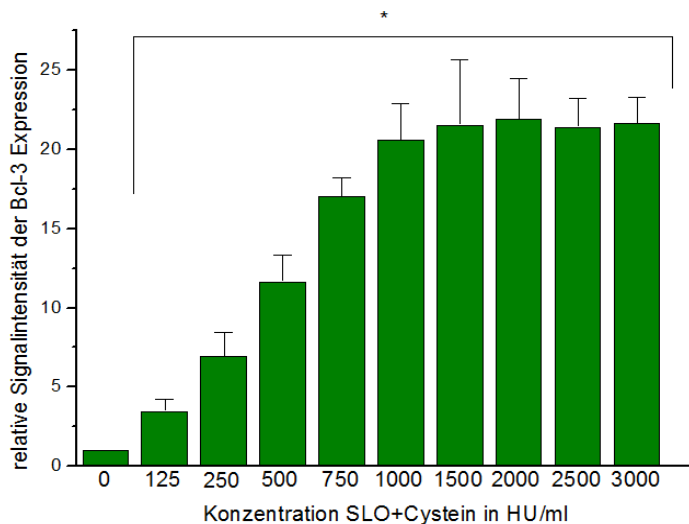


Abbildung 107 Relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten in Abhängigkeit von der SLO Konzentration unter Zusatz von Cystein

Thrombozyten wurden mit steigenden Konzentrationen (in HU/ml) an SLO mit Cysteinzusatz für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsprobe (0 HU/ml)

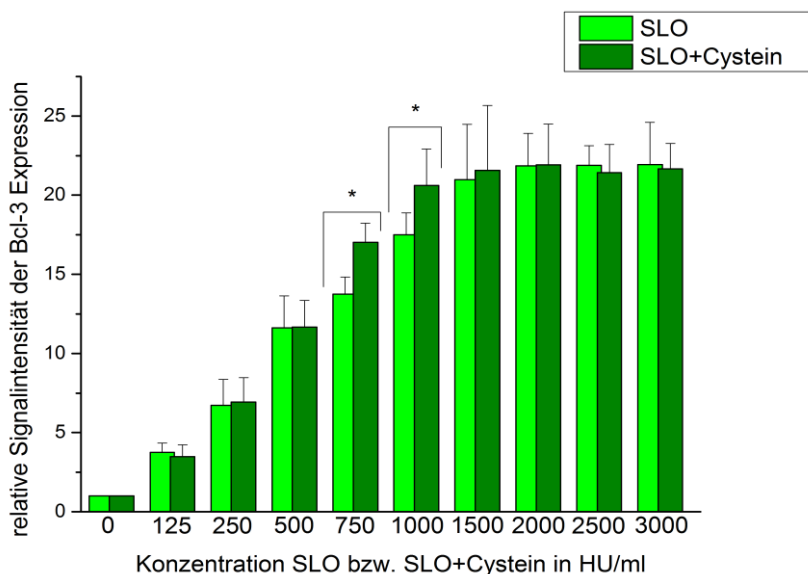


Abbildung 108 Vergleich der relativen Signalintensitäten der Bcl-3 Expression von Thrombozyten stimuliert mit unterschiedlichen Konzentrationen an SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz

Thrombozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

*nur die Expression zwischen den mit 750- sowie 1000 HU/ml SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz stimulierten Thrombozyten unterschied sich signifikant

Um eine alleinige Wirkung von Cystein auf die Thrombozyten auszuschließen wurden Versuche durchgeführt, in denen die Blutplättchen mit SLO unter Cysteinzusatz bzw. nur mit Cystein in entsprechender Menge versetzt wurden. Dabei wurden die gereinigten Thrombozyten mit den Versuchssubstanzen für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die mit 500- bzw. 750 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz versetzten Thrombozyten aggregierten (siehe

Abbildung 110 und

Abbildung 112). Bei den nur mit Cystein versetzten Proben konnten hingegen keine aggregierten Plättchen beobachtet werden (siehe

Abbildung 109 und

Abbildung 111). Die mikroskopischen Bilder entsprachen hierbei denen der unstimulierten Kontrollproben (siehe

Abbildung 99).

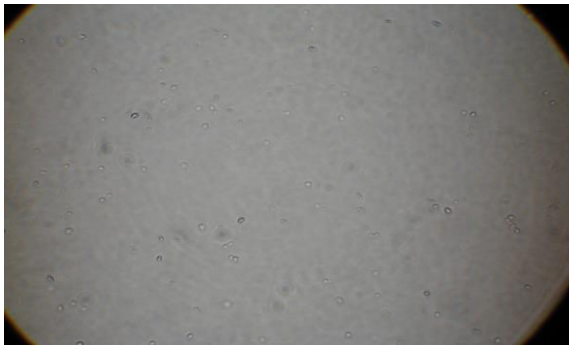


Abbildung 109 Mikroskopische Aufnahme von nur mit Cystein stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Es wurde nur die entsprechende Menge an Cystein zugegeben, die auch bei den Versuchen mit 500 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz zugesetzt wurde.

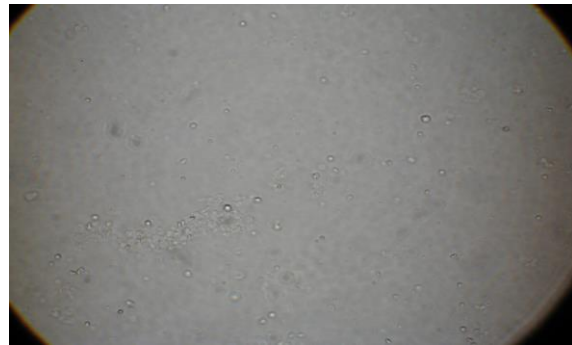


Abbildung 110 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (500 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

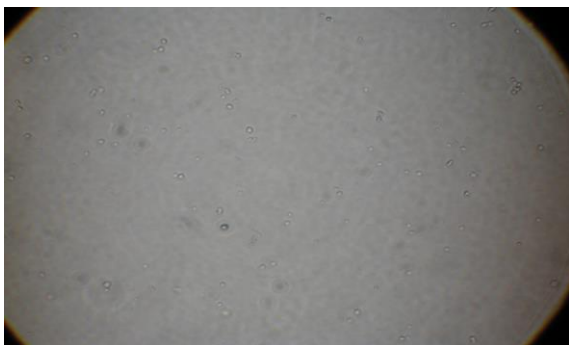


Abbildung 111 Mikroskopische Aufnahme von nur mit Cystein stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Es wurde nur die entsprechende Menge an Cystein zugegeben, die auch bei den Versuchen mit 750 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz zugesetzt wurde.

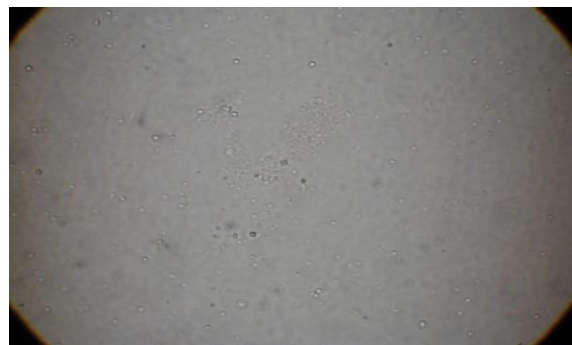


Abbildung 112 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Die in Abbildung 113 und Abbildung 114 dargestellte Bcl-3 Expression bestätigt die mikroskopischen Beobachtungen. Die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression der Thrombozyten, die mit SLO unter Cysteinzusatz stimuliert wurden, betrug bei einer Konzentration von 500 HU/ml $11,63 \pm 2,01$ bzw. bei 750 HU/ml $13,74 \pm 1,1$. Die Werte bei den nur mit Cystein in entsprechender Menge behandelten Thrombozyten blieben mit $1,49 \pm 0,41$ bzw. $1,21 \pm 0,29$ auf Kontrollniveau. Es besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der mit SLO unter Cysteinzusatz stimulierten Plättchen und den nur mit Cystein versetzten Thrombozyten. Abbildung 209 und Abbildung 210 im Anhang zeigen die vollständigen Western Blots.

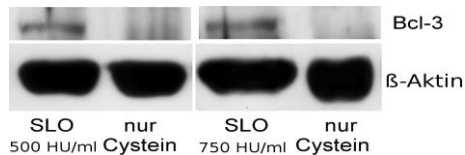


Abbildung 113 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β -Aktin Blot von Thrombozyten inkubiert mit SLO mit Cysteinzusatz bzw. nur Cystein

Thrombozyten wurden mit 500- bzw. 750 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz oder nur Cystein in jeweils entsprechender Menge für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

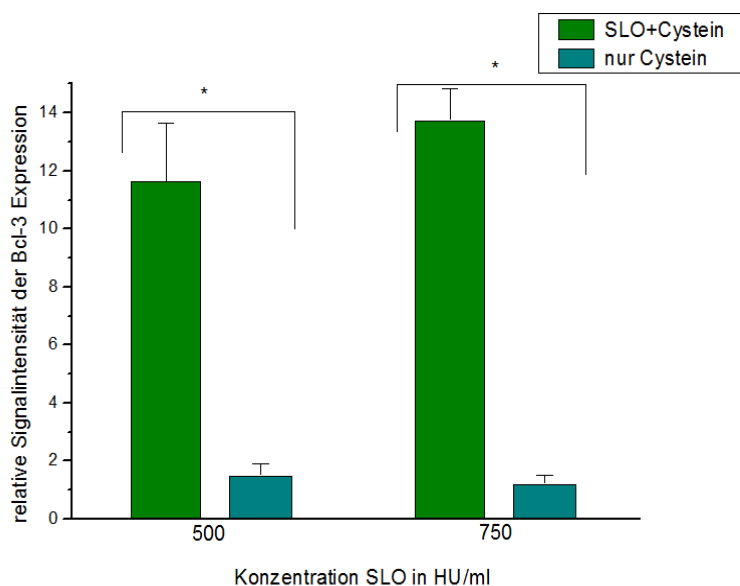


Abbildung 114 Vergleich der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten stimuliert mit SLO mit Cysteinzusatz bzw. nur mit Cystein

Thrombozyten wurden mit 500- bzw. 750 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz oder nur Cystein in jeweils entsprechender Menge für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

* Werte unterscheiden sich signifikant innerhalb derselben Konzentration zwischen SLO mit Cysteinzusatz bzw. nur mit Cystein stimulierten Thrombozyten

3.2.6 Inhibierung der SLO induzierten Bcl-3 Expression

Um die Mechanismen der thrombozytären Translation zu untersuchen, wurde der globale Translationsinhibitor Puromycin eingesetzt. Die Thrombozytensuspension wurde hierfür mit Puromycin in 1 mM Konzentration für eine halbe Stunde vorinkubiert. Im Anschluss wurden die Versuchssubstanzen zugesetzt und es erfolgte die Inkubation für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen.

Abbildung 115 und Abbildung 116 zeigen deutlich die verminderte Expression von Bcl-3 im Vergleich zu den nicht mit Puromycin behandelten Proben, welche gleich eins gesetzt wurden. Die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression der mit Puromycin vorbehandelten Kontrolle konnte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf $0,53 \pm 0,17$ reduziert werden. Bei der mit Thrombin (0,1 U/ml) versetzten Probe erfolgte eine Reduktion auf $0,57 \pm 0,07$. Die relativen Signalstärken der mit α -Toxin (0,5 μ g/ml) und SLO (750 HU/ml) stimulierten Thrombozyten wurden unter Puromycinzusatz noch weiter auf $0,41 \pm 0,17$ bzw. $0,40 \pm 0,11$ gesenkt. Der komplette Western Blot hierzu befindet sich im Anhang unter Abbildung 211.

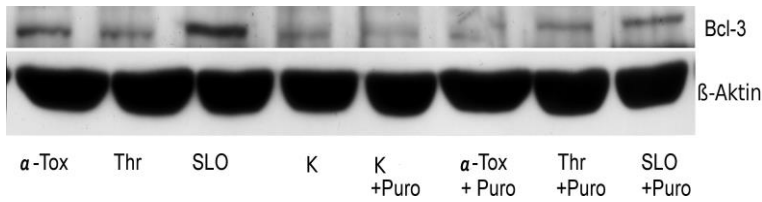


Abbildung 115 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem β-Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Puromycin

Thrombozyten wurden mit bzw. ohne Zusatz von 1 mM Puromycin, sowie ohne Stimuli (K), mit 0,5 µg/ml α-Toxin; 0,1 U/ml Thrombin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

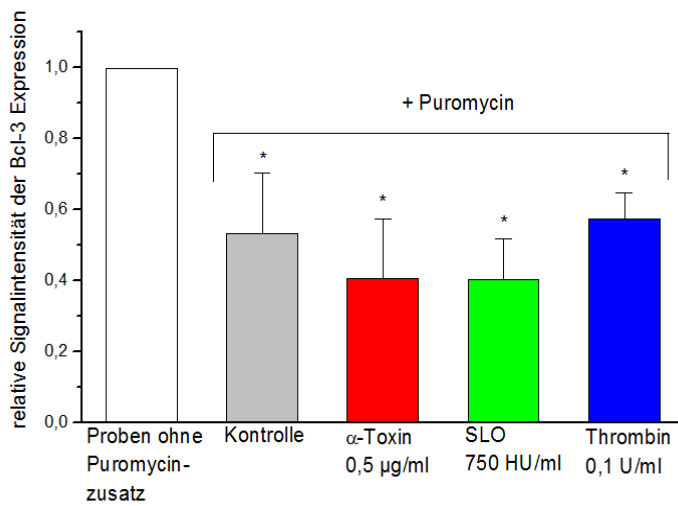


Abbildung 116 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Puromycin

Das Signal der nicht mit Puromycin behandelten Proben, also der Kontrolle (K), der mit 0,1 U/ml Thrombin, mit 0,5 µg/ml α-Toxin oder mit 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Plättchen wurde auf eins gesetzt. Im Vergleich dazu sieht man die reduzierte relative Signalintensität der mit jeweils 1 mM Puromycin vorbehandelten Proben. * Werte unterscheiden sich signifikant von den nicht mit Puromycin vorbehandelten Vergleichsproben

Ähnlich wie Puromycin konnte auch der mTOR Inhibitor Rapamycin das Signal der relativen Bcl-3 Expression um etwa die Hälfte reduzieren (siehe Abbildung 117 und Abbildung 118). Bei dieser Versuchsreihe wurden die Thrombozyten für eine halbe Stunde mit 1 mM Rapamycin vorinkubiert und nach dem Zusatz der Versuchssubstanzen für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Die erhaltenen Werte für die Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression betragen für die Kontrollprobe $0,56 \pm 0,09$. Bei mit Thrombin (0,1 U/ml) stimulierten Plättchen konnte eine Reduktion der Signalintensität auf $0,51 \pm 0,15$ unter Rapamycinzusatz erreicht werden. Das Signal für die α-Toxin vermittelte Bcl-3 Expression wurde auf $0,50 \pm 0,08$ gesenkt. Die größte Reduktion auf $0,36 \pm 0,09$ konnte bei den mit SLO (750 HU/ml) versetzten Plättchen erhalten werden. Abbildung 212 zeigt im Anhang die vollständigen Western Blots.

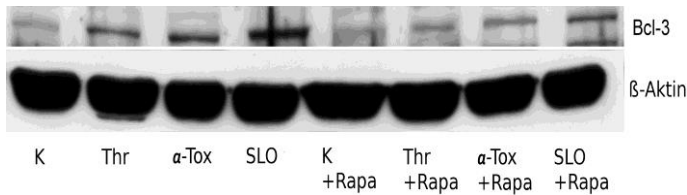


Abbildung 117 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem beta-Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Rapamycin

Thrombozyten wurden mit bzw. ohne Zusatz von 1 mM Rapamycin, sowie ohne Stimuli (K), mit 0,1 U/ml Thrombin, 0,5 µg/ml alpha-Toxin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

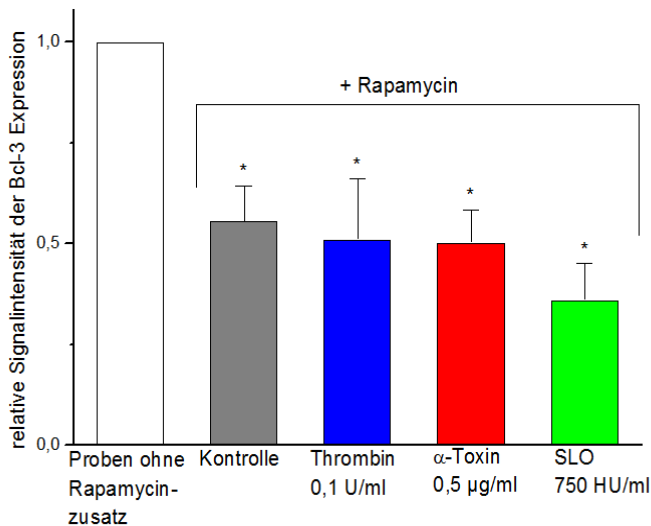


Abbildung 118 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Rapamycin

Das Signal der nicht mit Rapamycin behandelten Proben, also der Kontrolle (K), der mit 0,1 U/ml Thrombin, mit 0,5 µg/ml alpha-Toxin oder mit 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Plättchen wurde auf eins gesetzt. Im Vergleich dazu sieht man die reduzierte relative Signalintensität der mit jeweils 1 mM Rapamycin vorbehandelten Proben.

* Werte unterscheiden sich signifikant von den nicht mit Rapamycin vorbehandelten Vergleichsproben

Die eingesetzten Thrombozyteninhibitoren Abciximab, Iloprost und NPN konnten ebenso wie die Translationsinhibitoren eine Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression erreichen (siehe Abbildung 119 und Abbildung 120). Untersucht wurden aus zeitlichen Gründen nur die SLO vermittelte Reduktion der Bcl-3 Expression. Die Inhibitoren wurde zeitgleich mit 750 HU/ml SLO zu den Thrombozyten gegeben. Im Anschluss erfolgte die Inkubation für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen. Da keine Blutkonzentrationen für Abciximab, NPN und Iloprost in der Literatur gefunden wurden, wurde die Konzentration gewählt, bei der keine alpha-Toxin induzierte Aggregation bei den Thrombozytenaggregationsmessungen mehr eintrat (siehe Abb. 60 und 62). Bei Iloprost wurde eine noch höhere Konzentration gewählt, da die alpha-Toxin induzierte relative Aggregation mit dem Inhibitor nur auf 20 % abgesenkt werden konnte (siehe Abb. 61). Unter Abciximab wurde das Signal der Bcl-3 Expression von SLO (750 HU/ml) stimulierten Plättchen ohne Inhibitorzugabe, welches gleich eins gesetzt wurde, auf $0,44 \pm 0,11$ gesenkt. Mit Iloprost ergab sich, ähnlich wie unter Rapamycinzusatz, eine Reduktion auf $0,37 \pm 0,15$. Ein Zusatz von NPN konnte das Signal schließlich auf $0,44 \pm 0,12$ reduzieren. Die Abbildung 202 zeigt im Anhang die vollständigen Western Blots.

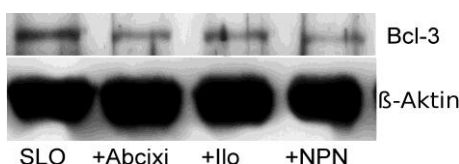


Abbildung 119 Ausschnitt aus dem Bcl-3 Western Blot und dem dazugehörigem beta-Aktin Blot von Thrombozyten inhibiert mit Abciximab, Iloprost und NPN

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO sowie unter Zusatz von 5 µg/ml Abciximab (Abcixi), 50 ng/ml Iloprost (Ilo) oder 25 µg/ml NPN für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert.

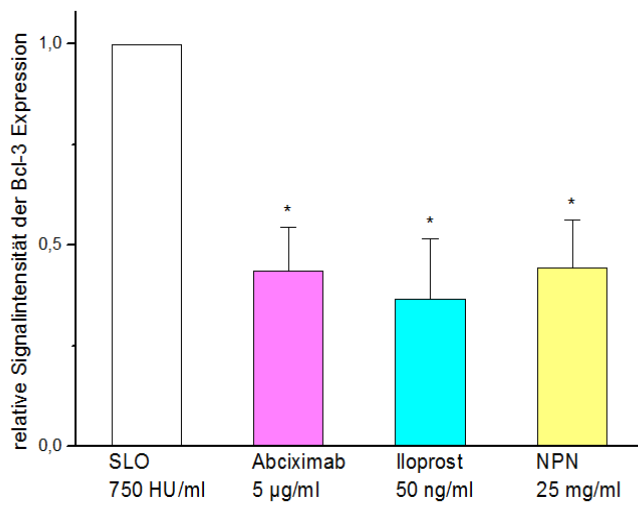


Abbildung 120 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Abciximab, Iloprost und NPN

Die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von Thrombozyten, die mit 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert wurden, wurde gleich eingesetzt. Im Vergleich dazu sieht man die reduzierte relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von mit 750 HU/ml SLO und zusätzlich 5 µg/ml Abciximab oder 50 ng/ml Iloprost oder 25 µg/ml NPN für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubierten Thrombozyten.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der Vergleichsprobe (SLO 750 HU/ml) ohne Medikamentenzusatz

3.3 Durchflusszytometrie

Anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen wurde die toxinvermittelte Aktivierung von Thrombozyten und PMN untersucht. Mit dem fluoreszenzmarkierten Antikörper PAC-1 wurde die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, der über Fibrinogenbrücken die Thrombozytenaggregation vermittelt, erfasst. Nach der Plättchenaktivierung geht dieser Rezeptor in seine aktive Konformation über, wobei hochaffine Bindungsstellen für Fibrinogen freigelegt werden, an denen auch der Antikörper bindet. Des Weiteren wurde die thrombozytäre Degranulation, welche ebenfalls während einer Aktivierung von Thrombozyten eintritt, mit einem Antikörper gegen CD 62P detektiert. CD 62P befindet sich bei ruhenden Plättchen in der Granulamembran und wird im Zuge der Degranulation durch Koaleszenz mit der Plättchenmembran vermehrt auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert. Durch diese Degranulation erfolgt sowohl eine para-, als auch autokrin vermittelte Aktivierung von Plättchen. Bei den PMN kam ein Antikörper gegen CD11b zum Einsatz. Dieser ist Teil des MAC-1 Rezeptors, der bei einer Aktivierung der Zellen vermehrt exprimiert wird.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde die gereinigte Thrombozytensuspension mit den Versuchssubstanzen versetzt und für die ausgewählten Zeiträume inkubiert (siehe Kap. 2.2.9). Im Gegensatz zu den Western Blot Analysen erfolgte kein Zusatz des aggregationsvermittelnden Fibrinogens, da die Thrombozyten für den Messvorgang suspendiert vorliegen mussten. Nach der 15-minütigen Inkubation mit dem Antikörper und der Fixierung mit 2%igen PFA erfolgte zuerst die Vermessung der Kontrollprobe am Durchflusszytometer. Da Rezeptoren eine konstitutive Aktivität zeigen, als auch in Abwesenheit eines Agonisten aktiv sind, und somit auch ein kleiner Anteil der Rezeptoren auf Thrombozyten und PMN physiologischerweise aktiviert vorliegt [213] und die Zellen zum Teil während der Isolationsprozedur aus dem menschlichen Blut aktiviert werden können, wurde nach fünf Minuten Inkubationszeit eine realistische Aktivierung von 5% angenommen. Anschließend erfolgte die Vermessung der Positivprobe. Bei Untersuchungen zur Thrombozytenaktivierung wurde der potente endogene Agonist Thrombin (siehe Kap. 1.4.3) eingesetzt, welches die Plättchen über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor aktiviert. Nur wenn mindestens 80% PAC-1 positive Events mit Thrombin stimulierten Plättchen im Vergleich zur Kontrollprobe erhalten wurden, erfolgte die Vermessung der restlichen Proben auf PAC-1 bzw. CD62P positive Events [214,215]. War dies nicht der Fall, so wurde die Versuchsreihe verworfen. PMN wurden mit PMA (siehe 2.3.3) als Positivkontrolle aktiviert. Auch hier wurde die Versuchsreihe verworfen, wenn nicht mindestens 80% CD11b positive Events erfasst wurden. Die gewonnenen Ergebnisse wurden graphisch dargestellt. Auf der Abszisse wurde die Inkubationszeit aufgetragen, auf der Ordinate sind jeweils die positiven Events in % zu sehen.

3.3.1. Abhängigkeit der GPIIb/IIIa-Aktivierung von der α -Toxin-Konzentration

Die thrombozytenaggregometrischen Untersuchungen haben gezeigt, dass mit α -Toxin stimulierte Plättchen aggregieren, also der Fibrinogenrezeptor α -Toxin vermittelt aktiviert wird (siehe Kap. 3.1.1). Nun wurde untersucht, ob auch anhand durchflusszytometrischer Messungen eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nachgewiesen werden kann. Des Weiteren sollte festgestellt werden, ob der GPIIb/IIIa-Rezeptor eine von der Toxinkonzentration abhängige Aktivierung zeigt.

Für die Versuche wurde die gereinigte Thrombozytensuspension für vier Stunden mit steigenden Konzentrationen an α -Toxin versehen. Nach jeweils fünf Minuten, einer halben-, einer-, zwei- und vier Stunden wurde eine Probe aus den Zellkulturplatten entnommen und mit dem FITC konjugierten PAC-1 Antikörper versehen. Zunächst wurde die unstimulierte Kontrollprobe gemessen. In dem Untersuchungszeitraum von vier Stunden blieben die Kontrollproben nahezu konstant im Bereich von 5% PAC-1 positiven Events (siehe schwarze Kontrolllinie Abbildung 121 bis Abbildung 129). Nachdem auch die mit Thrombin versetzte Positivkontrolle die benötigte Anzahl positiver Events aufwies, erfolgte die Messung der weiteren mit α -Toxin behandelten Proben.

Abbildung 121 zeigt bei einem Zusatz von 0,01 µg/ml α-Toxin nach fünf Minuten $8,5 \pm 2,5\%$ PAC-1 positive Ereignisse. Nach einer halben Stunde ist ein Maximum mit $22,06 \pm 3,08\%$ positiven Events zu sehen. Danach fällt der Wert ab, bis er nach etwa zwei Stunden auf Kontrollniveau sinkt. Höhere Aktivierungswerte und ein ähnlicher Graphenverlauf wurde unter 0,025 µg/ml Toxinzusatz erhalten (siehe Abbildung 122). Hierbei wurden nach fünf Minuten $20,07 \pm 3,88\%$ PAC-1 positive Ereignisse gemessen. Wieder ergab sich nach einer halben Stunde ein Maximum mit $29,79 \pm 6,61\%$ positiven Events. Innerhalb von zwei Stunden fiel der Wert der positiven Events auf circa 10% ab und blieb auch noch nach vier Stunden in diesem Bereich. In Abbildung 123 ist zu sehen, dass bei den mit 0,05 µg/ml α-Toxin stimulierten Plättchen kaum noch ein Unterschied zwischen den Ergebnissen nach fünf Minuten ($34,42 \pm 10,82\%$) und 30 Minuten ($35,13 \pm 6,71\%$) zu erkennen ist. Weiterhin fällt auf, dass die Messwerte nach fünf Minuten, einer halben und einer Stunde sehr schwanken und große Fehlerbalken aufweisen. Da sich diese PAC-1 positiven Events so stark unterschieden, wurden die sechs gemessenen Werte in zwei Gruppen mit ähnlichen Mittelwerten aufgeteilt und anhand der Linien A und B in Abbildung 124 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass diese Konzentration an α-Toxin ein Schwellenwert für die Plättchenaktivierung zu sein scheint. Etwa die Hälfte der gemessenen Werte zeigten das Maximum der positiven Ereignisse nach der ersten halben Stunde (siehe Linie A; $39,58 \pm 6,58\%$). Bei der anderen Hälfte der Ergebnisse, wurde schon nach fünf Minuten der Maximalwert an PAC-1 positiven Events erreicht (siehe Linie A; $43,75 \pm 5,64\%$). Im weiteren zeitlichen Verlauf sank der Wert der GPIIb/IIIa-Aktivierung auf etwa 6% ab und lag somit leicht oberhalb des Kontrollniveaus. Bei den Proben mit 0,1 µg/ml α-Toxin Zusatz (siehe Abbildung 125) konnten mit $49,46 \pm 4,13\%$ positiven Events die meisten Thrombozyten innerhalb von 5 Minuten aktiviert werden. Danach fiel die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors hyperbelartig nach vier Stunden auf $5,72 \pm 2,11\%$ ab. Mit steigender Toxinkonzentration sank die Anzahl an PAC-1 positiven Events nach fünf Minuten (siehe Abbildung 126 mit $26,65 \pm 5,98\%$ und Abbildung 127 mit $14,69 \pm 4,44\%$) zunehmend, bis schließlich kein Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle erkennbar war (siehe Abbildung 128 mit $2,08 \pm 0,67\%$ und Abbildung 129 mit $2,27 \pm 0,52\%$ nach fünf Minuten).

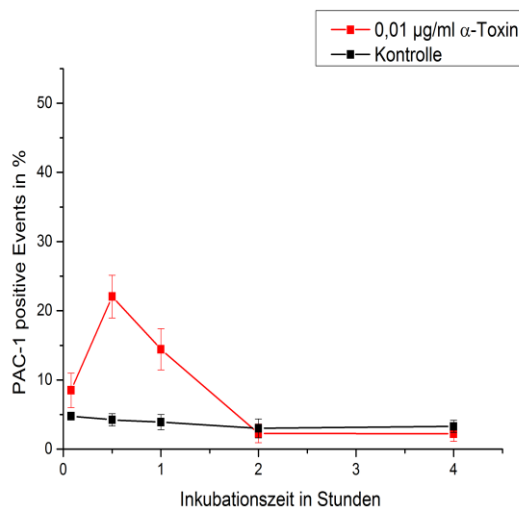


Abbildung 121 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,01 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

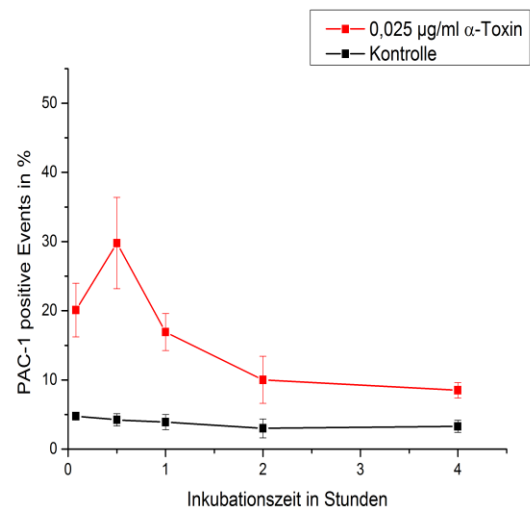


Abbildung 122 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,025 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

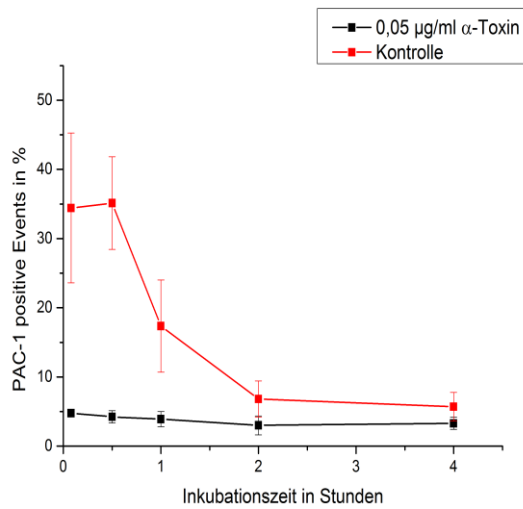


Abbildung 123 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,05 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

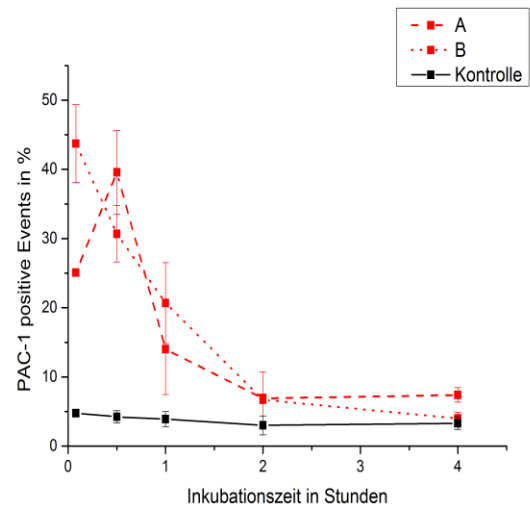


Abbildung 124 Aufgesplitteter Graph von PAC-1 positiven Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,05 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

Die Ergebnisse unterschieden sich so sehr, dass diese in zwei Gruppen mit ähnlichem Mittelwert aufgesplittet wurden und anhand der Linien A und B dargestellt wurden.

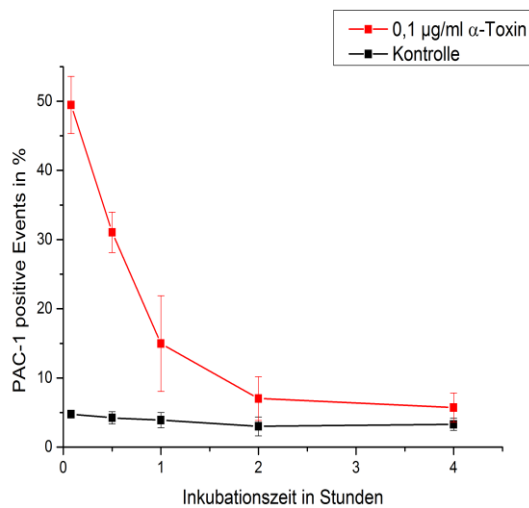


Abbildung 125 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

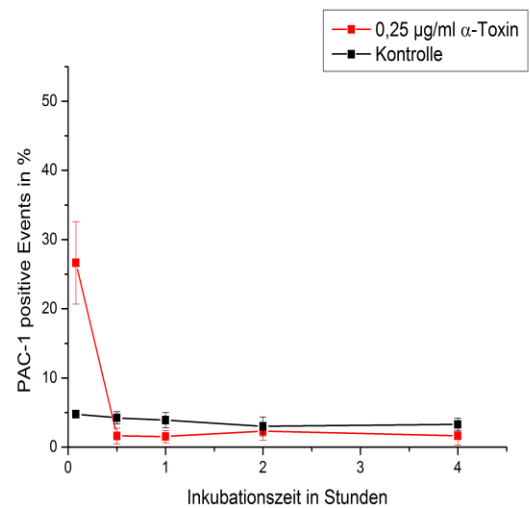


Abbildung 126 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,25 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

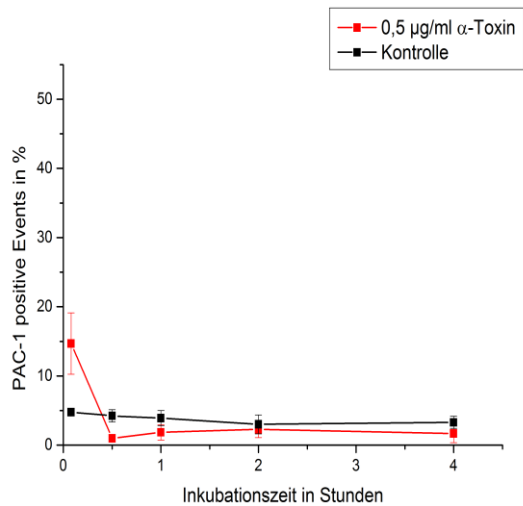


Abbildung 127 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

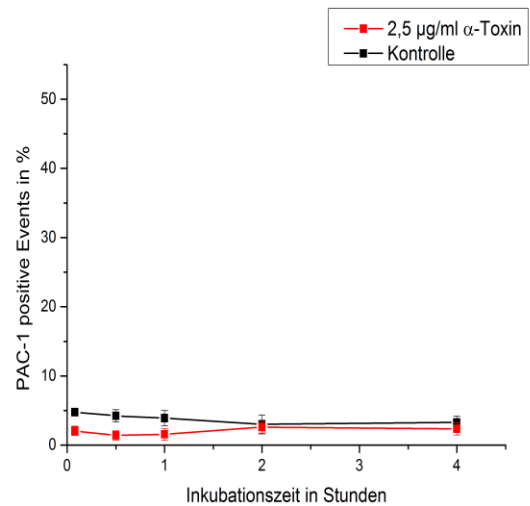


Abbildung 128 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 2,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

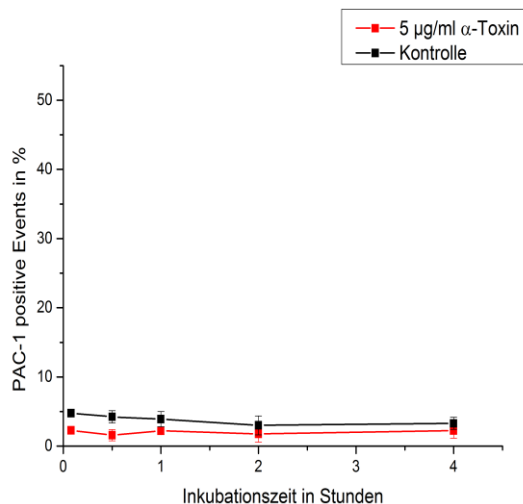


Abbildung 129 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

3.3.2 Abhängigkeit der GPIIb/IIIa-Aktivierung von der SLO-Konzentration

Obwohl mit dem Toxin SLO bzw. mit 20 mM Cystein aktiviertem SLO keine Thrombozytenaggregation innerhalb des Messzeitraums von fünf Minuten erreicht wurde (siehe Kap. 3.1.1), konnte eine GPIIb/IIIa abhängige Bcl-3 Expression festgestellt werden (siehe Kap. 3.2.4 bzw. 3.2.5). Somit war anzunehmen, dass ein kleiner Teil der thrombozytären Fibrinogenrezeptoren, der wahrscheinlich nicht ausreichend war, um eine Aggregation auszulösen, durch das Toxin aktiviert wurde. Der Nachweis hierfür sollte anhand durchflusszytometrischer Messungen erfolgen.

Für die Untersuchungen wurde die gereinigte Thrombozytensuspension mit steigenden SLO-Konzentrationen mit bzw. ohne Cysteinzusatz versetzt und nach fünf Minuten, einer halben, einer, zwei sowie vier Stunden die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors mit dem PAC-1 Antikörper erfasst. In Abbildung 130 sieht man den zeitlichen Verlauf der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors mit 50 HU/ml SLO inkubierten Thrombozyten. Fünf Minuten nach Toxinzugabe ist kaum ein Unterschied zur Kontrollprobe (siehe schwarze Linie) zu erkennen. Nach einer halben Stunde wurde eine maximale Aktivierung von $7,68 \pm 1,49\%$ gegenüber der Kontrolle mit $4,24 \pm 0,91\%$ erreicht. Danach fällt der Wert wieder auf Kontrollniveau ab. Die nachfolgenden Diagramme zeigen einen ganz anderen Graphenverlauf. In dem mit 250 HU/ml SLO stimulierten Plättchen ermittelten Graphen (siehe Abbildung 131) ist bereits nach fünf Minuten eine maximale Aktivierung von $11,32 \pm 2,35\%$ erreicht. Danach fällt die Aktivität ab, bis nach einer Stunde keine PAC-1 positiven Events mehr im Vergleich zur Kontrolle ermittelt wurden. Interessanterweise kommt es nach zwei Stunden wieder zu einem Anstieg der GPIIb/IIIa-Aktivierung. So konnten nach vier Stunden $8,45 \pm 3,37\%$ PAC-1 positive Events gemessen werden. Der Graph der mit 500 HU/ml stimulierten Thrombozyten verläuft ähnlich (siehe Abbildung 132). Mit dieser Konzentration konnte nach fünf Minuten ein Maximalwert, der bei den weiteren untersuchten Konzentrationen nicht mehr gesteigert werden konnte, von $30,46 \pm 6,08\%$ bestimmt werden. Innerhalb von einer halben Stunde fällt die Fibrinogenrezeptoraktivität auf Kontrollniveau ab, bis sie nach zwei Stunden wieder ansteigt und nach vier Stunden bei $16,97 \pm 5,20\%$ liegt. Die nachfolgenden Diagramme zeigen einen ähnlichen Graphenverlauf. Jedoch sinkt der Wert der PAC-1 positiven Events nach fünf Minuten Inkubationszeit mit steigender SLO Konzentration, während der nach vier Stunden gemessene Wert mit steigender Toxinkonzentration die Tendenz zum Ansteigen zeigt. So wurde bei den mit 750 HU/ml SLO stimulierte Plättchen (siehe Abbildung 133) $18,54 \pm 2,61\%$ PAC-1 positive Events nach fünf Minuten erhalten. Nach vier Stunden SLO Stimulation lag der Wert bei $14,12 \pm 3,7\%$. In Abbildung 134 sieht man, dass mit steigender SLO Konzentration von 1000 HU/ml der Wert der PAC-1 Aktivierung nach fünf Minuten weiter auf $11,42 \pm 2,34\%$ absinkt und nach vier Stunden auf $24,75 \pm 3,90\%$ ansteigt. Mit 3000 HU/ml SLO-Zusatz (siehe Abbildung 135) konnte nach fünf Minuten Inkubationszeit kein Aktivität des Fibrinogenrezeptors im Vergleich zur

Kontrollprobe festgestellt werden. Nach vier Stunden Toxinstimulation konnte mit $27,64 \pm 4,98\%$ die von den getesteten Konzentrationen höchste Aktivierung gemessen werden.

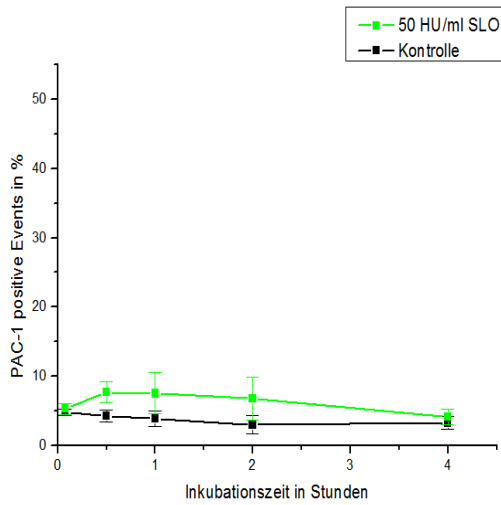


Abbildung 130 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 50 HU/ml SLO über vier Stunden

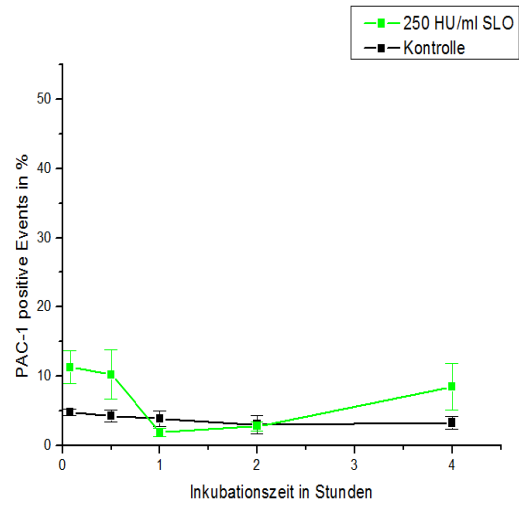


Abbildung 131 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden

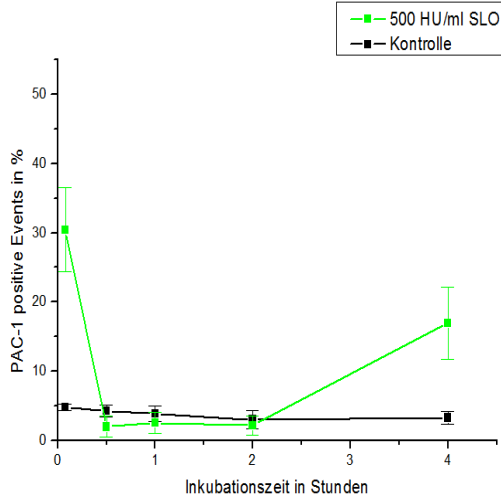


Abbildung 132 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden

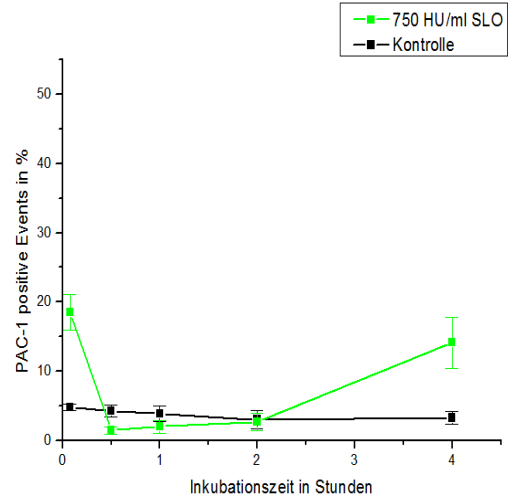


Abbildung 133 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden

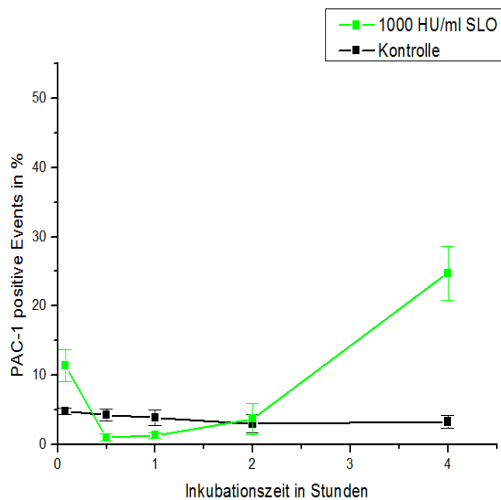


Abbildung 134 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden

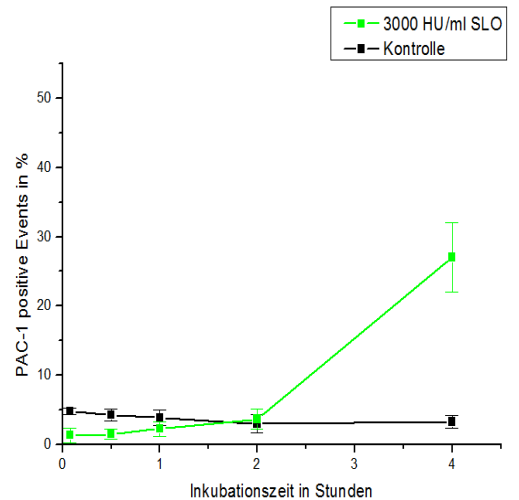


Abbildung 135 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden

Auch mit Cystein aktiviertes SLO wurde auf seine Potenz den Fibrinogenrezeptor zu aktivieren untersucht. Auffällig war, dass mit Cystein versetztes SLO, anders als bei den Western Blot Analysen ermittelt, in einem wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereich als nicht aktiviertes SLO den Fibrinogenrezeptor aktivierte. So konnten mit 5 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz (siehe Abbildung 136) 13,84 ± 1,65% PAC-1 positive Ereignisse nach fünf Minuten Inkubationszeit vermessen werden. Danach sank die Aktivität des Fibrinogenrezeptors innerhalb von zwei Stunden auf Kontrollniveau ab (siehe schwarze Linie). In fast allen folgenden Diagrammen ergibt sich ein ähnlicher Graphenverlauf. Nur bei mit 25 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz stimulierten Plättchen wurde das Maximum der PAC-1 positiven Ereignisse von 21,18 ± 3,44% nach einer halben Stunde gemessen (siehe Abbildung 137). Abbildung 138 folgt dem typischen Graphenverlauf mit einer maximalen Aktivierung des Fibrinogenrezeptors von 27,72 ± 6,21% nach Stimulation mit 50 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz und fünfminütiger Inkubation. Bei den mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz inkubierten Plättchen ergab sich ein Maximum von 30,87 ± 2,26% (siehe Abbildung 139). Die höchste Aktivierung des Fibrinogenrezeptors mit 36,80 ± 11,92% konnte nach fünf Minuten mit 100 HU/ml aktiviertem SLO beobachtet werden (siehe Abbildung 140). Nach Zugabe von 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz konnten die PAC-1 positiven Ereignisse nach fünf Minuten nicht weiter erhöht werden und betragen 30,76 ± 76% (siehe Abbildung 141).

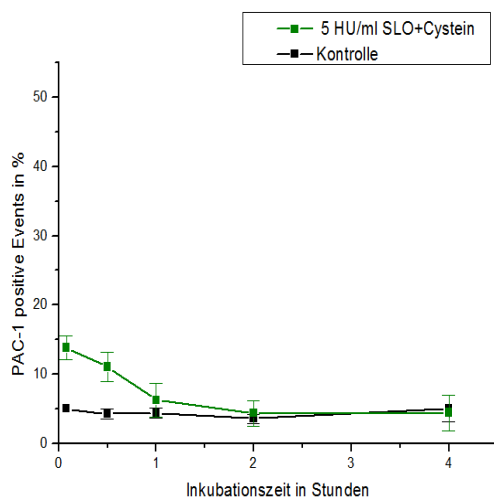


Abbildung 136 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 5 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

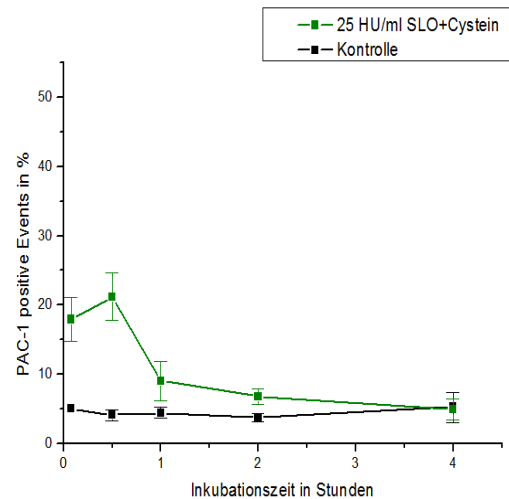


Abbildung 137 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 25 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

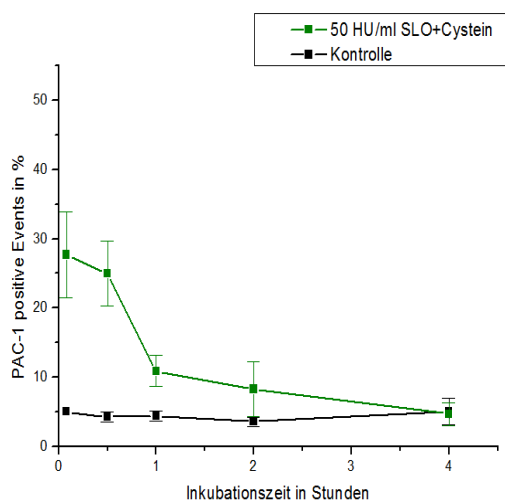


Abbildung 138 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 50 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

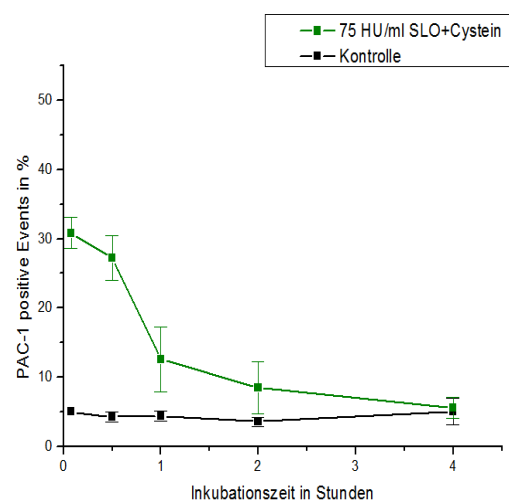


Abbildung 139 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

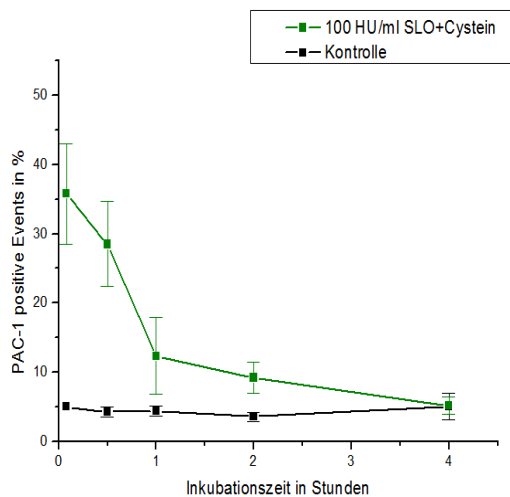


Abbildung 140 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 100 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

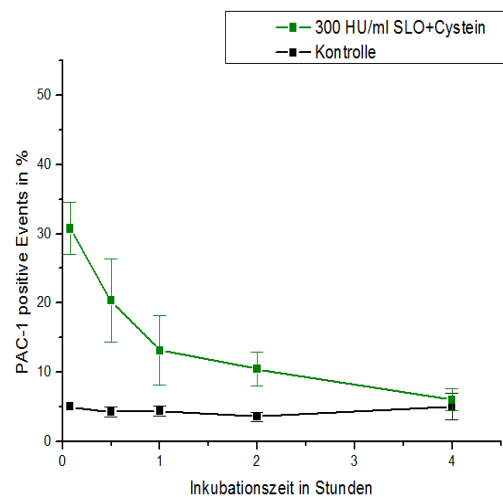


Abbildung 141 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

3.3.3 Aktivierung von Thrombozyten über 24 Stunden

Da sich bei den Untersuchungen zur GPIIb/IIIa-Aktivierung gezeigt hatte, dass die Anzahl der PAC-1 positiven Events bei den SLO stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden wieder zunahm, schien es interessant zu sein, den weiteren zeitlichen Verlauf der Aktivierung zu untersuchen. Auch bei den mit α -Toxin stimulierten Plättchen, deren Rezeptoraktivität nach vier Stunden nahezu auf Kontrollniveau lag, konnte eine spätere Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nicht ausgeschlossen werden. Weitere Aktivitätsmarker, wie die Degranulation, welche mit einem PE konjugierten CD62P Antikörper detektiert wurde, sowie die toxinvermittelte PMP- und Aggregatbildung wurden ebenfalls über den Inkubationszeitraum von 24 Stunden ermittelt. Für die Untersuchungen wurde die gereinigte Thrombozytensuspension mit den zu untersuchenden Substanzen versehen und für maximal 24 Stunden inkubiert. Nach ausgewählten Zeiträumen wurden Proben entnommen, die nach der Färbung mit dem Antikörper und der Fixierung mit PFA am Durchflusszytometer vermessen wurden. Zunächst wurde der endogene Aktivator Thrombin als Positivkontrolle untersucht. Die mit 0,1 U/ml Thrombin stimulierten Plättchen zeigten nach fünf Minuten mit $87,25 \pm 5,53\%$ das Maximum der PAC-1 positiven Events (siehe Abbildung 142). Danach fiel die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors schnell auf $14,78 \pm 4,58\%$ innerhalb von acht Stunden Inkubationszeit ab. In den folgenden Stunden sank die Aktivierung nach 24 Stunden leicht auf $5,23 \pm 2,00\%$ ab und war somit kleiner als bei der Kontrollprobe ($8,37 \pm 2,19\%$, siehe schwarze Linie). Einen ähnlichen Verlauf zeigt Abbildung 143. Hier stieg die Anzahl an CD62P positiven Events jedoch zeitlich verzögert von $49,86 \pm 5,76\%$ nach fünf Minuten auf den Maximalwert von $55,12 \pm 4,35\%$ nach einer halben Stunde Inkubationszeit an. Innerhalb der ersten vier Stunden fiel die Aktivität wieder schnell auf $12,14 \pm 2,15\%$ ab und lag mit $4,25 \pm 0,91\%$ nach 24 Stunden ebenso leicht unterhalb dem Wert der Kontrollprobe ($7,75 \pm 1,31\%$). Der Graph der PMP-Bildung von Thrombin stimulierten Plättchen ähnelt einer Gauß'schen Kurve (siehe Abbildung 144). Die Anzahl der PMP positiven Events stieg von $6,61 \pm 2,11\%$ nach fünf Minuten auf ein Maximum von $34,05 \pm 6,54\%$ nach acht Stunden an und fällt dann wieder auf einen Wert von $10,72 \pm 3,58\%$ nach 24 Stunden ab. Die Aggregatbildung von Thrombin stimulierten Plättchen stieg von $11,42 \pm 1,94\%$ nach fünf Minuten auf das Maximum von $18,87 \pm 2,87\%$ innerhalb einer Stunde an (siehe Abbildung 145). Auch hier konnten nach vier Stunden im Vergleich zur Kontrolle keine Aggregate mehr gemessen werden und nach 24 Stunden lagen die positiven Ereignisse an Aggregaten unterhalb des Kontrollniveaus. Bei mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten Thrombozyten konnte keine Aktivierung festgestellt werden. Die Werte für die PAC-1- und CD62P positiven Events sowie für die PMP- und Aggregatbildung lagen im Bereich der Kontrollprobe.

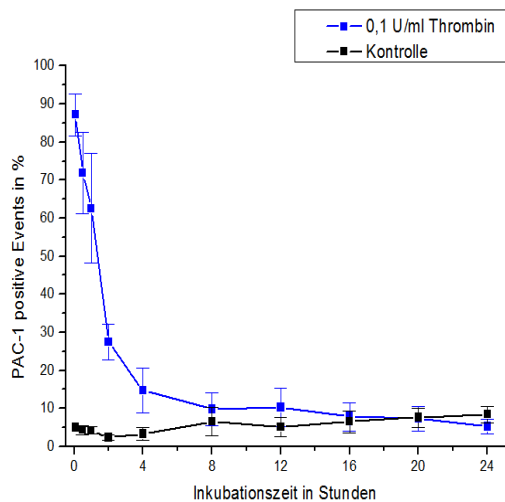


Abbildung 142 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden

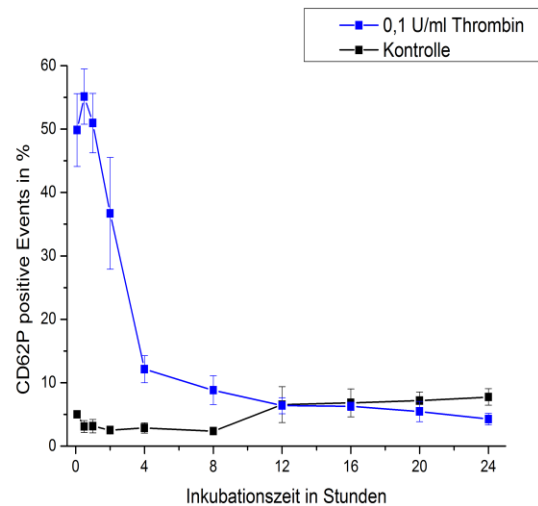


Abbildung 143 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden

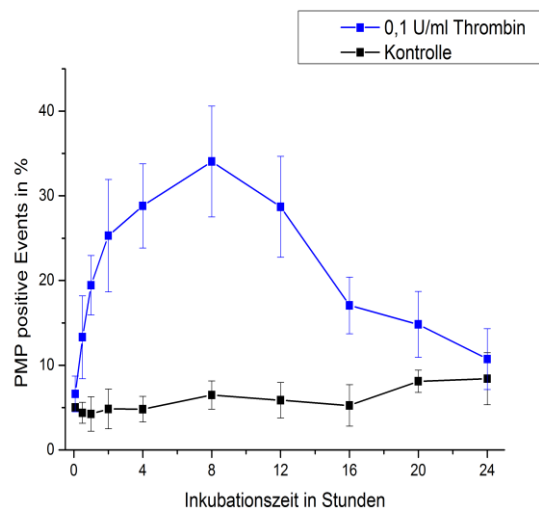


Abbildung 144 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden

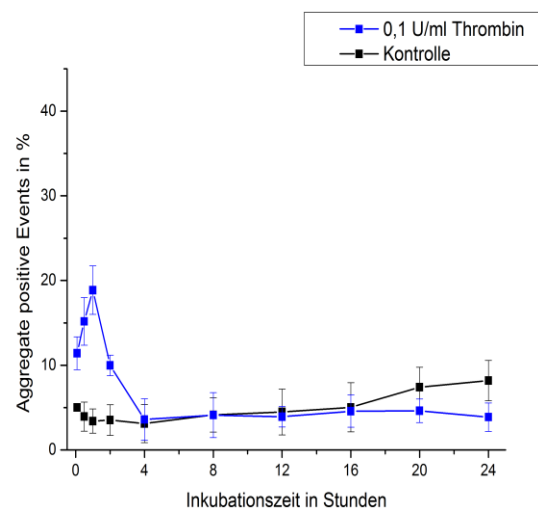


Abbildung 145 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 U/ml Thrombin über 24 Stunden

Die Messung der thrombozytären Aktivitätsmarker erfolgte ebenso mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin. Bei dieser Konzentration zeigten die Thrombozyten die höchste PAC-1 Bindung am Durchflusszytometer (siehe Kap. 3.3.1). Überraschenderweise konnte, nachdem die PAC-1 positiven Events nach vier Stunden auf Kontrollniveau abfielen, eine weitere Steigung GPIIb/IIIa-Rezeptoraktivität im zeitlichen Verlauf auf $47,08 \pm 5,72$ % nach 24 Stunden festgestellt werden (siehe Abbildung 146). Die ermittelten CD62P positiven Events stiegen vom Kontrollniveau (siehe schwarze Linie) auf $12,67 \pm 3,59$ % innerhalb einer halben Stunde an (siehe Abbildung 147). Danach fielen die P-Selektin positiven Events auf $7,16 \pm 1,24$ % nach vier Stunden ab, worauf wieder ein Anstieg auf $30,24 \pm 5,18$ % nach 24 Stunden folgte. Auch PMP konnten am Durchflusszytometer detektiert werden (siehe Abbildung 148). Innerhalb von einer Stunde stieg der Wert der positiven Events an PMP stark auf ein Maximum von $30,61 \pm 4,23$ % an. Es folgte ein Abfall auf $13,96 \pm 3,80$ % nach vier Stunden und wieder ein Anstieg auf $29,32 \pm 3,26$ % nach 12 Stunden Inkubationszeit. Nach 24 Stunden fiel der Wert der positiven Ereignisse an PMP auf $12,70 \pm 2,94$ %. Die Aggregatbildung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten ist in Abbildung 149 zu sehen. Nachdem die positiven Events an Aggregaten innerhalb der ersten zwei Stunden unterhalb der Aggregatbildung der Kontrollprobe liegen, konnte danach ein Anstieg auf $17,55 \pm 3,25$ % nach 16 Stunden beobachtet werden. Die Aggregatbildung fiel danach wieder auf einen Wert von $13,52 \pm 3,07$ % nach 24 Stunden ab.

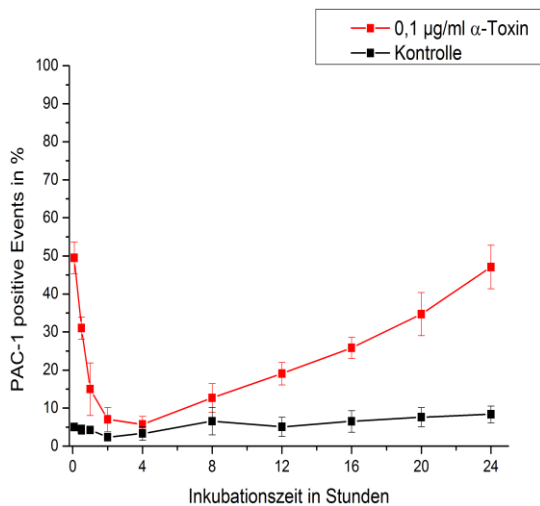


Abbildung 146 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden

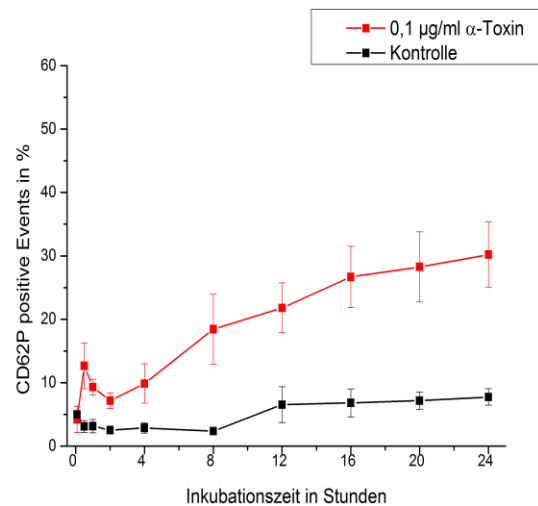


Abbildung 147 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden

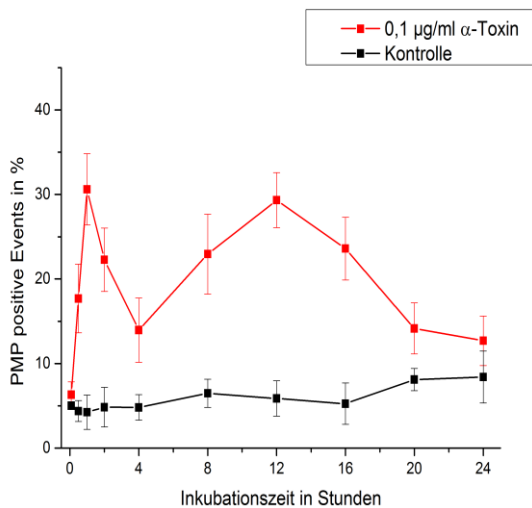


Abbildung 148 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden

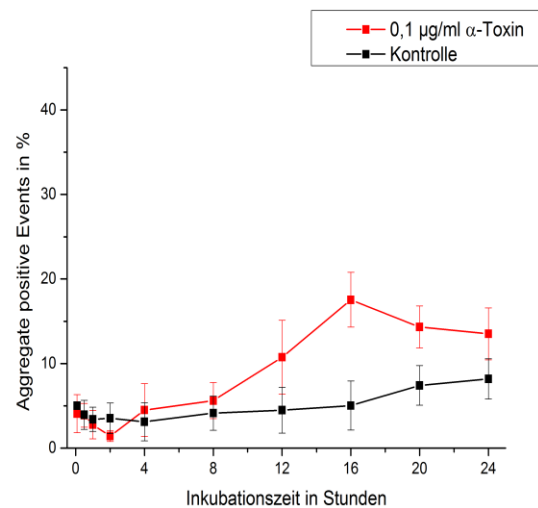


Abbildung 149 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 0,1 µg/ml α-Toxin über 24 Stunden

Für die Bestimmung der Aktivierungsmarker wurden 500 HU/ml SLO verwendet, also die Konzentration mit der die höchste Aktivierung des Fibrinogenrezeptors am Durchflusszytometer bestimmt wurde (siehe Kap. 3.3.2). Auffällig war, dass sich die Verläufe der Graphen aller Aktivierungsparameter mit den unter α-Toxinzusatz erhaltenen Graphen ähnelten.

Der nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten ermittelte Wert von $30,46 \pm 6,08\%$ für die PAC-1 positiven Events fiel nach einer halben Stunde auf Kontrollniveau (siehe schwarze Linie) ab und stieg dann nach 24 Stunden auf einen wesentlich höheren Wert von $61,93 \pm 8,17\%$ an (siehe Abbildung 150). Bei den gemessenen CD62P positiven Ereignissen konnte innerhalb von 24 Stunden ein allmählicher Anstieg auf $42,36 \pm 3,80\%$ ermittelt werden (siehe Abbildung 151). Bei den detektierten PMP erfolgte innerhalb der ersten Stunde ein Anstieg der positiven Events an PMP auf $25,59 \pm 5,67\%$ (siehe Abbildung 152). Dieser Wert sank anschließend auf $11,70 \pm 3,01\%$ ab, stieg wieder auf den Maximalwert von $26,54 \pm 4,25\%$ an und erreichte nach 24 Stunden mit $10,52 \pm 3,65\%$ fast den Kontrollwert von $8,41 \pm 3,08\%$. Die positiven Ereignisse an Aggregaten befanden sich in den ersten zwei Stunden im Bereich der Kontrollwerte, bevor sie bis auf einen Maximalwert von $20,77 \pm 4,49\%$ nach 12 Stunden anstiegen und sich anschließend mit $9,52 \pm 3,66\%$ zum Ende des Versuchszeitraumes dem Kontrollwert von $8,2 \pm 2,39\%$ annäherten (siehe Abbildung 153).

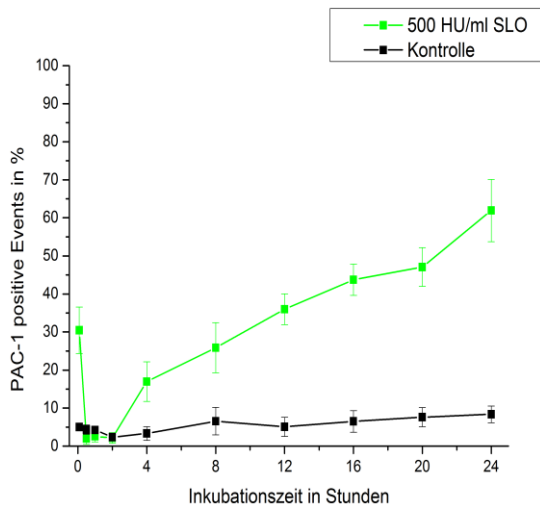


Abbildung 150 PAC-1 positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden

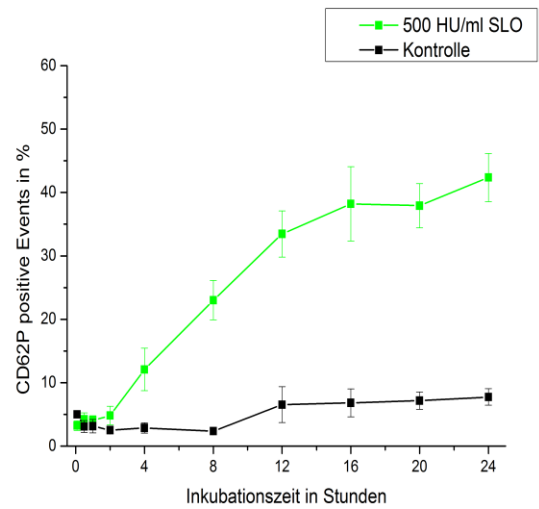


Abbildung 151 CD62P positive Events von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden

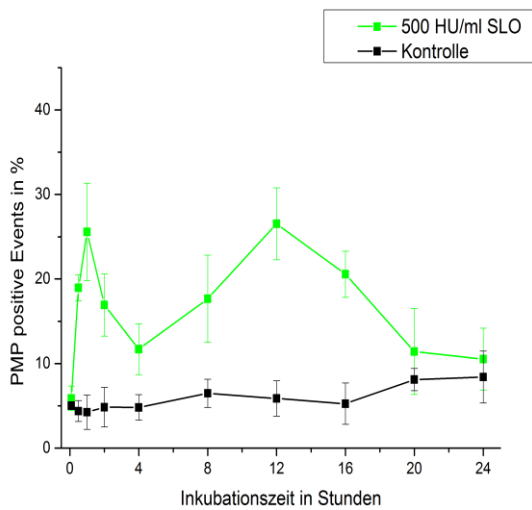


Abbildung 152 Positive Events an PMP von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden

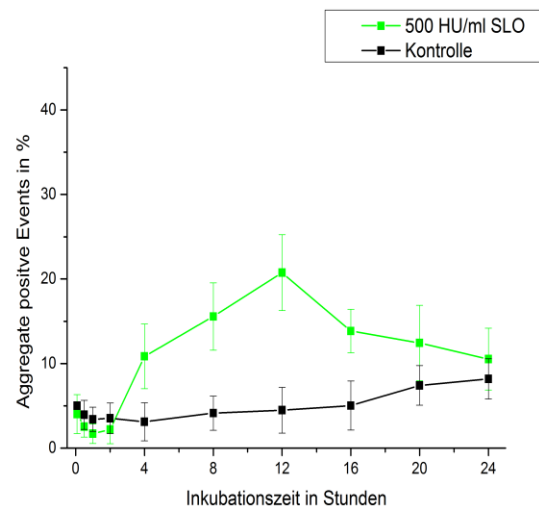


Abbildung 153 Positive Events an Aggregaten von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO über 24 Stunden

3.3.4 Inhibierung der Thrombozytenaktivierung

Während der Untersuchung zur Aktivierung von Thrombozyten über 24 Stunden wurde auch die inhibitorische Wirkung verschiedener Stoffe auf die Blutplättchen getestet. Zum Einsatz kamen Substanzen, deren Wirkungsweise auf unterschiedlichen Mechanismen beruht, wie die Medikamente Abciximab, Iloprost und NPN (siehe Kap. 1.4.5) sowie der Translationsinhibitor Puromycin (siehe Kap. 1.4.6.1) und das Peptid RGDS (siehe Kap. 1.4.5). Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die mit den bakteriellen Toxinen bzw. den physiologischen Agonisten Thrombin stimulierten Thrombozyten mit bzw. ohne den Inhibitor versetzt und nach den jeweiligen Inkubationszeiten, für die die thrombozytären Aktivierungsparameter PAC-1, CD62P sowie die PMP- bzw. die Aggregatbildung die höchste Aktivierung zeigten, untersucht. Die ermittelten Absolutwerte samt Standardabweichung wurden als Balkendiagramme dargestellt. Bei den zur besseren Übersichtlichkeit in Tabellen dargestellten Relativwerten, wurden die von den nur mit dem Toxin bzw. Thrombin erhaltenen Ergebnisse gleich eins gesetzt und die Werte mit Inhibitorzusatz darauf bezogen. Abbildung 154 bzw. Tabelle 33 zeigen die Inhibierung der thrombozytären Aktivierungsparameter von 0,1 U/ml Thrombin stimulierten Plättchen. In Tabelle 34 wurde unterhalb der Aktivierungsparameter die Zeit, zu der die Probe entnommen wurde, in Klammern angegeben. Während alle Medikamente die PAC-1 positiven Events, die PMP- und Aggregatbildung vergleichbar stark hemmten, ist die Wirkung von Abciximab bei den CD62P positiven Events mit 0,59 wesentlich schwächer als bei Iloprost mit 0,09 bzw. NPN mit 0,18. Dennoch konnten durch den Zusatz der Medikamente im Vergleich zur nur mit Thrombin versetzten Probe alle Parameter signifikant gesenkt werden.

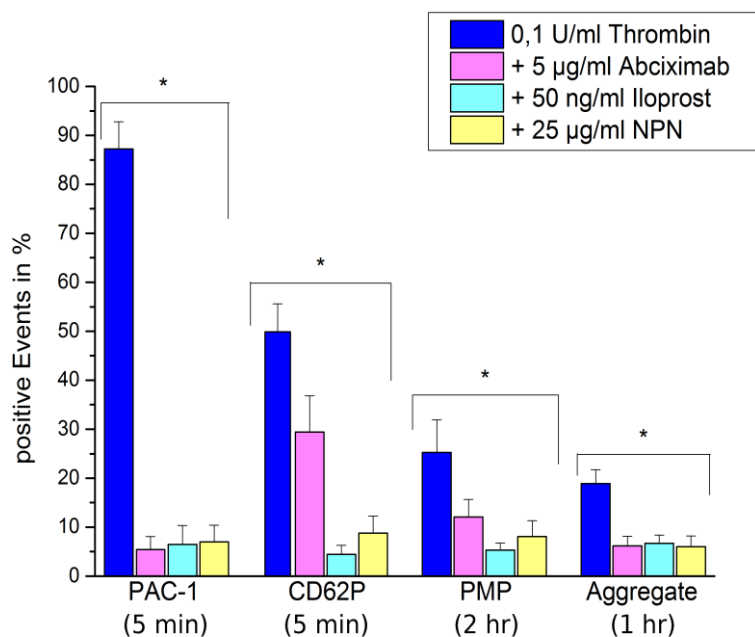


Abbildung 154 Absolutwerte der Inhibierung der mit Thrombin ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 0,1 U/ml Thrombin sowie mit 5 µg/ml Abciximab, 50 ng/ml Iloprost oder 25 µg/ml NPN versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate untersucht.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der nur mit 0,1 U/ml Thrombin stimulierten Vergleichsprobe

Tabelle 33 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungs- marker	Thrombin (0,1 U/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,06	0,07	0,08
CD62P (5 min)	1	0,59	0,09	0,18
PMP (2 hr)	1	0,48	0,21	0,32
Aggregate (1 hr)	1	0,33	0,35	0,32

In Abbildung 155 bzw.

Tabelle 34 sind die Werte für die Inhibierung der Aktivierungsmarker von Plättchen, die mit 0,1 µg/ml α-Toxin stimuliert wurden, dargestellt. Auch hier konnten alle Aktivierungsmarker signifikant im Vergleich zu der nur mit α-Toxin inkubierten Probe gesenkt werden. Anhand der ermittelten Werte erkennt man, dass die durch α-Toxin Stimulation erhaltenen PAC-1 positiven Ereignisse im Vergleich zu den mit Thrombin behandelten Proben durch den Medikamenteneinsatz noch weiter verringert wurden. Die CD62P positiven Events fielen unter Abciximabzusatz auf 0,40 im Vergleich zu der mit Thrombin stimulierten Probe mit 0,59 ab. Die Werte unter Iloprost mit 0,23 und NPN mit 0,27 sind wesentlich höher als die ermittelten Werte der mit Thrombin behandelten Proben mit 0,09 für Iloprost bzw. 0,18 für NPN. Die PMP konnten mit Abciximab ähnlich stark auf 0,58 wie bei der Thrombin stimulierten Probe mit 0,48 reduziert werden. Iloprost und NPN konnten die PMP-Bildung mit 0,52 bzw. 0,51 nahezu gleich stark hemmen, wirken dennoch nicht so gut wie bei den Proben mit Thrombinzusatz. Die Aggregatbildung konnte wiederum mit den Medikamenten bei den α-Toxin stimulierten Proben besser gehemmt werden als unter Thrombinstimulation.

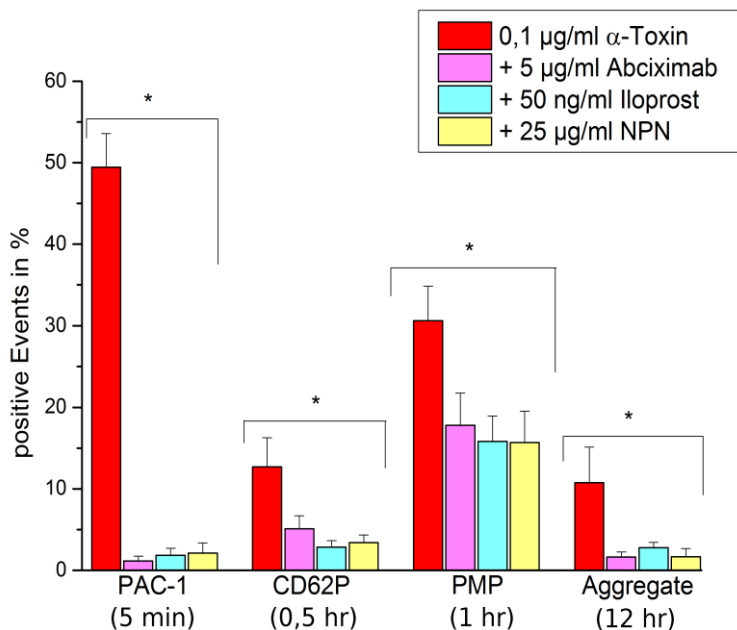


Abbildung 155 Absolutwerte der Inhibierung der mit α-Toxin ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 0,1 µg/ml α-Toxin sowie mit 5 µg/ml Abciximab, 50 ng/ml Iloprost oder 25 µg/ml NPN versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate vermessen.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der nur mit 0,1 µg/ml α-Toxin stimulierten Vergleichsprobe

Tabelle 34 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α-Toxin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungs- marker	α-Toxin (0,1 µg/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,02	0,04	0,04
CD62P (0,5 hr)	1	0,40	0,23	0,27
PMP (1 hr)	1	0,58	0,52	0,51
Aggregate (12 hr)	1	0,15	0,26	0,16

Schließlich wurde noch die inhibitorische Wirkung der Substanzen von mit 500 HU/ml SLO stimulierten Thrombozyten untersucht (siehe Abbildung 156 bzw. Tabelle 35). Dabei unterschieden sich alle

gemessenen Werte der Inhibitionsversuche signifikant im Vergleich zu der nur mit SLO behandelten Probe. Auffallend war, dass sich die Werte der Inhibition der bakteriell stimulierten Toxine ähnlicher sind als die gemessenen Werte mit dem endogenen Agonisten Thrombin. Die PAC-1 positiven Events konnten bei den SLO-stimulierten Plättchen mit den Medikamenten vergleichsweise gleich stark wie bei den mit α -Toxin behandelten Thrombozyten gehemmt werden. Mit einem Wert von 0,2 konnte Abciximab im Vergleich zu den mit Thrombin und α -Toxin versetzten Plättchen am besten die CD62P positiven Events reduzieren. Die mit Iloprost und NPN erhaltenen Werte von 0,12 bzw. 0,23 ähneln den unter α -Toxinzusatz gewonnenen Werten von 0,23 bzw. 0,27. Unter Medikamentenzusatz konnten die PMP-Bildung bei den SLO stimulierten Plättchen im Vergleich zu den α -Toxin stimulierten Thrombozyten leicht verringert werden. Die Werte der Aggregatbildung unterschieden sich ebenfalls nicht wesentlich von den Werten unter α -Toxinstimulation.

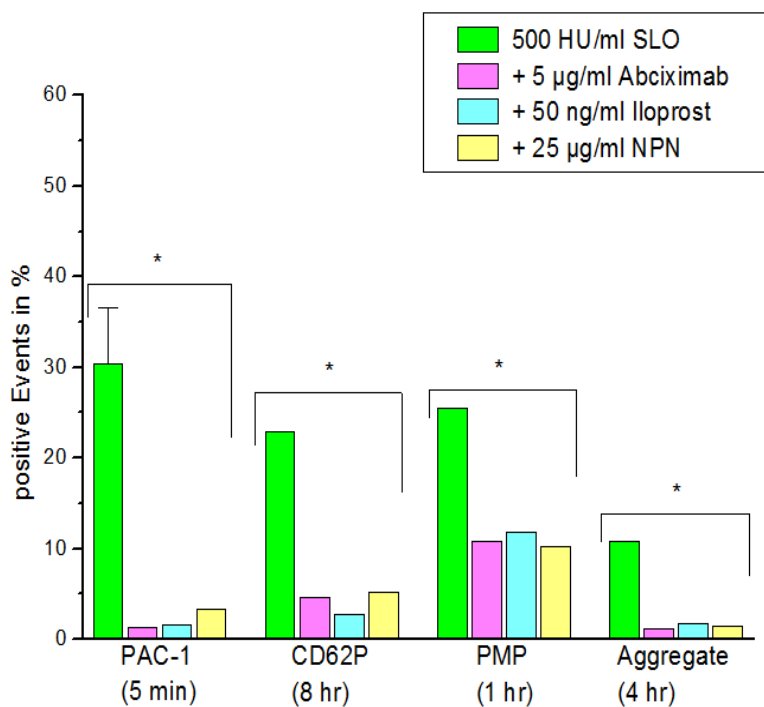


Abbildung 156 Absolutwerte der Inhibition der mit SLO ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 500 HU/ml SLO sowie mit 5 µg/ml Abciximab, 50 ng/ml Iloprost oder 25 µg/ml NPN versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate vermessen.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der mit 500 HU/ml SLO stimulierten Vergleichsprobe

Tabelle 35 Relative Ergebnisse der Inhibition von SLO stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungsmarker	SLO (500 HU/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,05	0,05	0,11
CD62P (8 hr)	1	0,20	0,12	0,23
PMP (1 hr)	1	0,43	0,46	0,40
Aggregate (4 hr)	1	0,12	0,17	0,13

Des Weiteren wurden die Blutplättchen mit Puromycin inhibiert bzw. mit RGDS als Negativkontrolle versetzt. Dabei wurden alle durch Inhibition bzw. Rezeptorblockade ermittelten Werte im Vergleich zu der nur mit dem Toxin bzw. Thrombin behandelten Probe signifikant erniedrigt. Abbildung 157 bzw. Tabelle 36 zeigen die mit Thrombin stimulierten und mit 1mM Puromycin bzw. 1 mg/ml RGDS behandelten Thrombozyten. Anhand der gewonnenen Ergebnisse fällt auf, dass mit Thrombin aktivierte Plättchen unter Puromycinzusatz nicht so stark wie mit den untersuchten Medikamenten inhibiert wurden. So konnte im Vergleich zur Inhibition der PAC-1 positiven Ereignisse durch Medikamenteneinsatz keine so starke Hemmung der Thrombozyten mit Puromycin erreicht werden. RGDS hingegen blockierte den Fibrinogenrezeptors nahezu vollständig, sodass kaum PAC-1 positive Events

detektiert wurden. Die CD62P positiven Events konnten unter Puromycinzusatz ebenfalls nur auf 0,62 verringert werden. Aggregat- und PMP-Bildung wurden mit 0,42 und 0,62 nur mäßig durch das zuge-setzte Puromycin reduziert.

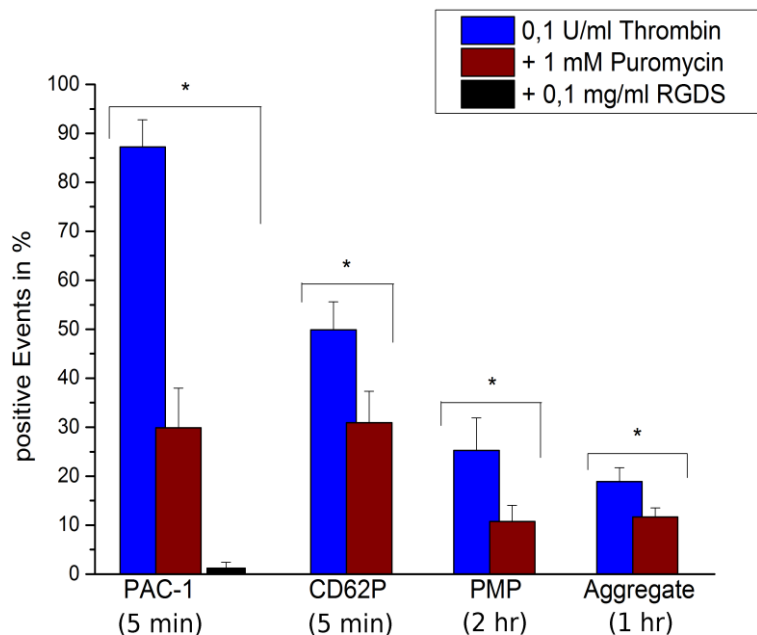


Abbildung 157 Absolutwerte der Inhibition der mit Thrombin ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 0,1 U/ml Thrombin sowie mit 1 mM Puromycin bzw. 0,1 mg/ml RGDS versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate vermessen.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der mit 0,1 U/ml Thrombin stimulierten Vergleichsprobe

Tabelle 36 Relative Ergebnisse der Inhibition von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungs- marker	Thrombin (0,1 U/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,34	0,01
CD62P (5 min)	1	0,62	/
PMP (2 hr)	1	0,42	/
Aggregate (1 hr)	1	0,62	/

Abbildung 158 bzw. Tabelle 38 zeigen die Hemmung der Aktivierungsmarker von α -Toxin stimulierten Plättchen. Hier konnten sowohl Puromycin mit 0,06; als auch RGDS mit 0,01 die PAC-1 Bindung deutlich hemmen. Auch die CD62P positiven Ereignisse wurden mit einem Wert von 0,24 stärker reduziert als bei den mit Thrombin aktivierten Plättchen. Während die PMP-Bildung mit 0,42 den gleichen Wert wie die mit Thrombin stimulierten Plättchen aufwiesen, konnte die Aggregatbildung mit 0,14

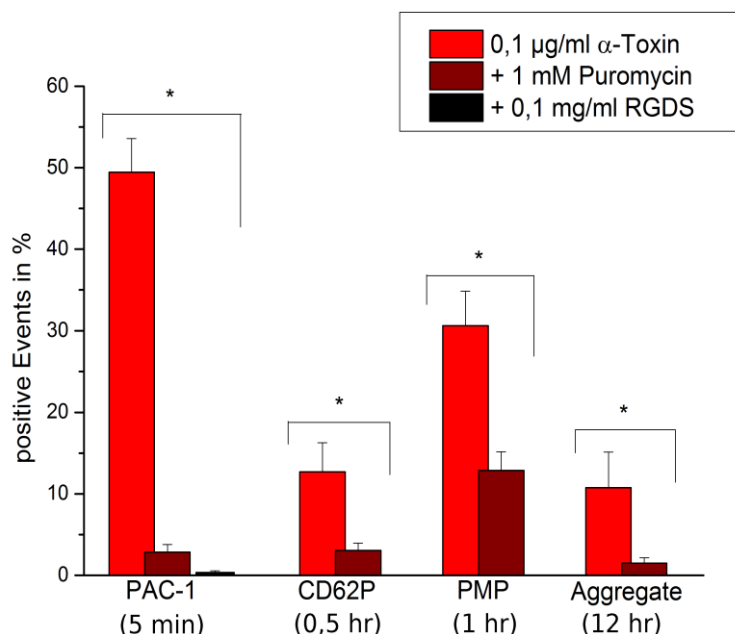


Abbildung 158 Absolutwerte der Inhibition der mit α -Toxin ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 0,1 µg/ml α -Toxin sowie mit 1 mM Puromycin bzw. 0,1 mg/ml RGDS versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate vermessen.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der mit 0,1 µg/ml α -Toxin stimulierten Vergleichsprobe

unter Puromyinzusatz stark gehemmt werden.

Tabelle 37 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungs- marker	α -Toxin (0,1 μ g/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,06	0,01
CD62P (0,5 hr)	1	0,24	/
PMP (1 hr)	1	0,42	/
Aggregate (12 hr)	1	0,14	/

In Abbildung 159 und in Tabelle 38 sind die Ergebnisse der Inhibition von 500 HU/ml SLO stimulierten Thrombozyten dargestellt. Bis auf die Aggregatbildung ähneln die Werte denen der α -Toxin stimulierten und mit Puromycin gehemmten Thrombozyten. So wurde unter Puromycin ein Wert von 0,06 bzw. unter RGDS-Zusatz ein Wert von 0,01 für die PAC-1 positiven Ereignisse ermittelt. Die PMP-Bildung wurde mit 0,41 fast gleich stark wie bei den mit α -Toxin behandelten Plättchen inhibiert. Unterschiedlich ist jedoch die Aggregatbildung, die nur zu 0,4 im Vergleich mit 0,14 bei den α -Toxin stimulierten Blutplättchen gehemmt werden konnte.

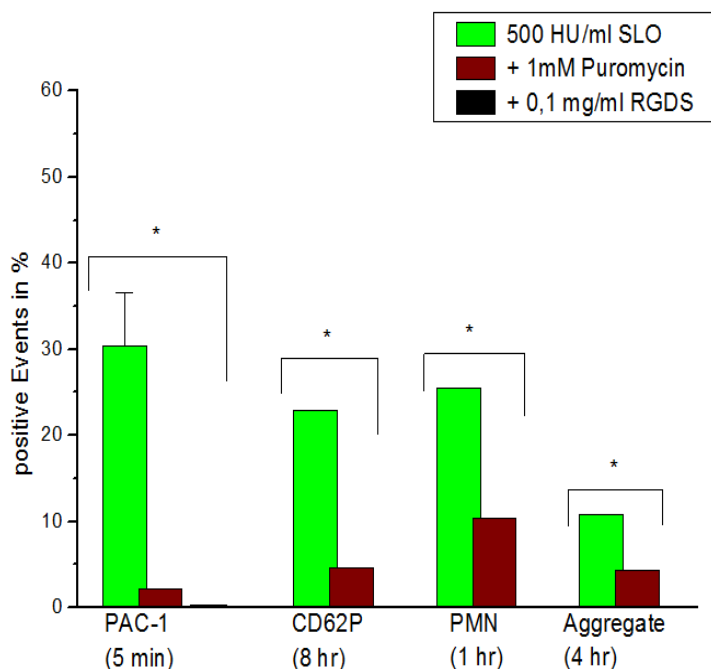


Abbildung 159 Absolutwerte der Inhibierung der mit SLO ausgelösten Thrombozytenaktivierung

Die Thrombozytensuspension wurde mit 500 HU/ml SLO sowie mit 1 mM Puromycin bzw. 0,1 mg/ml RGDS versehen und nach verschiedenen Inkubationszeiten (siehe Klammer) am Durchflusszytometer auf die Aktivierungsmarker PAC-1, CD62P, PMP und Aggregate vermessen.

* Werte unterscheiden sich signifikant von der mit 500 HU/ml SLO stimulierten Vergleichsprobe

Tabelle 38 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungs- marker	SLO (500 HU/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,07	0,01
CD62P (8 hr)	1	0,20	/
PMP (1hr)	1	0,41	/

Aggregate (4 hr)	1	0,40	/
------------------	---	------	---

3.3.5 Aktivierung von neutrophilen Granulozyten

Neben den Thrombozyten spielen aktivierte neutrophile Granulozyten eine große Rolle im Krankheitsprozess sowohl bei der Sepsis (siehe Kap. 1.2.1) als auch bei der Endokarditis (siehe Kap. 1.3.1), wo es zu einer Leukozyteninfiltration in das entzündete Herzgewebe kommt. Um zu untersuchen, ob die bakteriellen Toxine SLO, LPS und α -Toxin in der Lage sind die PMN zu aktivieren, wurden diese am Durchflusszytometer auf Aktivierungsmarker wie die CD11b Expression sowie die Bildung von Aggregaten untersucht. Für die Untersuchungen wurden die aufgereinigten humanen PMN in HBSS suspendiert, mit den Versuchssubstanzen versetzt und bei 37°C in Zellkulturplatten inkubiert. Nach fünf Minuten, einer halben-, einer-, zwei- und vier Stunden wurden Proben entnommen. Nachdem diese Proben mit dem Antikörper versetzt und mit PFA fixiert wurden, erfolgte deren Vermessung am Durchflusszytometer. Um die Qualität der PMN-Präparation abzuschätzen und die Methodik der Versuchsdurchführung zu überprüfen, wurde eine Zellprobe von jedem Versuch mit PMA als Positivkontrolle versetzt. Nur wenn sich dabei mindestens 80% CD11b positive Events im Vergleich zur unstimulierten Kontrollprobe ergaben, wurden die restlichen Proben vermessen.

Auch eine mikroskopische Betrachtung der Zellen bei 40-facher Vergrößerung erfolgte.

Abbildung 160 zeigt die unstimulierte PMN-Probe nach vier Stunden in Suspension mit Trypanblau. Diese weist im Vergleich zu der mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PMA behandelten Positivprobe keine aggregierten Zellen auf (siehe

Abbildung 161). Weiterhin fällt auf, dass die mit PMA versetzten PMN im Vergleich zur Kontrolle vergrößert erscheinen. Während bei den mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin (siehe

Abbildung 162) stimulierten Granulozyten nur kleine Aggregate beobachtet werden konnten, zeigte sich bei den mit 750 HU/ml SLO stimulierten PMN größere Aggregate innerhalb von vier Stunden unter dem Mikroskop (siehe

Abbildung 163). Die Meisten der aggregierten PMN waren in einem vitalen Zustand, da sie in der Trypanblau-Lösung nicht blau gefärbt vorlagen.

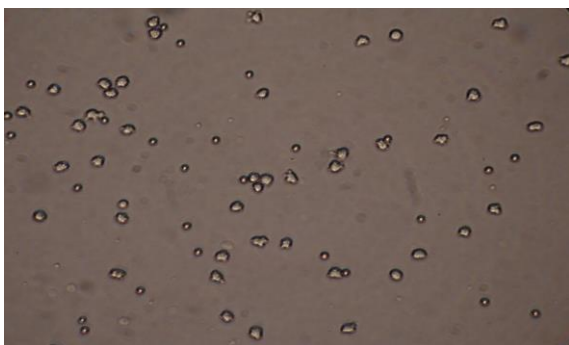


Abbildung 160 Mikroskopische Aufnahme von unstimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung

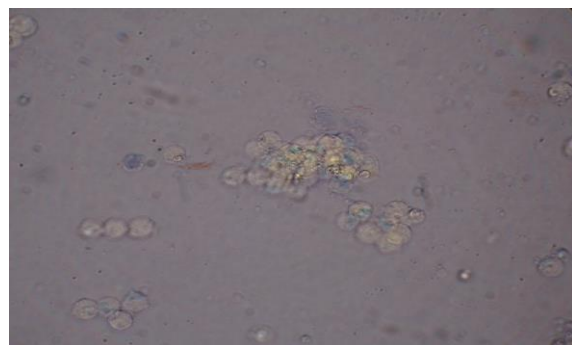


Abbildung 161 Mikroskopische Aufnahme von mit PMA (0,5 $\mu\text{g/ml}$) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung

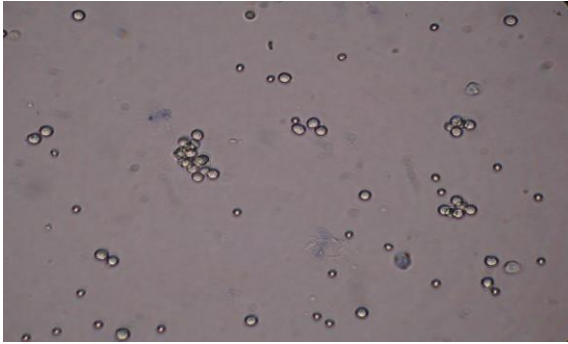


Abbildung 162 Mikroskopische Aufnahme von mit α -Toxin (0,5 μ g/ml) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung

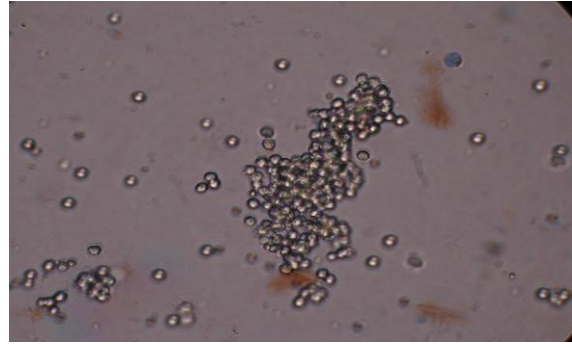


Abbildung 163 Mikroskopische Aufnahme von mit SLO (750 HU/ml) stimulierten PMN nach vier Stunden in Trypanblau-Lösung

Abbildung 164 zeigt den Graphen der PMA-Positivkontrolle. Hier wurde erwartungsgemäß nach fünf Minuten Inkubationszeit eine hohe Aktivierung der PMN mit $94,94 \pm 4,78\%$ CD11b positiven Ereignissen gegenüber der Kontrollprobe (siehe schwarze Linie) gemessen. Innerhalb von vier Stunden konnte ein Abfall des Wertes auf $23,31 \pm 5,75\%$ beobachtet werden. Das auf die Thrombozyten inhibitorisch wirkende Puromycin wurde ebenfalls getestet. Eine inhibitorische Wirkung von Puromycin auf PMN konnte jedoch nicht festgestellt werden.

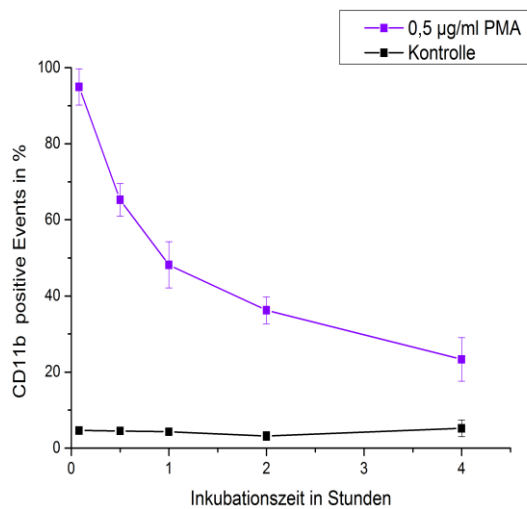


Abbildung 164 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,5 μ g/ml PMA über vier Stunden

Mit 0,05 µg/ml α-Toxin stimulierte PMN wurden mit einem Anstieg der CD11b positiven Events nach fünf Minuten von $6,39 \pm 2,5\%$ auf den Maximalwert von $9,79 \pm 1,63\%$ nach einer halben Stunde nur geringfügig aktiviert (siehe Abbildung 165). Dieser Wert fiel innerhalb von vier Stunden wieder auf Kontrollniveau ab. Bei PMN, die mit 0,5 µg/ml α-Toxin versetzt wurden, konnte der Maximalwert mit $13,24 \pm 2,84\%$ schon nach fünf Minuten gemessen werden (siehe Abbildung 166). Auch hier konnte nach vier Stunden im Vergleich zur Kontrolle keine Aktivierung mehr gemessen werden. Der Verlauf dieses Graphen konnte auch bei den folgenden höheren Konzentrationen mit α-Toxin beobachtet werden. So wurden mit 1 µg/ml α-Toxin stimulierten Granulozyten $22,81 \pm 4,66\%$ CD11b positive Ereignisse nach fünf Minuten gemessen (siehe Abbildung 167). Nur unwesentlich höher mit $24,26 \pm 3,82\%$ wurden die mit 2,5 µg/ml α-Toxin versetzten PMN nach fünf Minuten aktiviert (siehe Abbildung 168).

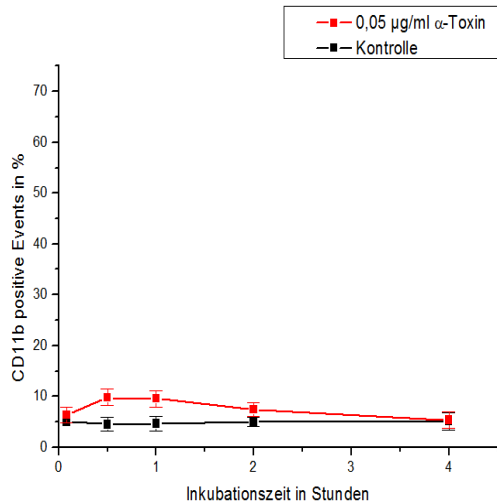


Abbildung 165 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,05 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

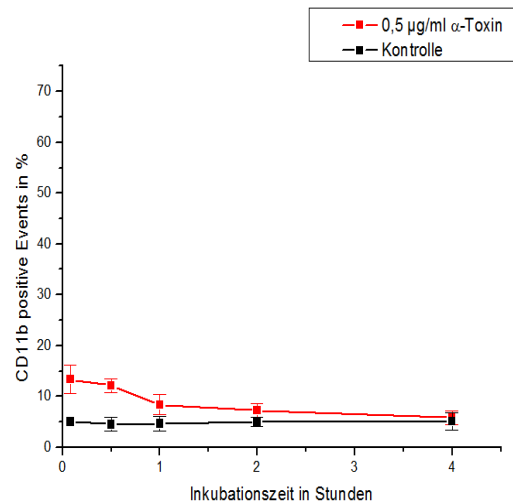


Abbildung 166 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

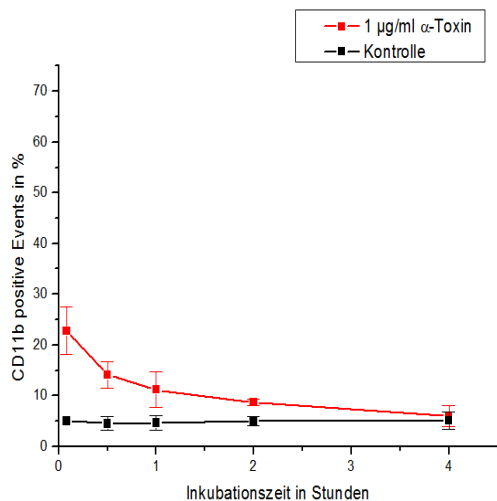


Abbildung 167 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 1 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

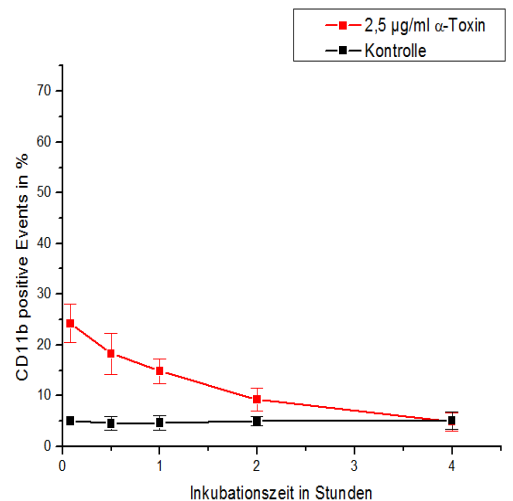


Abbildung 168 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 2,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

Bei den mit LPS von *E. coli* und LPS von *S. ent.* stimulierten PMN kam es erwartungsgemäß zu ähnlichen Graphenverläufen (siehe Abbildung 169 und Abbildung 170). Nach fünfminütiger Inkubation lagen die Werte der CD11b positiven Events nur geringfügig über den Kontrollwerten. Es folgte nach einer Stunde ein Anstieg auf $49,7 \pm 7,34\%$ für die mit *E. coli* bzw. auf $50,47 \pm 5,39\%$ für die mit LPS von *S. ent.* behandelte PMN. Schließlich fiel die Aktivierung wieder auf $14,19 \pm 3,24\%$ bzw. $12,80 \pm$

1,79% nach vier Stunden ab.

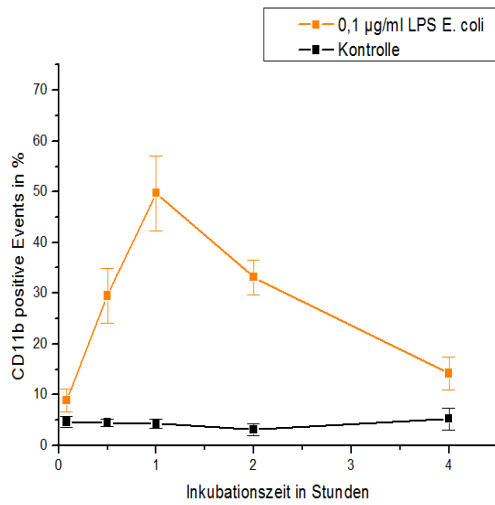


Abbildung 169 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS von E. coli über vier Stunden

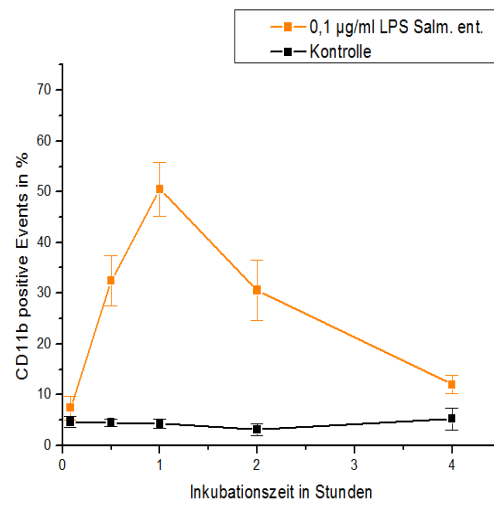


Abbildung 170 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS von Salm. ent. über vier Stunden

Des Weiteren wurde auch die Aktivierung der PMN durch SLO bzw. mit 20 mM Cystein aktiviertem SLO untersucht. Dabei fiel auf, dass sich die Graphen der mit SLO aktivierten PMN mit denen der mit SLO unter Cysteinzusatz ermittelten Graphen sehr ähneln. Es scheint, dass mit Cystein aktiviertes SLO in einer zehnfach niedrigeren Dosis zu denselben Ergebnissen im Hinblick auf die CD11b positiven Events, wie nicht aktiviertes SLO führt. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der erhaltenen Graphen werden folgend nur die mit nicht aktiviertem SLO gewonnenen Graphen näher beschrieben. Die Abbildungen, welche durch Stimulation der PMN mit aktiviertem SLO in einer um den Faktor zehn niedrigeren Dosierung erhalten wurden, sind jeweils daneben abgebildet.

Abbildung 171 (bzw. Abbildung 172 daneben) zeigt den Graphen der CD11b positiven Events von mit 250 HU/ml SLO stimulierten PMN. Nach fünf Minuten Inkubationszeit stieg der Wert von $20,42 \pm 6,88\%$ auf einen Maximalwert von $47,22 \pm 5,88\%$ nach einer halben Stunde an. Es folgte ein Abfall nach vier Stunden auf $12,98 \pm 4,60\%$ CD11b positive Events. Bei den mit 500 HU/ml SLO stimulierten PMN wurde ein ähnlicher Graph erhalten (siehe Abbildung 173 bzw. Abbildung 174). Es konnte jedoch ein etwas höherer Maximalwert von $52,66 \pm 3,00\%$ nach einer halben Stunde gemessen werden. Bei einer Konzentration von 750 HU/ml SLO zeigte sich ein anderer zeitlicher Verlauf der PMN-Aktivierung (siehe Abbildung 175 bzw. Abbildung 176). Schon nach fünf Minuten wurde hier jeweils der Maximalwert von $56,30 \pm 5,03\%$ erreicht. Danach sank die Anzahl der CD11b positiven Events auf $18,01 \pm 5,04\%$ ab. Die größte Aktivierung der PMN konnte mit 1000 HU/ml SLO erreicht werden (siehe Abbildung 177 bzw. Abbildung 178). Nach fünf Minuten betrug der Maximalwert der CD11b positiven Ereignisse $65,52 \pm 5,07\%$. Es folgte wieder ein Abfall auf $20,54 \pm 5,65\%$ nach vier Stunden. Mit 3000 HU/ml SLO konnte die Aktivierung der PMN mit $65,28 \pm 6,77\%$ nicht weiter erhöht werden (siehe Abbildung 179 bzw. Abbildung 180).

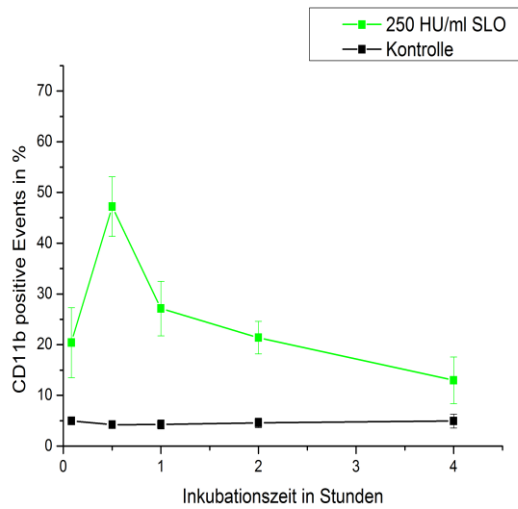


Abbildung 171 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden

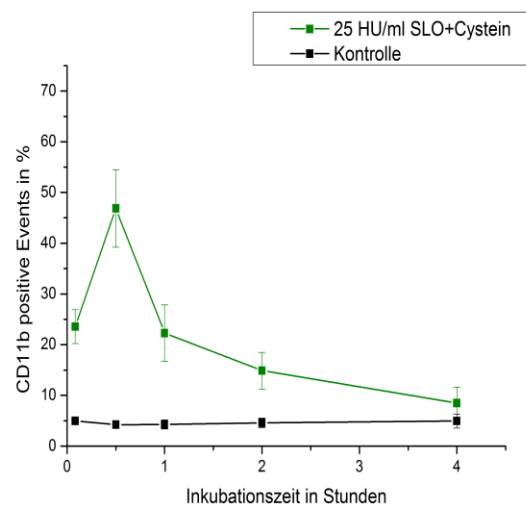


Abbildung 172 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 25 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

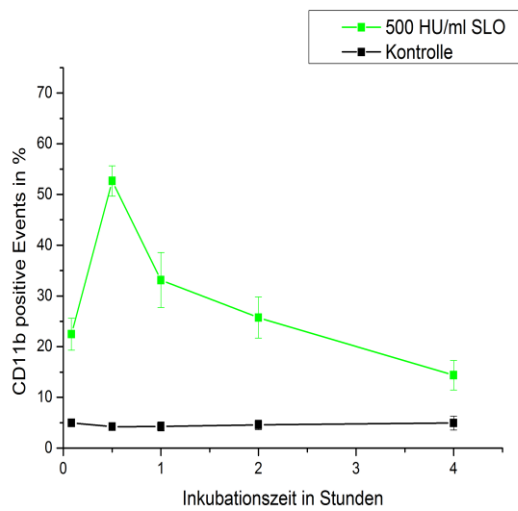


Abbildung 173 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden

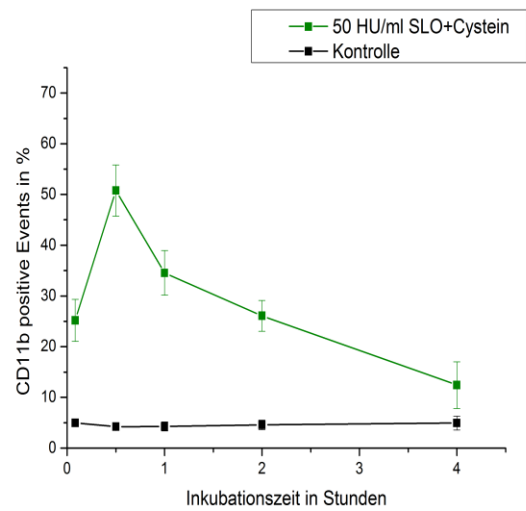


Abbildung 174 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 50 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

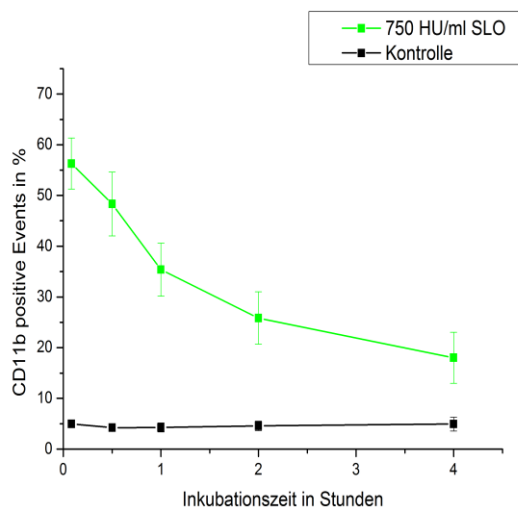


Abbildung 175 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden

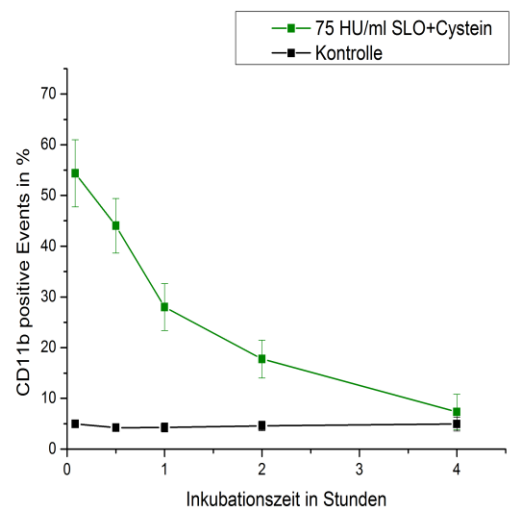


Abbildung 176 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

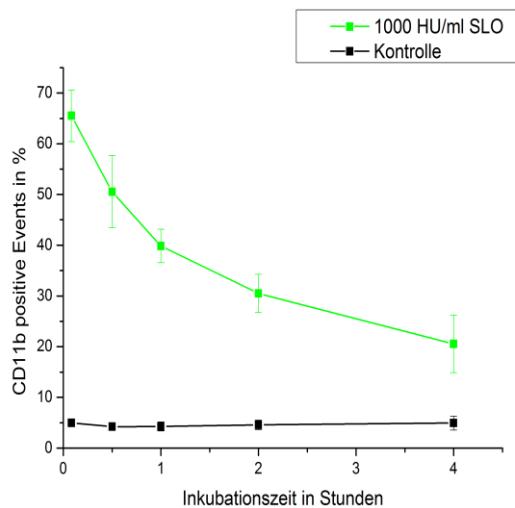


Abbildung 177 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden

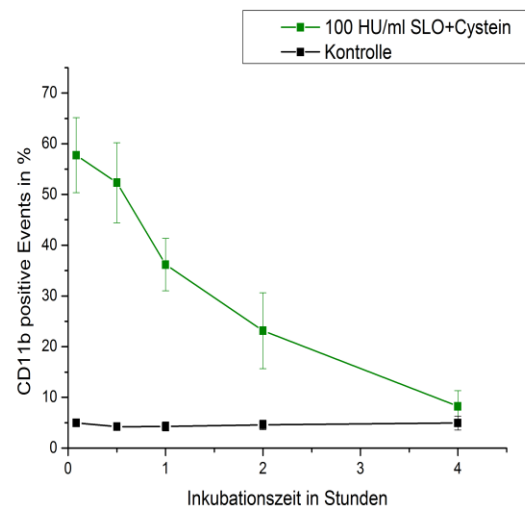


Abbildung 178 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 100 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

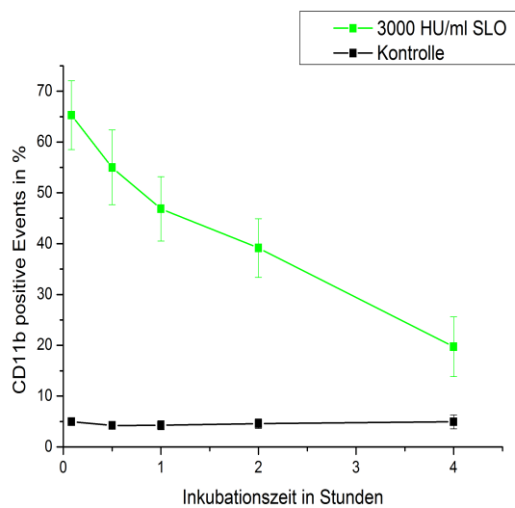


Abbildung 179 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden

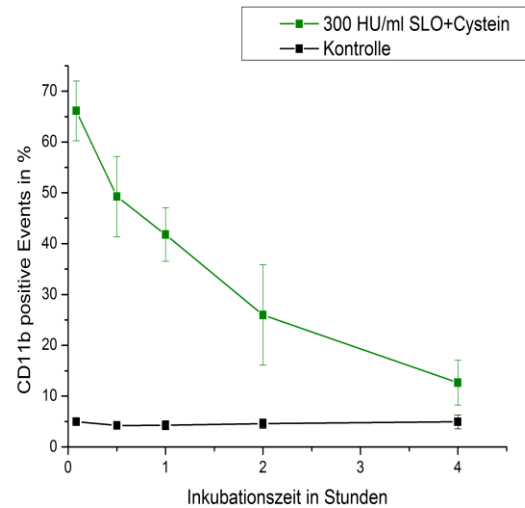


Abbildung 180 CD11b positive Events von PMN inkubiert mit 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz über vier Stunden

Um einen alleinigen Einfluss von Cystein auf die Aktivierung der PMN auszuschließen, wurden diese nur mit Cystein versetzt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung sind in Abbildung 181 dargestellt. Diese zeigt im Vergleich die gemessenen CD11b positiven Events von PMN, die mit 750 HU/ml SLO, 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz und nur mit Cystein in entsprechender Menge über vier Stunden inkubiert wurden. Man erkennt, dass nur mit Cystein versetzte PMN mit CD11b positiven Events nicht aktiviert wurden. Die Werte der mit SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz inkubierten PMN unterschieden sich signifikant im Vergleich zu den Werten der nur mit Cystein versetzten Proben. Nur die Ergebnisse der Inkubation nach vier Stunden mit 750 HU/ml SLO unterschieden sich nicht signifikant von dem Wert der nur mit Cystein behandelten PMN.

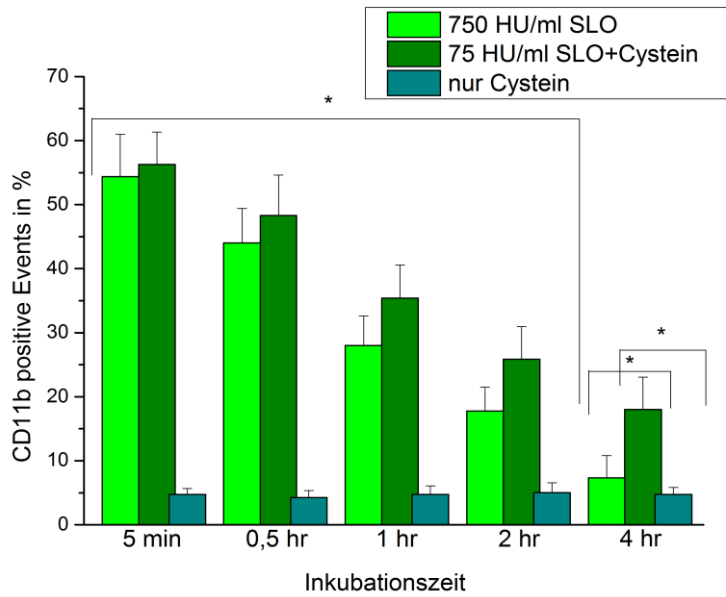


Abbildung 181 Vergleich der CD11b positiven Events von PMN inkubiert mit SLO, SLO mit Cysteinzusatz sowie nur Cystein über vier Stunden

PMN wurden mit 750 HU/ml SLO, 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz sowie nur mit Cystein in entsprechender Menge über einen Zeitraum von vier Stunden inkubiert.

* die Werte der mit 750 HU/ml SLO bzw. 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz inkubierten PMN unterschieden sich signifikant im Vergleich zu den Werten der nur mit Cystein versetzten Proben

Auch die Aggregatbildung konnte mit Toxin stimulierten PMN angeregt werden. Wie in

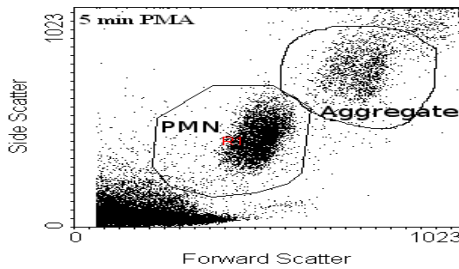
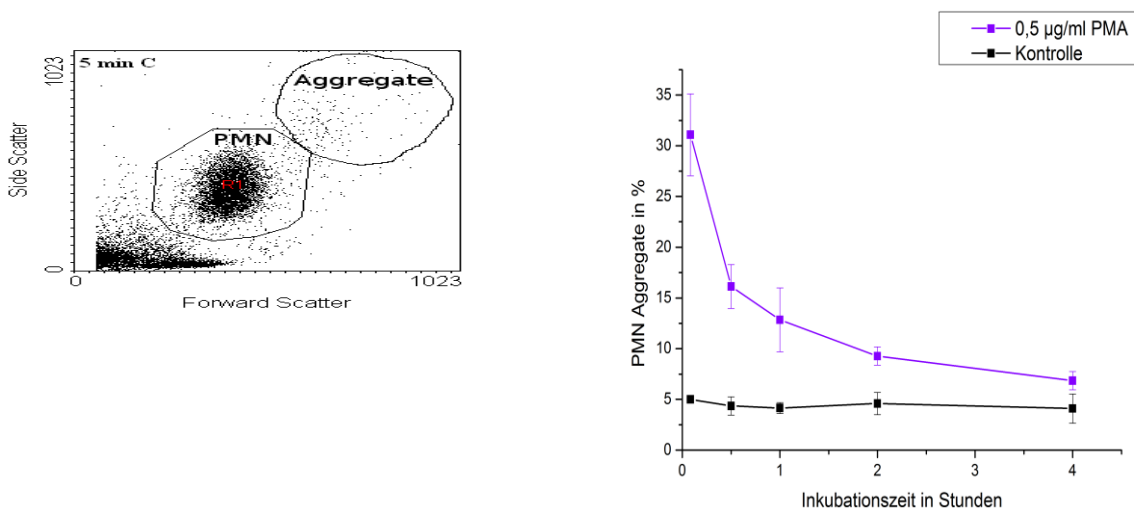


Abbildung 182 zu sehen ist, befinden sich in der unstimulierten Kontrollprobe weniger Aggregate rechts oberhalb der PMN-Population, als bei den mit 0,5 µg/ml PMA stimulierten PMN. So konnten mit PMA-Zusatz $31,08 \pm 4,02\%$ Aggregate nach fünf Minuten vermessen werden (siehe

Abbildung 183).



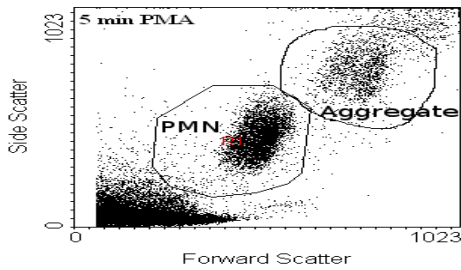


Abbildung 183 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,5 µg/ml PMN über vier Stunden

Abbildung 182 SSC-FSC Dot Plot von unstimulierten (Bild oben) und mit 0,5 µg/ml PMA stimulierten PMN (Bild unten) nach fünf Minuten Inkubationszeit

Ähnlich wie bei den ermittelten CD11b positiven Events wurden bei den mit α-Toxin stimulierten PMN nicht so hohe Werte für die Aggregation erhalten. Nach einer Stunde Inkubation mit 0,05 µg/ml α-Toxin wurde ein Maximalwert von $10,52 \pm 1,27\%$ erreicht, der nach vier Stunden auf $5,34 \pm 0,51\%$ fiel (siehe Abbildung 184). Die folgenden ermittelten Abbildungen von PMN, die mit α-Toxin inkubiert wurden, wiesen einen ähnlichen Graphenverlauf auf. Mit steigender Konzentration an α-Toxin konnte der Maximalwert der Aggregatbildung von $12,86 \pm 1,98\%$ mit 0,5 µg/ml α-Toxin (siehe Abbildung 185) leicht auf $14,83 \pm 1,09\%$ mit 1 µg/ml α-Toxin (siehe Abbildung 186) erhöht werden. Ein Zusatz von 2,5 µg/ml α-Toxin konnte die Aggregatbildung mit einem Maximalwert von $13,55 \pm 2,7\%$ nicht steigern (siehe Abbildung 187).

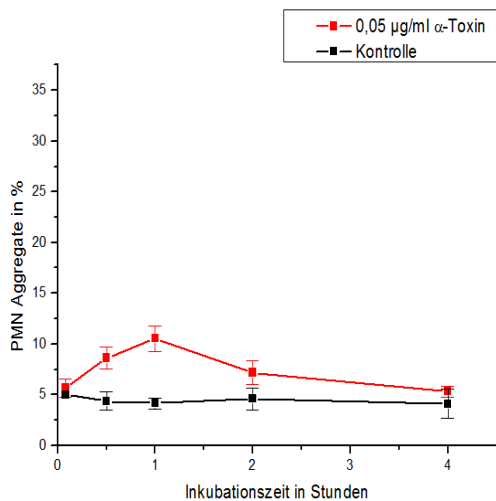


Abbildung 184 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,05 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

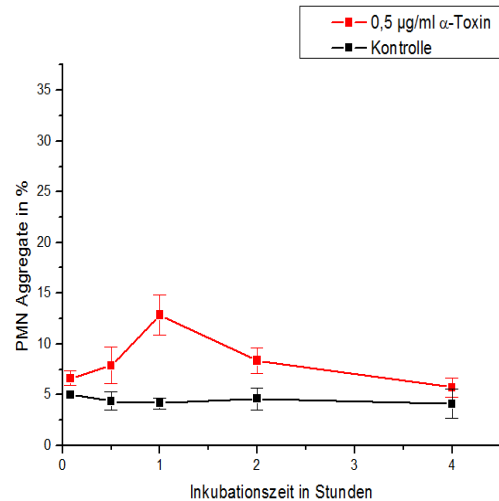


Abbildung 185 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

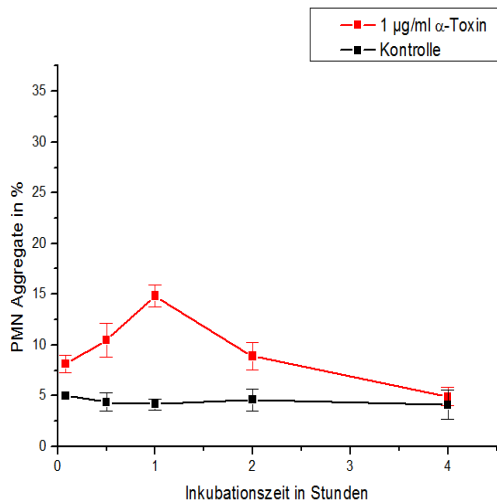


Abbildung 186 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 1 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

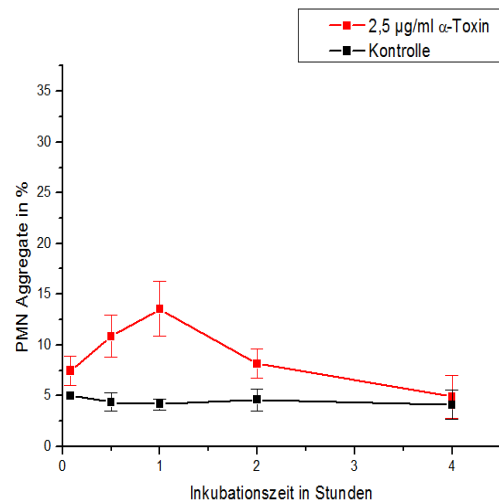


Abbildung 187 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 2,5 µg/ml α-Toxin über vier Stunden

Die mit LPS stimulierten PMN zeigen einen ähnlichen Verlauf der zeitlichen Aggregatbildung. Nach fünf Minuten Inkubationszeit konnte keine Aggregatbildung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Nachdem die PMN eine Stunde mit LPS inkubiert wurden, konnten unter Zusatz von LPS von *E. coli* $23,36 \pm 1,67\%$ (siehe Abbildung 188) bzw. mit LPS von *S. ent.* $23,06 \pm 3,39\%$ (siehe Abbildung 189) positive Ereignisse an Aggregaten vermessen werden. Im Verlauf von vier Stunden sanken die Werte auf Kontrollniveau ab.

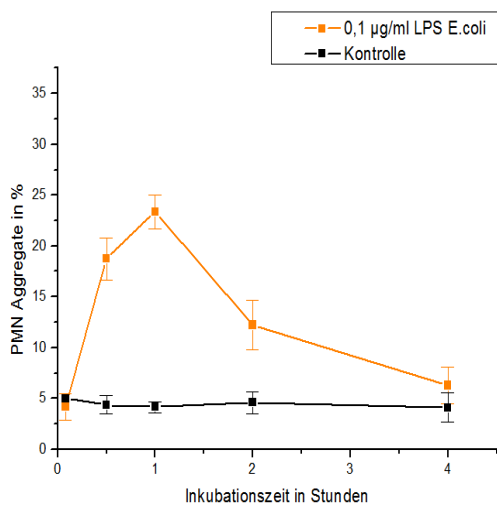


Abbildung 188 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS *E. coli* über vier Stunden

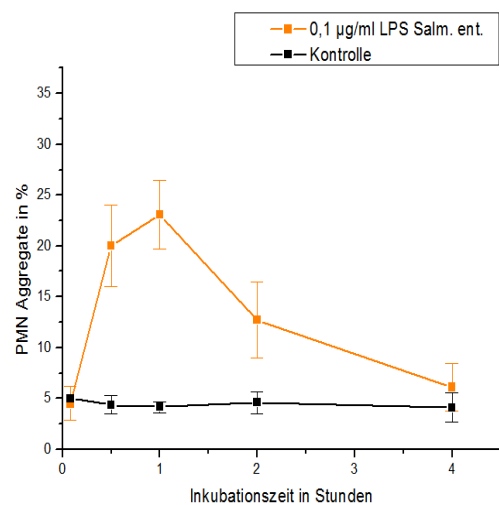


Abbildung 189 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 0,1 µg/ml LPS *Salm. ent.* über vier Stunden

SLO stimulierte PMN zeigten eine vergleichbar hohe Aggregatbildung wie unter α-Toxinzusatz. Bei den mit 250 HU/ml inkubierten PMN konnten nach fünf Minuten $8,27 \pm 1,66\%$ positive Events an Aggregaten festgestellt werden (siehe Abbildung 190). Nach einer halben Stunde wurde ein Maximalwert von $10,31 \pm 1,71\%$ erreicht, der innerhalb von vier Stunden wieder im Kontrollbereich lag. Abbildung 191 zeigt den ähnlich verlaufenden Graphen von mit 500 HU/ml SLO stimulierten PMN, bei denen maximale Aggregate von $11,79 \pm 2,05\%$ gemessen wurde. Ab einer Konzentration von 1000 HU/ml konnte der Maximalwert der positiven Events an Aggregaten, der hierbei nach einer halben Stunde erreicht wurde und sich kaum von dem Wert nach fünf Minuten Inkubationszeit unterschied, nicht mehr gesteigert werden. Nach dem Maximum sank der Wert dann im Verlauf von

vier Stunden nahezu auf Kontrollniveau ab. Unter Zusatz von 750 HU/ml SLO wurden $15,64 \pm 2,22\%$ (siehe Abbildung 192), mit 1000 HU/ml SLO wurden $17,24 \pm 1,97\%$ (siehe Abbildung 193) und mit 3000 HU/ml SLO wurden $15,31 \pm 2,21\%$ (siehe Abbildung 194) positive Ereignisse an Aggregaten bestimmt.

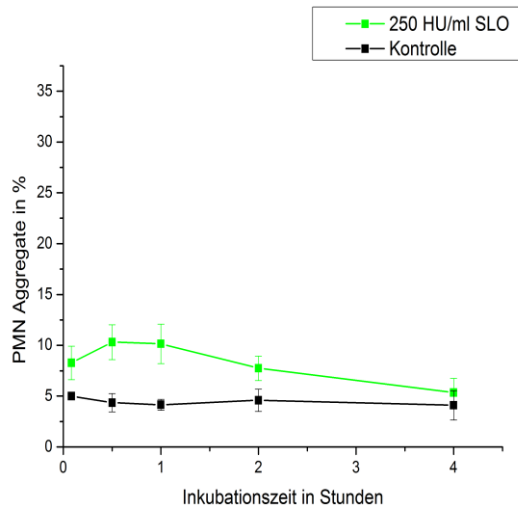


Abbildung 190 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 250 HU/ml SLO über vier Stunden

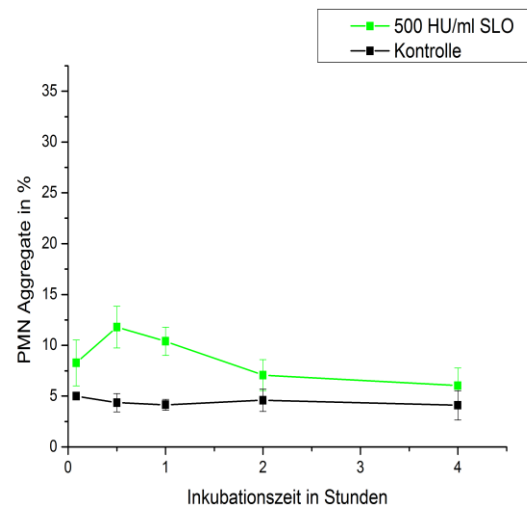


Abbildung 191 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 500 HU/ml SLO über vier Stunden

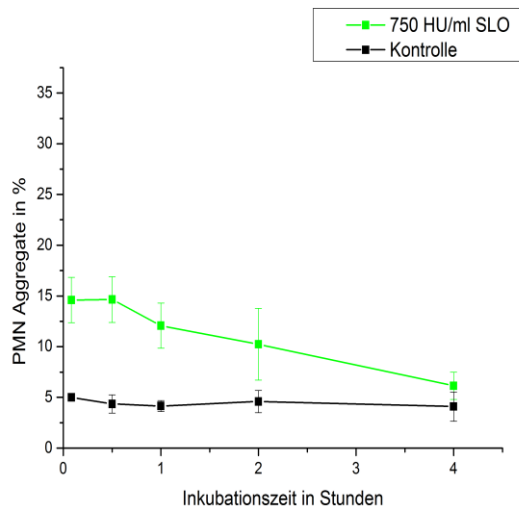


Abbildung 192 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 750 HU/ml SLO über vier Stunden

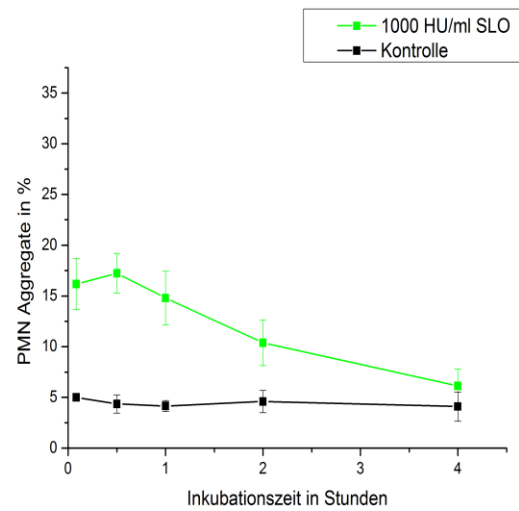


Abbildung 193 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 1000 HU/ml SLO über vier Stunden

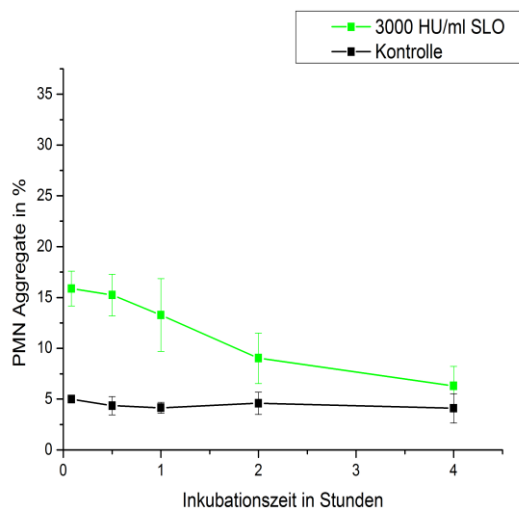


Abbildung 194 Positive Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit 3000 HU/ml SLO über vier Stunden

Die Graphenverläufe von SLO mit Cysteinzusatz für die positiven Events an Aggregaten verliefen sehr ähnlich und wurden deswegen nicht abgebildet. Stattdessen ist in Abbildung 195 der Vergleich der positiven Events an Aggregaten von PMN, die mit 750 HU/ml SLO, mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz sowie nur Cystein in entsprechender Menge über vier Stunden inkubiert wurden abgebildet. Bis auf die erhaltenen Werte nach vier Stunden für die positiven Events an Aggregaten unterscheiden sich die Werte der mit SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz inkubierten PMN signifikant im Vergleich zu den Werten der mit Cystein versetzten Proben, die auf Kontrollniveau blieben.

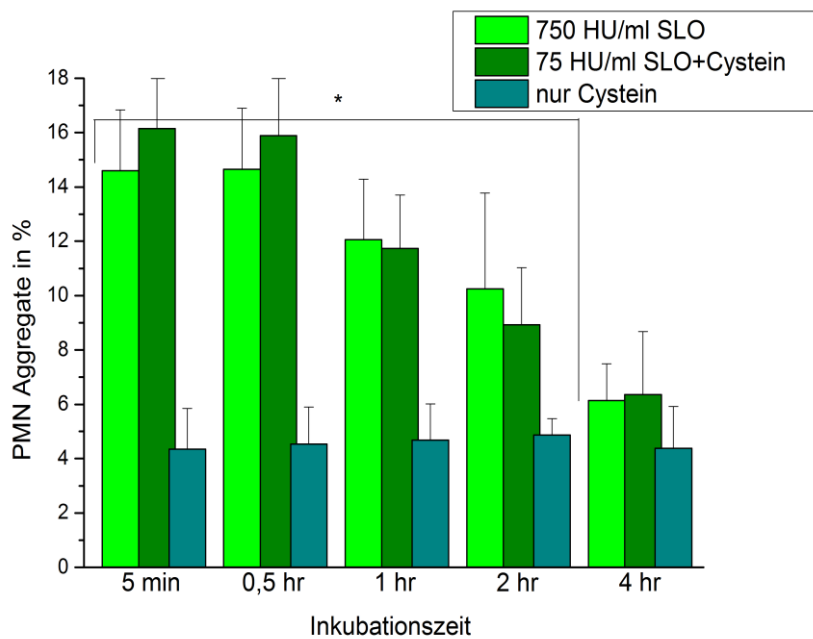


Abbildung 195 Vergleich der positiven Events an Aggregaten von PMN inkubiert mit SLO, SLO mit Cysteinzusatz sowie nur Cystein über vier Stunden

PMN wurden mit 750 HU/ml SLO, 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz sowie nur mit Cystein über einen Zeitraum von vier Stunden inkubiert.

* die Werte der mit 750 HU/ml SLO bzw. 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz inkubierten PMN unterscheiden sich signifikant im Vergleich zu den Werten der nur mit Cystein versetzten Proben

3.3.5.1 Synergistische Interaktionen zwischen PMN und Thrombozyten

Die letzten durchflusszytometrischen Messungen sollten die synergistischen Interaktionen von bakteriell stimulierten Thrombozyten und PMN auf deren Aktivierungsstatus untersuchen (siehe Abbildung 196). Aufgrund von Zeitmangel konnten jedoch nur die PAC-1 positiven Ereignisse von mit 0,1 µg/ml LPS von E. coli versetzten Thrombozyten, die entweder mit bzw. ohne Zusatz von PMN für vier Stunden stimuliert wurden, bestimmt werden. Die Kontrollprobe wurde auf 5% PAC-1 positive Events gesetzt. Im Vergleich dazu konnte keine signifikante Aktivierung des Fibrinogenrezeptors von mit 0,1 µg/ml LPS versetzten Thrombozyten nach vier Stunden Inkubationszeit mit 5,08 ± 0,28% erreicht werden. Durch den Zusatz von PMN in physiologischer Konzentration konnte die Aktivierung der Thrombozyten jedoch signifikant auf 36,49 ± 5,25% erhöht werden.

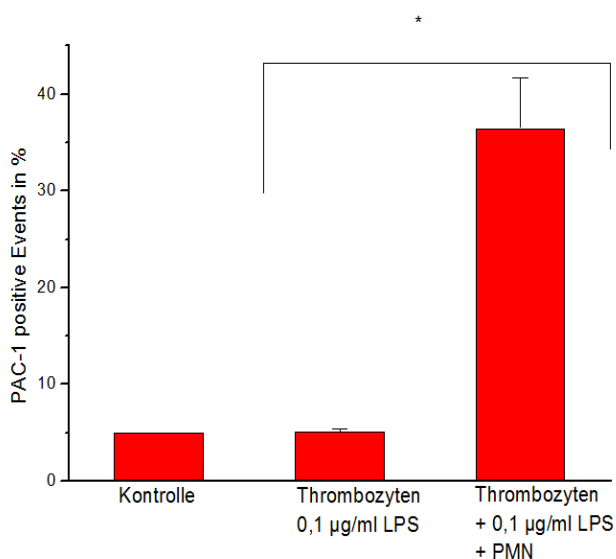


Abbildung 196 Synergistische Interaktionen zwischen Thrombozyten und PMN

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (Kontrolle), mit 0,1 µg/ml LPS sowie zusätzlich mit PMN in physiologischer Konzentration versetzt und für vier Stunden inkubiert.

* die Werte von mit 0,1 mg/ml LPS inkubierten Thrombozyten unterscheiden sich signifikant im Vergleich zu den unter PMN-Zusatz

4. Diskussion

4.1 Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie

Die hierbei eingesetzten physiologischen Plättchenaktivatoren bewirken rezeptorvermittelt über verschiedene Signalkaskaden eine Erhöhung der zytosolischen Calcium- und DAG-Konzentration, die zur Aktivierung der PLA₂, dem shape change, der Degranulation und schließlich zur Funktionalisierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, der über Fibrinogenbrücken die Aggregation der Thrombozyten initiiert, führt [216]. Mit ADP, welches in den dichten Granula der Plättchen gespeichert wird und diese über drei purinerge Rezeptoren beeinflusst [217], betrug die halbmaximale Konzentration für die Thrombozytenaggregation im Mittel 1,91 µM und liegt somit im Konzentrationsbereich zweier in der Literatur gefundener Werte von 1,46 µM [218] bzw. 2,4 µM [219]. Subendotheliales Kollagen wird im Zuge einer Gefäßverletzung freigelegt und führt über eine Aktivierung des GPVI-Rezeptors bzw. von Integrin α₂β₁ zur Thrombozytenaggregation [220]. *Alarayed et al.* beschrieben die Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation mit einer EC₅₀ von 0,88 µg/ml, die ähnlich der hier bestimmten EC₅₀ von 0,72 µg/ml ist. In der gleichen Arbeitsgruppe wurde mit Epinephrin, welches die PLC über adrenerge Rezeptoren aktiviert, eine EC₅₀ von 1,23 µM gemessen [218,221]. Dies gleicht dem hier ermittelten EC₅₀-Wert von 1,20 µM. Die Fettsäure AA wird durch die thrombozytäre COX und Thromboxansynthase in TXA₂ umgewandelt, welches rezeptorvermittelt die PLC aktiviert und zur Thrombozytenaggregation führt [222]. Der in dieser Arbeit bestimmte EC₅₀-Wert von 0,1 mM konnte durch eine Literaturrecherche nicht genau bestätigt werden, da die in der Literatur gefundenen Werte stark variierten. So betrug in Veröffentlichungen der für eine halbmaximale Thrombozytenaggregation gefundene EC₅₀-Wert zum einen 0,32 mM [223] bzw. 0,22 mM [224] zum anderen nur 0,02 mM [225].

In der Literatur konnte für das Antibiotikum Ristocetin eine thrombozytenaggregatorische EC₅₀ von 0,86 mg/ml gefunden werden [226]. Der genaue Wirkmechanismus für das aus einem Bakterium gewonnene Ristocetin ist noch nicht bekannt. Es vermittelt die Bindung von vWF an den thrombozytären GPIb-Rezeptor und führt vermutlich über die Aktivierung von TKs mit anschließender Calciummobilisation und Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa zur Plättchenaggregation [227]. Der gefundene Literaturwert liegt nahe dem hier bestimmten EC₅₀-Wert von 0,7 mg/ml. Während mit Kollagen und Ristocetin stimulierte Thrombozyten einen sigmoiden Kurvenverlauf in dem ausgewählten Konzentrationsbereich zeigten, konnte mit den anderen untersuchten Agonisten ein hyperbelartiger Verlauf festgestellt werden.

Letztendlich liegen die erhaltenen EC₅₀-Werte für die Induzierung der Thrombozytenaggregation mit den endogenen Agonisten ADP, Kollagen und Epinephrin sowie mit dem Antibiotikum Ristocetin, trotz der je nach Blutspender physiologischerweise individuellen Schwankungen für die gemessenen Absolutwerte der Aggregation, in ähnlichen Konzentrationsbereichen, wie die in der Literatur gefundenen Werte. Dies bestätigt die Qualität der PRP-Präparation und die gewählten Versuchsbedingungen der Aggregationsmessung.

Während einer Sepsis kommt es insbesondere zu einer Aktivierung von Blutplättchen, die mit einer gesteigerten Thrombozytenaggregation einhergeht. In Folge dessen kommt es häufig zur Bildung von mikrovaskulären Thromben, sowie zu Thrombozytopenien bis hin zur DIC. Das Ausmaß der hämostatischen Störung scheint dabei mit dem Schweregrad der Sepsis zu korrelieren [228]. Bei der Endokarditis spielen ebenfalls aktivierte Thrombozyten eine wesentliche Rolle im Krankheitsprozess. Die Blutplättchen adhären an dem verletzten Endokard und sind an der Ausbildung von Vegetationen beteiligt, welche im Zuge einer Bakteriämie bevorzugt von den Erregern besiedelt werden [229]. Auch das α-Toxin des bei einer Sepsis und Endokarditis oft vorkommenden Erregers *S. aureus* ist in der Lage Thrombozyten zu aktivieren. Bereits im Jahre 1964 entdeckten *Siegel und Cohen*, dass die Applikation von α-Toxin im Konzentrationsbereich von 1-2,5 µg/ml zu PRP bzw. 0,5-1 µg/ml zu den sensitiver reagierenden, gewaschenen Plättchen zu einer Aggregation und Degranulation der Throm-

bozyten führte [156]. Diese erfolgt nicht rezeptorvermittelt wie bei den physiologischen Agonisten, sondern über Porenbildung. Das Toxin bildet, aus jeweils sieben Monomeren bestehende, transmembranäre Poren in der Thrombozytenmembran aus. Besonders der Einstrom von Calcium-Ionen, die aufgrund des hohen extra-/intrazellulären Konzentrationsgefälles schnell in die Zellen diffundieren, vermittelt vielfältige sekundäre Reaktionen. Die hohe intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentration führt bei den α -Toxin stimulierten Blutplättchen zur Degranulation sowie zur Aktivierung der thrombozytären PLA₂, die zur Bildung von potenten Lipidmediatoren der Arachidonsäure-Kaskade, wie Prostaglandinen und Leukotrienen führt [154]. Somit wird die durch physiologische Agonisten und vermutlich die durch Ristocetin sowie die durch α -Toxin induzierte Plättchenaktivierung letztendlich über Calcium-Ionen als sekundären Botenstoff vermittelt.

Von den getesteten bakteriellen Toxinen war nur α -Toxin in der Lage unter den Versuchsbedingungen (siehe Kap. 3.1.1) innerhalb des Messzeitraumes von drei Minuten, der dem Inkubationszeitraum entspricht, eine Aggregation auszulösen. Schon ab einer Konzentration von etwa 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin setzte die Aggregation ein, die ab 2 $\mu\text{g/ml}$ sprunghaft anstieg und ab 4 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxinzusatz nicht mehr gesteigert werden konnte. Die aus dem sigmoiden Kurvenverlauf ermittelte durchschnittliche EC₅₀ lag bei 3,04 $\mu\text{g/ml}$ und liegt im Bereich zweier in der Literatur gefundener EC₅₀-Werte von 2,98 $\mu\text{g/ml}$ und 3,5 $\mu\text{g/ml}$ [230,231]. Die Schwankungen der mit α -Toxin erhaltenen Aggregationswerte kommen wahrscheinlich durch die individuell unterschiedlichen Konzentrationen an neutralisierenden Lipoproteinen niedriger Dichte, sowie durch plasmatische Antikörpern gegen das Toxin zustande [232].

Da es im septischen Krankheitsverlauf oft zu einer Koinfektion mit anderen Krankheitserregern kommt und dementsprechend auch mehrere Toxine verschiedener Bakterien im Blut zu finden sind, wurde auch die Kombination von α -Toxin mit verschiedensten Konzentrationen an LPS sowie SLO mit und ohne Cysteinzusatz getestet. Hierbei konnte jedoch keine synergistische Verstärkung auf die Thrombozytenaggregation beobachtet werden.

Mit LPS sowie SLO mit bzw. ohne Zusatz von Cystein versetzte Plättchen zeigten keine Aggregation. In der Literatur konnten hierzu auch keine Angaben gefunden werden. Damit Thrombozyten aggregieren können, muss der GPIIb/IIIa-Rezeptor in seiner aktiven Konformation vorliegen, nur dann bindet er mit hoher Affinität Fibrinogen, welches die Thrombozyten miteinander vernetzt und somit zu deren Aggregation führt. Anhand der durchflusszytometrischen Untersuchungen (siehe Kap. 3.3.2) zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors zeigte sich, dass mit 500 HU/ml SLO stimulierte Thrombozyten nach fünf Minuten Inkubationszeit den Fibrinogenrezeptor mit einem Maximalwert von $30,46 \pm 6,08\%$ PAC-1 positiven Events aktivieren. Da bei der Messung der Thrombozytenaggregation der Mess- bzw. Inkubationszeitraum nur drei Minuten betrug, wurden in dieser Zeit wahrscheinlich zu wenige Fibrinogenrezeptoren aktiviert, um eine Aggregation auszulösen. Außerdem kann es sein, dass die maximale Anzahl an aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren unter SLO-Stimulation zu niedrig ist, um eine feste Aggregation der Plättchen zu vermitteln und die Aggregate unter Rühren wieder zerfallen. Die Beobachtung, dass LPS nicht zu einer Aggregation von Plättchen führte, bestätigt die in der Durchflusszytometrie gewonnenen Erkenntnisse, dass LPS den thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptor nicht aktiviert. Dort lagen die Werte von mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten Thrombozyten für die untersuchten Aktivierungsparameter, den PAC-1- und CD62P positiven Events, der PMP- und Aggregatbildung auf Kontrollniveau. Dennoch ist LPS einer der Hauptmediatoren einer Gram-negativen Sepsis [9]. Das Endotoxin führt nicht zu einer direkten Aktivierung von Thrombozyten, kann diese jedoch indirekt beispielsweise über eine Aktivierung des Endothels beeinflussen. So kommt es über eine direkte Aktivierung des Endothels durch die Bindung von LPS an endotheliale PRR, zur Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, zur gesteigerten Expression von TF sowie zur Freisetzung endothelialer, prokoagulanter Mikropartikel, die zu einer Verstärkung der Koagulation führen [233]. Unter den Versuchsbedingungen der Aggregationsmessung kann jedoch der Einfluss des Endothels und weiterer Faktoren, wie sie bei einer Gram-negativen Sepsis vorkommen, nicht erfasst werden.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die durch physiologische Agonisten verursachte Aggregation durch Substanzen, die auf unterschiedlichen Ebenen die Thrombozytenaggregation verhindern, inhibiert werden kann. Bei dem Inhibitor Abciximab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der an ein Epitop des aktiven Fibrinogenrezeptors bindet und somit die Bindung von Fibrinogen, wel-

ches die Plättchen miteinander vernetzt, verhindert [234]. Ein weiterer Inhibitor der Thrombozyten ist Iloprost. Das Prostaglandin-Analogon erhöht rezeptorvermittelt die Aktivität der membrangebundenen Adenylatzyklase, die darauf vermehrt das antiaggregatorisch wirkende cAMP in Thrombozyten bildet [235]. Das von NPN unter Zersetzung abgegebene NO aktiviert die lösliche Guanylatzyklase in Blutplättchen und erhöht damit deren intrazelluläre cGMP-Konzentration, welches ebenso inhibitorische Effekte auf die Thrombozyten hat [236].

Alle untersuchten Inhibitoren konnten die mit einem Agonisten induzierte Thrombozytenaggregation dosisabhängig inhibieren. Tabelle 40 gibt einen Überblick über die wichtigsten bei der Aggregationsmessung ermittelten IC₅₀-Werte.

Tabelle 39 Übersicht über die wichtigsten bei der Thrombozytenaggregation ermittelten IC₅₀-Werte

Agonisten Inhibitoren	ADP (5 µM)	Kollagen (1 µg/ml)	Ristocetin (1 mg/ml)	α-Toxin (3,5 µg/ml)
Abciximab	2,41 µg/ml	0,73 µg/ml	0,43 µg/ml	0,85 µg/ml
Iloprost			0,24 ng/ml	0,17 ng/ml
NPN		8,92 µg/ml	3,54 µg/ml	6,26 µg/ml
Diclofenac	8,56 µg/ml	5,61 µg/ml	5,11 µg/ml	

Mit dem Inhibitor Abciximab konnte bei der durch 5 µM ADP induzierten Thrombozytenaggregation eine halbmaximale inhibitorische Konzentration von 2,41 µg/ml bestimmt werden. *Uzuki et al.* konnten mit 20 µM ADP einen vergleichbaren Wert mit einer IC₅₀ von 2,52 µg/ml bestimmen. Für die mit Kollagen induzierte und mit Abciximab gehemmte Aggregation konnte dieselbe Arbeitsgruppe eine IC₅₀ von 2,07 µg/ml bestimmen. Bei unseren Untersuchungen wurde jedoch eine IC₅₀ von 0,73 µg/ml ermittelt. Zu bemerken ist allerdings, dass die Arbeitsgruppe von *Uzuki* 200 µg/ml Kollagen zur Aggregationsinduzierung verwendete, während bei den vorliegenden Versuchen nur 1 µg/ml Kollagen eingesetzt wurde [237]. Ähnliche IC₅₀-Werte von 1,81 µg/ml für die mit 20 µM ADP bzw. 3,09 µg/ml für die mit 5 µg/ml Kollagen induzierte und mit Abciximab inhibierte Aggregation konnten *Harder und Klinkhardt et al.* bestimmen [238]. Bei mit 1,5 mg/ml Ristocetin stimulierten Plättchen konnten *Uzuki et al.* trotz Abciximabzugabe die Plättchenaggregation nicht unterbinden [237]. In dieser Arbeit konnte jedoch eine IC₅₀ von 0,43 µg/ml mit einer durch 1 mg/ml Ristocetin induzierten und Abciximab inhibierten Plättchenaggregation ermittelt werden.

Bei den mit 1 mg/ml Ristocetin stimulierten und Iloprost inhibierten Plättchen betrug die mittlere Konzentration von Iloprost, bei der eine halbmaximale Inhibition auftrat 0,24 ng/ml. Die in einer Veröffentlichung gefundene IC₅₀-Konzentration für Iloprost lag im Bereich von 0,06 ng/ml beim Menschen bis 4,3 ng/ml beim Affen. Aus der Quelle geht jedoch nicht hervor mit welchem Agonisten und in welcher Konzentration die Thrombozyten aktiviert wurden [93]. Weitere Vergleiche zwischen den hier ermittelten IC₅₀-Werten und Angaben aus der Literatur konnten nicht gezogen werden, da keine Veröffentlichungen hierzu gefunden wurden.

Festzustellen ist, dass die mit 5 µM ADP induzierte und mit Abciximab inhibierte Aggregation einen wesentlich höheren IC₅₀-Wert von 2,41 µg/ml als die mit 1 µg/ml Kollagen (IC₅₀ = 0,73 µg/ml) und 1mg/ml Ristocetin (IC₅₀ = 0,43 µg/ml) induzierte Aggregation zeigte. Somit hat ADP hierbei keine so hohe aggregationsinduzierende Wirkung wie Kollagen und Ristocetin. Dies konnte auch mit Diclofenac beobachtet werden. Der mit Diclofenac bestimmte IC₅₀-Wert mit 8,56 µg/ml bei den ADP stimulierten Thrombozyten war höher als bei den mit Kollagen (IC₅₀ = 5,61 µg/ml) und Ristocetin (IC₅₀ = 5,11 µg/ml) behandelten Blutplättchen. Die bei diesen Inhibitionsversuchen beobachteten Kurvenverläufe waren sehr variabel, sodass keine Gemeinsamkeiten erkannt werden konnten.

Auch die mit α-Toxin induzierte konzentrationsabhängige Aggregation konnte durch den Einsatz der Inhibitoren Abciximab, Iloprost und NPN inhibiert werden. Durch Zugabe von Abciximab konnte die mit 3,5 µg/ml α-Toxin induzierte Aggregation effektiv gehemmt werden. Es wurde eine IC₅₀ von 0,85 µg/ml, ähnlich der unter Kollagen induzierten und mit Abciximab gehemmten Aggregation (IC₅₀

= 0,73 µg/ml), ermittelt. Auch die IC₅₀-Werte für die mit α-Toxin und Kollagen induzierte und mit NPN inhibierte Aggregation liegen in einem ähnlichen Bereich, sodass anzunehmen ist, dass Kollagen einen ähnlich starken aggregationsinduzierenden Effekt auf die Plättchen wie α-Toxin ausübt. Des Weiteren ergab sich ein hyperbelartig abfallender Kurvenverlauf, der zumeist ebenso bei der durch physiologische Agonisten verursachten und mit Abciximab inhibierten Aggregation festgestellt wurde. Die mit α-Toxin induzierte und mit Iloprost gehemmte Aggregation konnte nur zum Teil verhindert werden. Trotz Zugabe hoher Dosen an Iloprost konnte eine relative Aggregation von circa 20% nicht unterschritten werden. Auch *Wegner et al.* konnten mit Iloprostzugabe nur eine etwa 50%ige Senkung der α-Toxin vermittelten Aggregation feststellen [230]. Der für die α-Toxin induzierte und mit Iloprost inhibierte ermittelte IC₅₀-Wert betrug 0,17 ng/ml und liegt somit im Bereich der durch Ristocetin induzierten und mit Iloprost-Zusatz gehemmten Plättchenaggregation (IC₅₀ = 0,24 ng/ml). Für die nachfolgenden ermittelten IC₅₀-Konzentrationen konnten keine weiteren Vergleichswerte in der Literatur gefunden werden.

Der NO-Donator NPN erwies sich wie Abciximab als effektiver Inhibitor bei einer durch α-Toxin verursachten Plättchenaggregation. Der aus den Messungen ermittelte IC₅₀-Wert betrug 6,26 µg/ml und liegt somit im Bereich einer durch Kollagen (IC₅₀ = 8,29 µg/ml) und Ristocetin (IC₅₀ = 3,54 µg/ml) induzierten und ebenfalls mit NPN gehemmten Thrombozytenaggregation. Somit ähnelt die aggregationsinduzierende Potenz von α-Toxin der von Kollagen und Ristocetin. Bezüglich der Kurvenverläufe konnte bis auf die mit NPN inhibierte Thrombozytenaggregation, deren Kurvenverlauf nahezu sigmoid abfällt, bei den mit Abciximab und Iloprost inkubierten Plättchen ein hyperbelartiger Abfall der Thrombozytenaggregation mit steigendem Inhibitorzusatz beobachtet werden. Ähnliche Kurvenverläufe wurden auch bei der durch die physiologischen Agonisten bzw. Ristocetin induzierten und anschließend inhibierten Aggregation beobachtet.

Weyrich et al. zeigte, dass Thrombin stimulierte Blutplättchen nach nur wenigen Minuten Inkubationszeit Proteine, wie Bcl-3 exprimieren können [105]. Um den Einfluss von α-Toxin auf die de novo Expression von Proteinen im Zusammenhang mit der Aggregation zu untersuchen, wurden die Translationsinhibitoren Puromycin und Rapamycin getestet. Mit dem globalen Translationsinhibitor Puromycin konnte eine nahezu lineare Inhibition der Aggregation (IC₅₀ = 4,86 mM) beobachtet werden. Bei längerer Inkubationszeit besitzt das Purin-Derivat durch die Hemmung der Proteinbiosynthese toxische Wirkungen auf sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Zellen [239,240]. Da die Plättchen hierbei nur drei Minuten mit dem Nukleosid-Antibiotikum inkubiert wurden, können derartige toxische Effekte auf die Plättchen ausgeschlossen werden. Zudem wurden die Thrombozyten zur Hemmung der Bcl-3 Expression zwar nur mit Puromycin im 1 mM Konzentrationsbereich, aber dennoch für über vier Stunden mit dem Antibiotikum, behandelt und dies hatte keine gravierenden feststellbaren toxischen Effekte auf die Zellen. Denkbar wäre, dass Puromycin unabhängig von der Wirkung auf die Proteinbiosynthese andere toxische Effekte auf die Zellen hat und somit die Aggregationsfähigkeit der Plättchen mit steigender Puromycin-Konzentration abnimmt. *Rosenwald et al.* konnten auch eine Abnahme der Thrombozytenaggregation unter Puromycineinfluss feststellen. Sie inkubierten PRP mit 3,55 µM Puromycin und testeten anschließend dessen Aggregationsfähigkeit durch Zugabe einer Mischung aus ADP (2,3 µM) und Epinephrin (5 µM) nach verschiedenen Inkubationszeiten. Diese Arbeitsgruppe konnte jedoch erst innerhalb eines Inkubationszeitraumes von 24 bis 48 Stunden mit Puromycin einen deutlichen Abfall der Thrombozytenaggregation messen [241]. Demzufolge scheint die Proteinsynthese auch einen Einfluss auf die physiologischen Funktionen der Plättchen, wie der Aggregationsfähigkeit, zu haben. Auch mit dem mTOR-Inhibitor Rapamycin konnte zunächst eine effektive inhibitorische Wirkung auf die Blutplättchen festgestellt werden. Da Ethanol als Trägerflüssigkeit verwendet wurde, kam es zu einer alleinigen Testung des Trägers. Hierbei zeigte sich, dass die festgestellte inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation jedoch allein dem Lösungsmittel zuzuschreiben war.

Abschließend wurde durch die Zugabe unterschiedlicher PMN-Konzentrationen zu PRP die synergistischen Effekte der Interaktion von Thrombozyten und PMN während der Plättchenaggregation untersucht. Da Thrombozyten und neutrophile Granulozyten das inflammatorische und thrombotische System miteinander verbinden, spielt die Interaktion zwischen diesen Zellen bei Sepsis und Endokarditis vermutlich eine entscheidende Rolle [242]. Gerade die Dysregulation von Inflammation und

Hämostase ist kennzeichnend für das septische Krankheitsgeschehen. Störungen in der Mikrozirkulation führen oft zu einer Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und können bis zum MODS führen. Die Plättchenaggregation und Formation von Plättchen-PMN-Aggregaten spielt eine zentrale Rolle bei der mikrovaskulären Obstruktion [243].

Die Interaktion zwischen den beiden Zellarten findet hauptsächlich über PSGL-1, welcher sich auf den PMN befindet und das thrombozytäre P-Selektin bindet, statt. Eine dauerhafte und feste Bindung wird durch das β_2 -Integrin MAC-1, welches das GPIb der Plättchen bindet, sowie durch die simultane Bindung von Fibrinogen zwischen GPIIb/IIIa und MAC-1, erreicht. Neben dieser Integrin vermittelten Aktivierung von PMN werden die Granulozyten auch durch freigesetzte Chemokine und Lipidmediatoren der Thrombozyten stimuliert [244].

In Tabelle 41 sind die Ergebnisse der Aggregationsmessung von Thrombozyten mit PMN-Zusatz zusammengefasst. Für die Messungen wurden die Zellen zunächst mit PMA als Positivkontrolle stimuliert. PMA aktiviert die PKC verschiedenster Zellen, wodurch nachfolgende Proteine wie Pleckstrin phosphoryliert werden und die Aggregation und Sekretion von PMN und Thrombozyten induziert wird [210,245]. Ein signifikanter Unterschied zur Probe ohne PMN-Zusatz, welche auf den Wert eins gesetzt wurde, konnte bei PMA und α -Toxin stimulierten Zellen erst ab einer Zugabe von 4500 PMN/ μ l festgestellt werden. Bei den mit 0,5 μ g/ml PMA stimulierten Zellen stieg der Aggregationswert signifikant ab einer Zugabe von 4500 PMN/ μ l mit steigender PMN-Anzahl an. Bei den mit 3,5 μ g/ml α -Toxin stimulierten Thrombozyten wurde der erhaltene Aggregationswert ebenfalls gleich eins gesetzt. Ab einem Zusatz von 4500 PMN/ μ l, der im mittleren physiologischen Konzentrationsbereich liegt, erhöhte sich die Aggregation ebenfalls signifikant. Durch den Zusatz von 7500 PMN/ μ l konnte der Aggregationswert schließlich um mehr als das Doppelte des ursprünglichen Wertes ohne PMN-Zusatz erhöht werden. Die bestimmten relativen Aggregationswerte von mit PMA und α -Toxin inkubierten Blutzellen unterschieden sich nur geringfügig. Diese Ergebnisse beweisen, dass durch die Interaktion zwischen Thrombozyten und PMN signifikante synergistische Effekte auf die Aggregation resultieren. Mit den Toxinen LPS und SLO mit bzw. ohne Cysteinzusatz konnte durch den Zusatz von PMN zu den Thrombozyten keine messbare Aggregation innerhalb von drei Minuten festgestellt werden.

Tabelle 40 Zusammenfassung der Ergebnisse der Thrombozytenaggregation mit PMN-Zusatz

	+ 2000 PMN	+ 4500 PMN	+ 7500 PMN
PMA (0,5 μ g/ml)	1,26 \pm 0,08	1,9 \pm 0,38	2,19 \pm 0,16
α-Toxin (3,5 μ g/ml)	1,13 \pm 0,12	1,75 \pm 0,23	2,27 \pm 0,16

Unter dem Mikroskop wurden die Zellen anders als am Aggregometer erst nach vierstündiger Inkubationszeit betrachtet, sodass hier unterschiedliche Ergebnisse vorlagen. Die mit 750 HU/ml SLO und 0,5 μ g/ml α -Toxin stimulierten Plättchen lagen nach vier Stunden in einem aufgequollenen und aggregierten Zustand vor. Durch den Zusatz von PMN kam es zur Ausbildung von Thrombozyten-PMN Aggregaten. Da SLO die Thrombozyten nicht so stark wie α -Toxin aktiviert, ist die durch SLO induzierte Bindung zwischen PMN und Thrombozyten vermutlich nicht so stark, dass die Aggregate unter rühren, wie dies am Aggregometer geschieht, zerfallen. Die Inkubation mit LPS führte nicht, wie schon am Aggregometer beobachtet, zur Aggregation der Thrombozyten. Unter PMN-Zusatz wurden PMN-Aggregate und nur wenige aggregierte Thrombozyten beobachtet. Die PMA stimulierten Thrombozyten lagen unter dem unerwarteterweise Mikroskop nicht aggregiert vor, bildeten jedoch unter PMN-Zusatz deutliche Aggregate aus, wie es auch bei der aggregometrischen Messung beobachtet wurde.

4.2 Ergebnisse der Bcl-3 Proteinexpression unter Toxineinfluss

Thrombozyten sind als anukleare Zellen nicht in der Lage eine Transkription, die während der Proteinbiosynthese im Zellkern stattfindet, durchzuführen. Allerdings erhalten Blutplättchen, während sie durch zytoplasmatische Fragmentation aus Megakaryozyten hervorgehen, von diesen mRNA, Ribosomen sowie weitere wichtige Regulationsproteine um eine Translation durchzuführen. Auch ein vollständiges Spleißosom, welches normalerweise im Zellkern oder den Mitochondrien vorliegt, erhalten die Plättchen von diesen Vorläuferzellen. Mit dem Spleißosom sind Thrombozyten in der Lage nicht codierende Introns aus der prä-mRNA zu entfernen. So konnten *Denis et al.* zeigen, dass aktivierte Thrombozyten integrinvermittelt Introns aus einer IL-1 β prä-mRNA herausschnitten, um eine reife mRNA zu erhalten, die zu IL-1 translatiert wurde [246].

Neben der konstitutiven Expression von Proteinen, wie dem GPIIb/IIIa-Rezeptor oder Aktin, sind Thrombozyten auch in der Lage signalabhängig Proteine zu synthetisieren, die wichtige Funktionen erfüllen. Solche Proteine wie Bcl-3, IL-1 β , TF, PAI-1 sowie die COX-1 und -2 regulieren wichtige Vorgänge, bei der Gerinnelretraktion, der Inflammation, Koagulation, dem zellulären Transport sowie dem Formwandel [247,248]. Eine signalabhängige Translation von Proteinen ist erst nach Aktivierung der Thrombozyten möglich. Durch den Integrin vermittelten Formwandel wird das 4E-BP1 von mTOR phosphoryliert, der eIF-4E wird dadurch frei und kann durch den shape change in das Zytoskelett zur mRNA verlagert werden. Dort bindet der eIF-4E an die Cap-Struktur der mRNA und führt diese zum Ribosom, wo die Translation stattfindet [249].

Es ist bekannt, dass Thrombozyten durch physiologische Stimuli angeregt Proteine exprimieren. Der Arbeitsgruppe um *Weyrich et al.* gelang 1998 der Nachweis, dass Thrombin stimulierte Blutplättchen zeit- und konzentrationsabhängig das Protein Bcl-3 aus megakaryozytärer mRNA translatieren [105]. Sie stellten weiterhin fest, dass die Inhibierung der Bcl-3 Expression die clot retraction von humanen Thrombozyten unterbindet und somit kein stabiler Thrombus entsteht. Die Überexpression des Proteins in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, die ebenfalls GPIIb/IIIa-Rezeptoren exprimierten, führte jedoch zu einer verstärkten clot retraction [90,251].

Das Bcl-3 Protein wurde bei den hier durchgeführten Western Blot Analysen bei circa 70 kDa detektiert. Die Angaben in der Literatur über das Molekulargewicht des Proteins reichen von 55 bis 77 kDa. So detektierte *Brasier et al.* Bcl-3 in unterschiedlichen Isoformen von drei bis fünf Banden im Bereich von 63-77 kDa [105-107]. Die unterschiedlichen Molekulargewichte ergeben sich durch verschiedene Isoformen, sowie durch posttranslationale Modifikation, etwa durch Phosphorylierung oder durch eine Glykolisierung des Proteins [252].

Neben dem physiologischen Agonisten Thrombin wurde in dieser Arbeit der Einfluss der bakteriellen Toxine α -Toxin und SLO auf die Bcl-3 Expression mittels Western Blot Analysen untersucht. Nachdem *Schubert et al.* der Nachweis gelang, dass α -Toxin stimulierte Thrombozyten das Protein Bcl-3 exprimierten, konnte hierbei auch die SLO vermittelte Bcl-3 Expression nachgewiesen werden [231]. Da die Expression von Proteinen bzw. dem Bcl-3 Integrin vermittelt stattfindet, wurden die Versuche zunächst in Suspension mit Fibrinogen bzw. von Plättchen adhären an Fibrinogen oder Kollagen durchgeführt. Erst infolge einer Aktivierung, etwa durch Thrombin oder α -Toxin geht das Integrin GPIIb/IIIa in seine aktive Konformation über und ist nun in der Lage an das bei den Adhäsionsversuchen immobilisierte Fibrinogen oder Kollagen zu binden bzw. über Fibrinogenbrücken, wie bei den Versuchen in Suspension mit Fibrinogen, miteinander zu aggregieren [108].

Die Ergebnisse der Bcl-3 Expression von stimulierten Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen wurden als relative Signalintensitäten der Bcl-3 Expression im Vergleich zu der unstimulierten Kontrollprobe, die gleich eins gesetzt wurde, in Tabelle 42 zusammenfassend dargestellt. Anhand der Ergebnisse erkennt man, dass die exogenen bakteriellen Toxine, ebenso wie der endogene physiologische Agonist Thrombin, in der Lage sind eine Proteinexpression in Plättchen anzuregen. Die Expression des Bcl-3 Proteins unter α -Toxin Stimulation ähnelte der physiologischen Positivkontrolle unter Thrombinzusatz. Im Vergleich dazu, stieg die Expression unter SLO Stimulation deutlich an. Bei mit 0,1 μ g/ml LPS inkubierten Plättchen konnte mit $1,31 \pm 0,60$ keine signifikante Erhöhung der Bcl-3 Expression beobachtet werden. Die mikroskopische Untersuchung bestätigte die Ergebnisse der

Western Blots. Die mit 0,5 µg/ml α-Toxin, 750 HU/ml SLO und 0,1 U/ml Thrombin behandelten Plättchen lagen im Gegensatz zur Kontroll- und der mit 0,1 µg/ml LPS versetzten Probe aggregiert vor.

Tabelle 41 Ergebnisse der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression von stimulierten Thrombozyten

Thrombozyten	Thrombin(0,1 U/ml)	α-Toxin(0,5 µg/ml)	SLO (750 HU/ml)
in Suspension mit Fibrinogen	3,71 ± 0,91	3,29 ± 0,36	12,31 ± 1,17
adhärent an Fibrinogen	1,8 ± 0,46	1,99 ± 0,63	7,97 ± 0,84
adhärent an Kollagen	2,53 ± 0,57	2,85 ± 1,05	6,95 ± 1,34

Die Expression des Bcl-3 Proteins von an Fibrinogen adhärenen Plättchen war signifikant gegenüber der Kontrollprobe erhöht und ähnelte der Expression von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen. Jedoch war die Bcl-3 Expression generell etwas niedriger, da vermutlich anders als bei den Plättchen in Suspension, die von Fibrinogen umgeben waren, nur ein Teil der Fibrinogenrezeptoren an das adhären Fibrinogen binden konnte. Mit Thrombin aktivierte Plättchen wiesen eine nur unwesentlich erhöhte Expressionsrate als die mit α-Toxin inkubierten Plättchen auf. Bei den mit SLO stimulierten Blutplättchen ergab sich wieder eine deutlich erhöhte relative Bcl-3 Expression.

Pabla et al. beobachteten, dass auch an Kollagen adhärenen Thrombozyten das Protein Bcl-3 exprimierten. Unklar ist noch, ob die Bcl-3 Expression direkt über Integrin $\alpha_2\beta_1$ vermittelt wird oder ob diese letztendlich durch die $\alpha_2\beta_1$ -integrinvermittelte Degranulation von Fibrinogen und Thrombozytenagonisten wie ADP, welche zu einer Aktivierung des Fibrinogenrezeptors führen, stattfindet [108]. Bei den Versuchen zur Proteinexpression von an Kollagen adhärenen Plättchen ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den an Fibrinogen adhärenen Thrombozyten. Wieder waren die stimulierten Proben im Vergleich zur Kontrollprobe signifikant erhöht. Bei den mit Thrombin und α-Toxin versehenen Proben wurden ähnliche Expressionswerte erhalten, die etwas höher als bei den Plättchen adhären an Fibrinogen waren. Eine deutliche Zunahme der Bcl-3 Expression wurde wieder bei den mit SLO stimulierten Thrombozyten beobachtet. Bei den Adhäsionsversuchen an Kollagen konnten also ähnliche Tendenzen zur Bcl-3 Expression, wie bei den Adhäsionsversuchen an Fibrinogen und bei den Suspensionsversuchen beobachtet werden. Die Substanzen α-Toxin und Thrombin führen mit den gewählten Matrices zu ähnlichen Expressionsraten an Bcl-3. Das Toxin SLO zeigte sich bei allen gewählten Matrices als potenterer Induktor der Bcl-3 Expression als α-Toxin und Thrombin.

Um den Einfluss von Fibrinogen auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden Thrombozyten mit 0,5 µg/ml α-Toxin bzw. 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension sowohl mit als auch ohne Fibrinogen inkubiert. Ohne den Fibrinogenzusatz ergab sich mit α-Toxin stimulierten Plättchen eine Senkung der relativen Signalintensität um etwa die Hälfte im Vergleich zur mit Fibrinogen inkubierten Probe, die gleich eins gesetzt wurde. Bei SLO behandelten Thrombozyten konnte eine noch stärkere Reduktion der Expression festgestellt werden. Es scheint, dass je stärker der Thrombozytenagonist ist, umso größer die Reduktion der Bcl-3 Expression ohne Fibrinogenzusatz ausfällt. Die Ergebnisse bestätigen außerdem die Aussage von *Pabla et al.*, dass die Expression von Bcl-3 durch die Bindung von Fibrinogen an das aktivierte Integrin $\alpha IIb\beta_3$ vermittelt wird. In der Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass über das aktivierte Integrin $\alpha IIb\beta_3$ ein Signal in die Plättchen geleitet wird (outside-in signaling), welches zur Expression von Bcl-3 benötigt wird. Sowohl der Zusatz von zu Fibrinogen kompetitiven Peptiden als auch Antikörper, welche die Fibrinogenbindungsstelle des GPIIb/IIIa-Rezeptors blockierten erniedrigten die Plättchenaggregation und Bcl-3 Expression [108].

Zu einer vollständigen Reduktion der Bcl-3 Expression kam es wahrscheinlich nicht, da die durch SLO bzw. α-Toxin induzierte Thrombozytenaktivierung zur einer Degranulation führt. In der thrombozytären Granula ist Fibrinogen gespeichert, welches an den aktivierten Fibrinogenrezeptor binden kann und darüber zur Bcl-3 Expression führt. Somit ist das im Blut physiologischerweise vorkommende Fibrinogen sowie das aus den Granula nach Aktivierung zusätzlich freigesetzte Fibrinogen ein wesentlicher Faktor für die thrombozytäre Proteinexpression.

Da es sich bei der Sepsis Endokarditis um einen über mehrere Tage andauernden Krankheitsprozess handelt und die Thrombozyten somit über einen längeren Zeitraum Bakterien und deren Toxinen

ausgesetzt sind, wurde auch die Zeitabhängigkeit der Protein-Expression untersucht. Da SLO im Vergleich mit Thrombin und α -Toxin stimulierten Plättchen bei den Suspensions- und Adhäsionsversuchen eine deutlich erhöhte Bcl-3 Expression zeigte, schien die SLO vermittelte zeitabhängige Expression von Bcl-3 besonders interessant zu sein.

Das Zytolysin SLO interagiert ähnlich wie α -Toxin mit Zellmembranen und perforiert diese. Dabei bindet das wasserlösliche SLO-Monomer jedoch nur an cholesterolhaltige Zellmembranen, an denen das Toxin spontan zu amphiphilen, ringähnlichen Strukturen mit 50-80 Untereinheiten oligomerisiert. Es entstehen transmembranäre, hydrophile Poren mit über 30 nm Durchmesser, die den Austausch von großen Ionen und Makromolekülen zulassen [253].

Die SLO (750 HU/ml) vermittelte Bcl-3 Expression in Thrombozyten innerhalb von 24 Stunden zeigte einen Gauß'schen Kurvenverlauf. Nach vier Stunden wurde eine maximale relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von $12,34 \pm 1,32$ erreicht. Bis auf die Bcl-3 Expression nach 24 Stunden waren alle ermittelten Expressionswerte im Vergleich zur Kontrollprobe signifikant erhöht. Die mikroskopische Betrachtung der Kontrollplättchen nach 12 und 24 Stunden, die im Gegensatz zur SLO behandelten Probe nicht aggregiert vorlagen, bestätigte die niedrigen Bcl-3 Expressionsraten der Western Blot Analysen und lässt ebenso davon ausgehen, dass die Thrombozyten nicht aufgrund der verstrichenen Zeit oder anderer Einflüsse wie einem Abfall des pH-Wertes aktiviert wurden. Die stetige Reduktion der Bcl-3 Expression nach vier Stunden Inkubationszeit könnte durch die toxischen Eigenschaften von SLO bedingt sein. Je länger die Zellen dem Einfluss des Toxins unterliegen, umso mehr Plättchen sterben ab und sind nicht mehr zur Translation des Bcl-3 Proteins befähigt.

Nicht nur eine zeit- sondern auch eine konzentrationsabhängige Bcl-3 Expression konnte unter SLO-Zusatz beobachtet werden. Dabei wurde die Thrombozytensuspension mit steigenden Mengen an SLO versetzt und für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unter dem Mikroskop waren ab einer Konzentration von 250 HU/ml SLO aufgequollene und aggregierte Plättchen zu erkennen, während die Expression von Bcl-3 ab einem Zusatz von 125 HU/ml SLO detektiert werden konnte. Der Wert der relativen Signalintensität stieg bis zu einer Konzentration von etwa 2000 HU/ml SLO auf $21,86 \pm 2,05$ stetig an und konnte durch eine Erhöhung der Toxinkonzentration nicht mehr signifikant gesteigert werden. Bei Thrombozyten, die mit mehr als 3000 HU/ml SLO versetzt wurden konnte kein Western Blot durchgeführt werden, da die intrazelluläre Proteinmenge, vermutlich durch den Proteinverlust über die Toxinporen, für die Detektion zu gering war. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigten diesen Verdacht, denn trotz hoher Toxinmengen reduzierte sich kaum die Plättchenanzahl (Events), was für die Perforation und gegen eine Lyse der Zellen spricht.

Es ist bekannt, dass SLO, wie alle thiolaktivierten Toxine, reversibel oxidiert bzw. reduziert werden kann. Für die biologische Wirksamkeit von SLO ist die freie Thiolgruppe der Aminosäure Cystein wichtig. Die biologische Aktivität sinkt durch Oxidation der im Protein enthaltenen Thiolgruppen zu Disulfidbrücken bei Exposition mit atmosphärischen Sauerstoff oder anderen Oxidationsmitteln. Durch den Einfluss von Reduktionsmitteln wie DTT oder Cystein werden die Disulfidbrücken im Toxin wieder zu Thiolgruppen reduziert und SLO erreicht innerhalb kürzester Zeit seine maximale biologische Wirksamkeit zurück [254]. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, erfolgten Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Bcl-3 Expression von SLO, welches mit 20 mM Cystein versetzt wurde. Dabei wurde nach Zusatz von etwa 1500 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz ein Maximalwert für die relative Signalintensität der Bcl-3 Expression von $21,56 \pm 4,11$ bestimmt. Die biologische Aktivierung durch Zusatz des Oxidationsmittel Cystein führte bezogen auf den Maximalwert der Bcl-3 Expression also nicht zu höheren Expressionraten. Von den neun getesteten Konzentrationen an SLO mit Oxidationsmittelzusatz konnte lediglich bei einer Konzentration von 750- und 1000 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz ein signifikanter Unterschied zu der nur mit SLO induzierten Bcl-3 Expression bestimmt werden. Die Beobachtung von *Van Epps et al.*, dass Reduktionsmittel wie Cystein die biologische Aktivität des Toxins verstärken, konnte bezogen auf die thrombozytäre Proteinexpression hierbei nicht bekräftigt werden [255].

Eine alleinige Wirkung von Cystein auf die thrombozytäre Bcl-3 Expression konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. In Suspensionsversuchen bei denen die Blutplättchen mit SLO unter Cysteinzusatz versetzt wurden, unterschied sich die Bcl-3 Expression signifikant von der in Thrombozyten, die nur mit Cystein in entsprechender Menge versetzt wurden, deren Bcl-3 Expression auf Kontrollniveau lag.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten ebenso, dass die mit 500- bzw. 750 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz versetzten Thrombozyten im Gegensatz zu den nur mit Cystein in entsprechender Menge inkubierten Plättchen, aggregiert vorlagen.

Um die Mechanismen der thrombozytären Translation zu untersuchen, wurden die Translationsinhibitoren Puromycin und Rapamycin eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 44 dargestellt. Puromycin ähnelt mit seiner purinergen Struktur dem Aminoacyl-t-RNA-Ende. Aufgrund dessen kann das Analogon während des Peptidyltransfers anstatt einer t-RNA an die A-Eingangsstelle am Ribosom binden. Nach dem Peptidyltransfer auf die Aminogruppe von Puromycin fällt das Peptidylpuromycin aus dem Ribosom, da die nötige t-RNA Struktur, welche für die Bindung an das Ribosom wichtig ist, fehlt. Zudem kann ein weiteres Wachsen der Peptidylkette nicht erfolgen, da die Peptidyltransferase die Amidbindung im Puromycin nicht spalten kann [256].

Für die Versuche zur Inhibierung der Translation wurde die Thrombozytensuspension mit 1 mM Puromycin für eine halbe Stunde vorinkubiert. Es wurde eine signifikant verminderte Expression von Bcl-3 im Vergleich zu den nicht mit Puromycin behandelten Proben, die gleich eins gesetzt wurden, festgestellt. Die Reduktion der Expression durch globale Translationsinhibitoren wie Puromycin, bekräftigt die Aussage, dass Bcl-3 ein Translationsprodukt ist. Auffällig war zudem, dass die Reduktion der Bcl-3 Expression umso höher war, je potenter der Bcl-3 induzierende Agonist war. So konnte mit SLO die größte Reduktion der Bcl-3 Expression unter Puromycinzusatz beobachtet werden.

Die Expression von Bcl-3 findet nicht nur Integrin sondern auch mTOR-vermittelt statt [105]. Das für die weiteren Untersuchungen eingesetzte Makrolid-Antibiotikum Rapamycin bildet mit FKBP einen Komplex, der die Serin/Threonin-Kinase mTOR inhibiert. Hierdurch bleibt die mTOR-abhängige Phosphorylierung des 4E-BP1 aus, so dass dieses fest an den eIF-4E gebunden bleibt und die mRNA nicht zur Translation an das Ribosom führen kann. Durch die verhinderte mTOR-vermittelte Phosphorylierung der S6 Kinase unterbleibt ebenso deren Aktivierung des S6-Proteins, welches zur 40S ribosomalen Untereinheit gehört, wodurch es zu einer Verringerung der Translation der sogenannten 5'TOP-mRNA-Familie kommt [257].

Ähnlich wie Puromycin konnte auch der mTOR-Inhibitor Rapamycin (1mM) das Signal der relativen Bcl-3 Expression signifikant um etwa die Hälfte reduzieren, was beweist, dass Bcl-3 unter translationaler Kontrolle von mTOR reguliert wird. Wieder konnte mit SLO-Zusatz die stärkste Reduktion der Bcl-3 Expression beobachtet werden. Auch *Weyrich et al.* konnten eine Reduktion der Bcl-3 Expression von Thrombin aktivierten Plättchen nach einer zweistündigen Vorinkubation mit Puromycin und Rapamycin feststellen [105]. Vorstellbar wäre, dass es nicht zu einer vollständigen Reduktion der Bcl-3 Expression kam, da es sich vermutlich bei Puro- als auch Rapamycin um kompetitive Inhibitoren handelt, welche also mit den endogenen Substanzen um die Bindungsstelle konkurrieren.

Tabelle 42 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression unter Zusatz von Translationsinhibitoren

	Kontrolle	Thrombin (0,1 U/ml)	α-Toxin (0,5 μg/ml)	SLO (750 HU/ml)
Puromycin (1 mM)	0,53 \pm 0,17	0,57 \pm 0,07	0,41 \pm 0,17	0,40 \pm 0,11
Rapamycin (1 mM)	0,56 \pm 0,09	0,51 \pm 0,15	0,50 \pm 0,08	0,36 \pm 0,09

Schließlich wurde der Effekt der Thrombozyteninhibitoren Abciximab, NPN und Iloprost, die auch bei den Aggregationsmessungen erfolgreich eingesetzt wurden, untersucht. Tabelle 45 fasst die gewonnenen Ergebnisse zusammen. Es konnte eine signifikante Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Plättchen beobachtet werden. Die eingesetzten Medikamente greifen in drei unterschiedliche Mechanismen der Plättcheninhibierung ein, Abciximab verhindert die Integrin-vermittelte Aggregation und Adhäsion, NPN wirkt inhibierend durch die Freisetzung von NO und die darauffolgende Erhöhung des cGMP-spiegels und Iloprost führt durch eine Erhöhung des thrombozytären cAMP-Spiegels zur Plättchenhemmung. Da nur aktivierte Thrombozyten in der Lage sind Proteine zu synthetisieren, konnten die Plättcheninhibitoren die Bcl-3 Expression deutlich reduzieren. Während mit Abciximab und Iloprost die Expression von Bcl-3 etwa gleich stark reduziert werden konnte, wurde mit Iloprost eine noch stärkere Expressionshemmung erzielt. Schaut man sich

die Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie in Tabelle 40 an, so fällt auf, dass zwar Iloprost die α -Toxin induzierte Plättchenaggregation nicht vollständig unterbinden konnte, jedoch wie auch bei diesen Experimenten in einem wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereich wirksam ist als Abciximab und NPN. Die nicht vollständige Reduktion der Bcl-3 Expression kam vermutlich durch einen kompetitiven Wirkmechanismus der Medikamente zustande. Der Einsatz solcher Inhibitoren bei Krankheiten wie der Sepsis und Endkarditis könnte also nicht nur die Plättchenaggregation reduzieren, sondern auch mögliche durch das Bcl-3 Protein verursachte pathologische Effekte reduzieren.

Tabelle 43 Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression durch Thrombozyteninhibitoren

SLO (750 HU/ml)	+ Abciximab (5 μ g/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 μ g/ml)
	0,44 \pm 0,11	0,37 \pm 0,15	0,44 \pm 0,12

4.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Am Durchflusszytometer wurde die toxinvermittelte Aktivierung von Thrombozyten und PMN untersucht. Im Gegensatz zu den Western Blot Analysen, bei denen die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor zur Proteinexpression benötigt wird (siehe Kap. 1.4.6), erfolgte kein Zusatz von Fibrinogen, weil die Blutplättchen für den Messvorgang suspendiert vorliegen mussten. Da ein kleiner Anteil der Rezeptoren auf Thrombozyten und PMN physiologischerweise aktiviert vorliegt [258] und die Zellen zum Teil während der Isolationsprozedur aus dem menschlichen Blut aktiviert werden, wurde nach fünf Minuten Inkubationszeit, wie bei *Fromm et al.*, eine Aktivierung von 5% angenommen [259]. Um die Qualität der Thrombozyten- bzw. PMN-Präparationen einzuschätzen, erfolgte zunächst die Messung der Positivproben. Thrombozyten wurden hierzu mit 0,1 U/ml Thrombin und Neutrophile mit 0,5 μ g/ml PMA aktiviert. Nur wenn mindestens 80% positive Events eines Aktivierungsparameters der stimulierten Thrombozyten bzw. PMN gemessen wurde, erfolgte die Vermessung der restlichen Proben.

Die Untersuchungen zur Thrombozytenaggregation haben gezeigt, dass mit α -Toxin stimulierte Plättchen aggregierten. Dabei werden die Plättchen über aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren, an denen Fibrinogen bindet, miteinander vernetzt. Die Detektion des aktivierten Fibrinogenrezeptors erfolgte mit dem fluoreszenzmarkierten PAC-1 Antikörper. Dieser bindet an ein Epitop des GPIIb/IIIa-Rezeptors, welches nur freigelegt wird, wenn dieser in seine aktive Konformation übergeht. Dabei werden hochaffine Bindungsstellen für Fibrinogen freigelegt, an die auch der Antikörper binden kann [260].

Am Durchflusszytometer konnte eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Fibrinogenrezeptors durch α -Toxin stimulierte Thrombozyten nachgewiesen werden. Tabelle 46 zeigt hierzu die Mittelwerte der PAC-1 positiven Events, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an α -Toxin gemessen wurden.

Tabelle 44 Mittelwerte der PAC-1 positiven Events von Thrombozyten stimuliert mit verschiedenen Konzentrationen an α -Toxin

α -Toxin	5 min	0,5 hr	1 hr	2 hr	4 hr
0,01 μg/ml	8,50	22,06	14,43	2,28	2,32
0,025 μg/ml	20,09	29,79	16,92	10,02	8,5
0,5 μg/ml A)	43,75	30,69	20,69	6,70	3,99
B)	25,09	39,58	14,02	6,9	7,40
0,1 μg/ml	49,46	31,04	14,97	7,01	5,72
0,25 μg/ml	26,65	1,61	1,54	2,32	1,65
0,5 μg/ml	14,69	0,99	1,85	2,29	1,66
2,5 μg/ml	4,76	4,24	3,91	3,01	3,28

In dem Untersuchungszeitraum von vier Stunden blieben die Kontrollproben nahezu konstant im Bereich von 5% PAC-1 positiven Events, sodass eine spontane Aktivierung der Thrombozyten im zeitlichen Verlauf ausgeschlossen werden konnte und die gemessenen positiven Events der Wirkung der zugesetzten Substanzen zuzuschreiben waren. Bei einem Zusatz von 0,01 µg/ml α-Toxin wurde nach einer halben Stunde das Maximum der positiven Events erreicht. Danach fiel der Wert ab, bis er nach etwa zwei Stunden auf Kontrollniveau lag. Ein ähnlicher Graphenverlauf mit höheren Aktivierungswerten wurde mit einer Konzentration von 0,025 µg/ml α-Toxin erhalten. Vermutlich aktivieren die innerhalb von fünf Minuten durch das Toxin stimulierten Plättchen durch Degranulation weitere Thrombozyten, sodass die Anzahl der PAC-1 positiven Events nach einer halben Stunde weiter anstieg. Danach folgte ein Abfall der GPIIb/IIIa-Aktivierung, der nicht auf toxischen Effekten von α-Toxin beruhen kann, da die Ergebnisse der 24 stündigen Inkubation mit dem Toxin zeigten, dass die Aktivierung des Fibrinogen-Rezeptors nach 8 Stunden wieder anstieg. Bei den mit 0,05 µg/ml α-Toxin stimulierten Plättchen schwankten die Messwerte stark. Es zeigte sich, dass diese Konzentration an α-Toxin eine Art Schwellenwert für die Plättchenaktivierung war. Etwa die Hälfte (siehe B) in Tabelle 46) der gemessenen Werte zeigte das Maximum der positiven Ereignisse nach der ersten halben Stunde, während bei der anderen Hälfte der Messwerte (siehe A) Tabelle 47) schon nach fünf Minuten der höchste Wert an PAC-1 positiven Events erreicht wurde. Ab einer Toxin-Konzentration von 0,1 µg/ml kam es zu einer eindeutigen Verschiebung des Maximums des Aktivierungsparameters von einer halben Stunde auf fünf Minuten Inkubationszeit. Dabei wurden die Thrombozyten vermutlich, durch die in ausreichender Anzahl gebildeten Toxinporen sofort und nicht über eine verspätete Degranulation, wie unterhalb dieser Toxinkonzentration beobachtet, aktiviert. Mit dieser Konzentration konnte auch das größte Maximum der PAC-1 positiven Events nach fünf Minuten Inkubationszeit gemessen werden. Bei einem Zusatz an höheren Toxinkonzentrationen sank der Maximalwert an PAC-1 positiven Events nach fünf Minuten Inkubationszeit zunehmend, bis schließlich ab 2,5 µg/ml α-Toxin-Zusatz kein Unterschied mehr im Vergleich zur Kontrolle sichtbar war. Wahrscheinlich überwiegen hierbei ab 2,5 µg/ml α-Toxin-Zusatz die toxischen Effekte aufgrund der vermehrten Bildung von zellperforierenden Poren, sodass je höher die zugesetzte α-Toxin Konzentration war, umso mehr Plättchen abgetötet wurden. Dementsprechend konnten immer weniger Thrombozyten aktiviert und die PAC-1 positiven Events gemessen werden. Anders als bei den aggregometrischen Untersuchungen, wo die EC₅₀ von α-Toxin 3,04 µg/ml betrug wurden am Durchflusszytometer schon mit 0,1 µg/ml α-Toxin die meisten Thrombozyten aktiviert. Ursache ist wohl die Tatsache, dass gewaschene Thrombozyten sensitiver auf das Toxin reagieren als die im PRP befindlichen Thrombozyten, wo sich z.B. neutralisierende Antikörper befinden, welche die Wirkung des Toxins mindern [232].

Bei den mit SLO inkubierten Thrombozyten konnte innerhalb von drei Minuten keine Aggregation festgestellt werden. Anhand der Western Blot Analysen wurde jedoch die Expression des Bcl-3 Proteins von SLO stimulierten Plättchen nachgewiesen. Da die Proteinexpression nur nach Thrombozytenaktivierung und über Integrin αIIbβ₃-vermittelt stattfindet [108], kam es zu der Annahme, dass SLO daher den Fibrinogenrezeptor aktivieren muss. Diese Annahme konnte durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen bestätigt werden. Tabelle 47 zeigt die Mittelwerte der PAC-1 positiven Events, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an SLO gemessen wurden.

Tabelle 45 Mittelwerte der PAC-1 positiven Events von Thrombozyten stimuliert mit verschiedenen Konzentrationen an SLO

SLO	5 min	0,5 hr	1 hr	2 hr	4 hr
50 HU/ml	5,26	7,68	7,51	6,75	4,15
250 HU/ml	11,32	10,26	1,90	2,78	8,45
500 HU/ml	30,46	1,97	2,57	2,17	16,97
750 HU/ml	18,54	1,45	2,01	2,69	14,12
1000 HU/ml	11,42	1,00	1,32	3,70	24,75
3000 HU/ml	1,33	1,51	2,24	3,67	27,04

Mit 50 HU/ml SLO inkubierte Thrombozyten zeigten nach einer halben Stunde eine maximale Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors. Höhere Toxinkonzentrationen führten vermutlich wie mit α -Toxin zu einer Verschiebung des Aktivitätsmaximums auf fünf Minuten Inkubationszeit. Bei mit 500 HU/ml SLO stimulierten Blutplättchen wurde nach fünf Minuten die höchste Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors bestimmt. Innerhalb von einer halben Stunde fiel die Fibrinogenrezeptoraktivität auf Kontrollniveau ab, bis sie nach zwei Stunden interessanterweise wieder anstieg und nach vier Stunden ihren Maximalwert erreicht hatte. Bei den nachfolgenden Messungen fiel auf, dass umso höher die eingesetzte SLO Konzentrationen war, der Wert der PAC-1 positiven Events nach fünfminütiger Inkubationszeit sank, während der Wert nach vierstündiger Inkubation weiter anstieg. So konnte unter Zusatz von 3000 HU/ml SLO nach fünf Minuten Inkubationszeit keine Aktivität des Fibrinogenrezeptors im Vergleich zur Kontrollprobe festgestellt werden, während nach vier Stunden die von den getesteten Konzentrationen höchste Aktivierung gemessen wurde. Zur Aggregation SLO stimulierter Thrombozyten kam es vermutlich nicht, weil nur maximal $30,46 \pm 6,08\%$ PAC-1 positive Events nach fünf Minuten gemessen wurden und diese Anzahl an aktivierten Rezeptoren für eine Aggregation unter Scherstress womöglich nicht ausreicht. Ebenso fällt auf, dass wie mit α -Toxin, ein Maximalwert der Fibrinogenrezeptoraktivierung erreicht wird, der mit steigender Toxinkonzentration fällt. Da die Anzahl aktivierter Fibrinogenrezeptoren zunächst abfällt und im Laufe der Zeit wieder ansteigt, spricht dies gegen toxische Effekte des Toxins auf die Zellen. Zudem haben die Western Blot Analysen gezeigt, dass auch noch nach 24 Stunden eine Bcl-3 Expression von SLO stimulierten Plättchen stattfand, die Zellen also über diesen langen Zeitraum vital sein mussten. Möglicherweise kommt es zu dieser späten GPIIb/IIIa-Rezeptoraktivierung durch verzögerte sekundäre Effekte des Toxins, etwa durch die Induktion der Proteinexpression.

Weiterhin erfolgte auch eine Testung von mit Reduktionsmitteln aktiviertem SLO. Das Reduktionsmittel DDT, welches laut Sigma Aldrich Datenblatt von SLO zur Aktivierung des Toxins in 10 mM Konzentration zugesetzt werden kann, wurde ohne Toxin-Zusatz am Durchflusszytometer gemessen und führte zu einer deutlichen PAC-1 Bindung. Bei Thrombozyten, die nur mit dem Reduktionsmittel Cystein inkubiert wurden, konnten keine PAC-1 positiven Events gemessen werden, sodass fortan Cystein als biologischer Aktivator zugesetzt wurde.

Mit 20 mM Cystein aktiviertes SLO war ebenfalls in der Lage den Fibrinogenrezeptor von Plättchen zu aktivieren. Dabei fiel auf, dass mit Cystein aktiviertes SLO, anders als bei den Western Blot Analysen ermittelt, in einem wesentlich niedrigeren Konzentrationsbereich als nicht aktiviertes SLO den Fibrinogenrezeptor aktivierte. So konnten mit 75 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz $30,87 \pm 2,26\%$ PAC-1 positive Ereignisse nach fünf Minuten Inkubationszeit vermessen werden, während mit nicht aktiviertem SLO in zehnfach höherer Dosierung nur $18,54 \pm 2,61\%$ PAC-1 positive Events gemessen wurden. Zudem unterschied sich der Graphenverlauf. Mit Ausnahme von mit 25 HU/ml aktiviertem SLO behandelten Plättchen, wobei das Maximum der PAC-1 positiven Events erst nach einer halben Stunde gemessen wurde, trat der Maximalwert der Fibrinogenrezeptoraktivierung sonst nach fünfminütiger Inkubationszeit auf und fiel dann innerhalb von vier Stunden auf Kontrollniveau ab. Nach Zugabe von 300 HU/ml SLO mit Cysteinzusatz konnten die PAC-1 positiven Ereignisse nicht weiter erhöht werden. Anders als bei den Western Blot Analysen scheint der Zusatz von Cystein die biologische Aktivität des Toxins um etwa das Zehn- bis Fünffache, bezogen auf die maximale Aktivierung des Fibrinogenrezeptors, zu erhöhen. Die maximale Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors unterschied sich mit $30,46 \pm 6,08\%$ unter Stimulation mit 500 HU/ml SLO kaum von der gemessenen Aktivierung von $36,80 \pm 11,92\%$ unter Stimulation der Thrombozyten mit 100 HU/ml mit Cystein aktiviertem SLO. Auffällig war außerdem, dass es nicht wie bei SLO ohne Reduktionsmittelzusatz, zu einem wiederholten Anstieg der GPIIb/IIIa-Rezeptoraktivierung innerhalb der vier Stunden Inkubationszeit kam.

Da bei den Untersuchungen zur GPIIb/IIIa-Aktivierung die Anzahl der PAC-1 positiven Events bei den SLO stimulierten Thrombozyten nach vier Stunden wieder zunahm, schien es interessant den weiteren zeitlichen Verlauf der Aktivierung zu untersuchen. Zudem handelt es sich bei der Sepsis um einen langwierigen Prozess, bei dem die Patienten bis zu mehreren Tagen den Bakterien und deren Toxinen ausgesetzt sein können [261]. Neben den Untersuchungen zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors über einen Zeitraum von 24 Stunden, wurde auch die Degranulation sowie die Bildung von PMP und Aggregaten unter Toxineinfluss bestimmt.

Die thrombozytäre Degranulation, die mit einem Antikörper gegen CD 62P detektiert wurde, ist ein eindeutiges Zeichen für eine Thrombozytenaktivierung [262], wie sie bei der Sepsis und Endokarditis auftritt. Freigesetzte Granulasubstanzen führen sowohl zur para-, als auch autokrin vermittelten Aktivierung weiterer Plättchen. Das Adhäsionsmolekül CD62P befindet sich bei ruhenden Thrombozyten in der α -Granulamembran und wird im Zuge der Degranulation durch Koaleszenz mit der Plättchenmembran vermehrt auf der Thrombozytenoberfläche präsentiert [262] und kann dementsprechend vermehrt detektiert werden. Bei den PMP handelt es sich um Fragmente der thrombozytären Plasmamembran, die von aktivierten Thrombozyten abgegeben werden [263]. Es konnte bewiesen werden, dass die Anzahl, der unter physiologischerweise in geringen Maße im Blut nachweisbaren PMP, während einer Sepsis deutlich ansteigt. Weiterhin wird angenommen, dass PMP durch ihre proinflammatorischen sowie prokoagulatorischen Eigenschaften eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und dem Fortschreiten dieser Erkrankung besitzen [264]. Die Blutvergiftung ist zudem durch eine überstimulierte Koagulation, die wesentlich am Ausgang der Sepsis beteiligt ist, gekennzeichnet [265]. Die Aggregation von Thrombozyten, als Teil der Koagulation, wurde am Durchflusssyptometer untersucht. Obwohl die Aggregatbildung durch den fehlenden Fibrinogenzusatz verringert ist, kam es durch die degranulationsbedingte Freisetzung von Fibrinogen während der Plättchenaktivierung dennoch zu einer Bildung von Aggregaten.

Bei den Messungen der Kontrollproben kam es innerhalb von 24 Stunden nur zu einer leichten Aktivierung der unstimulierten Proben mit maximal 10 % positiven Events, sodass der gewählte Inkubationszeitraum als geeignet angesehen wurde. Die mit dem endogenen Aktivator Thrombin (0,1 U/ml) stimulierten Plättchen zeigten nach fünf Minuten das Maximum der PAC-1 positiven Events mit $87,25 \pm 5,53\%$. *Furman et al.* konnten ebenfalls eine hohe Aktivierung von $93,8 \pm 1,2$ mit 0,28 U/ml Thrombin feststellen [214], sodass die Versuchsbedingungen durch die Messung der Positivprobe als geeignet angesehen wurden. Innerhalb von acht Stunden fiel die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors schnell auf Kontrollwerte ab. Vermutlich geht der Rezeptor physiologischerweise nach einiger Zeit von dem aktivierten Zustand in den inaktivierten Zustand zurück. Die Messung der CD62P positiven Events ergab nach fünf Minuten $49,86 \pm 5,76 \%$ und stieg innerhalb einer halben Stunde mit $55,12 \pm 4,35\%$ nur leicht an. Nach 24 Stunden war die Anzahl CD62P positiver Events unterhalb des Wertes der Kontrollprobe gesunken. Diese Ergebnisse passen zu der Aussage von *Berndt et al.*, dass Thrombin-aktivierte Plättchen innerhalb weniger Sekunden den Adhäsionsrezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren [266]. Dort wird der P-Selektin Rezeptor an der thrombozytären Oberfläche für mindestens eine Stunde präsentiert, bevor dieser im Laufe der Zeit abgespalten wird, wodurch die messbaren CD62P positiven Events sinken [267]. Der Graph der PMP-Bildung von Thrombin stimulierten Plättchen ähnelte einer Gauß'schen Kurve mit einem Maximum von $34,05 \pm 6,54\%$ nach acht Stunden. Die Aggregatbildung von Thrombin stimulierten Plättchen stieg auf ein Maximum von $18,87 \pm 2,87\%$ innerhalb einer Stunde an und fiel nach 24 Stunden ebenfalls unterhalb des Kontrollniveaus. Bei mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ LPS stimulierten Plättchen lagen die Werte für die PAC-1- und CD62P positiven Events sowie für die PMP- und Aggregatbildung im Bereich der Kontrollprobe. Dies lässt darauf schließen, dass LPS trotz seiner Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Sepsis die Plättchen nicht direkt aktiviert, sondern über andere Zellen, wie Endothelzellen oder PMN beeinflusst.

Bei den mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin stimulierten Plättchen konnte interessanterweise, nachdem die PAC-1 positiven Events nach fünfminütiger Inkubationszeit von $49,46 \pm 4,13\%$ innerhalb von vier Stunden auf Kontrollniveau abfielen, eine weitere Steigerung der Fibrinogenrezeptoraktivität im zeitlichen Verlauf auf $47,08 \pm 5,72 \%$ nach 24 Stunden festgestellt werden. Es scheint so, als ob in etwa die Hälfte der Thrombozyten schon nach kurzer Zeit von dem Toxin aktiviert wurde, während die andere Hälfte der Plättchen durch spätere Effekte des Toxin nach vier Stunden allmählich aktiviert wurde. Die ermittelten CD62P positiven Events ähnelten dem Kurvenverlauf der PAC-1 Bindung. Nach einer halben Stunde wurden $12,67 \pm 3,59 \%$ ermittelt. Danach fielen die P-Selektin positiven Events ab und stiegen auf $30,24 \pm 5,18\%$ nach 24 Stunden an. Somit passt der zeitliche Verlauf der gemessenen CD62P positiven Events zu den gemessenen PAC-1 positiven Ereignissen. Als Erklärung wäre denkbar, dass die Thrombozyten durch α -Toxin aktiviert wurden und es jedoch nicht sofort, wie bei den mit Thrombin stimulierten Plättchen, sondern toxinbedingt zeitlich versetzt zur Degranulation kam, wodurch die P-Selektin positiven Events erst nach einer halben Stunde anstiegen. Danach sank die Aktivierung des

Fibrinogenrezeptors, die Thrombozyten wurden also nicht mehr aktiviert und es kam innerhalb von zwei Stunden zur physiologischen Abspaltung des P-Selektin-Rezeptors von der Oberfläche der Thrombozyten. Nach etwa vier Stunden kam es zu einer wiederholten Thrombozytenaktivierung, die mit einer weiteren Degranulation einherging, wodurch die CD62P positiven Events wieder anstiegen. Da schon einmal degranulierte Plättchen nicht mehr in der Lage sind neue Granula zu bilden und diese freizusetzen, kam es dementsprechend zur Degranulation von Plättchen, die erst während der späteren Aktivierungsphase aktiviert wurden. Bei den PMP wurde nach einer Stunde ein Maximum von $30,61 \pm 4,23\%$ bestimmt. Es folgte ein Abfall nach vier Stunden und wieder ein Anstieg auf $29,32 \pm 3,26\%$ nach 12 Stunden Inkubationszeit, bevor nach 24 Stunden der Wert der positiven Ereignisse an PMP auf $12,70 \pm 2,94\%$ abfiel. Die Aggregatbildung von α -Toxin behandelten Plättchen stieg innerhalb von 16 Stunden auf $17,55 \pm 3,25\%$ an, bevor diese wieder auf $13,52 \pm 3,07\%$ nach 24 Stunden abfiel. Bei den mit α -Toxin stimulierten Plättchen ergaben sich somit ganz andere zeitliche Verläufe der Aktivierungsparameter als mit dem endogenen Agonisten Thrombin. Ähnlich wie bei SLO stimulierten Plättchen, die nach zwei Stunden eine Aktivitätszunahme des GPIIb/IIIa-Rezeptors zeigten, stieg bei den mit α -Toxin behandelten Plättchen nach vier Stunden Inkubationszeit ebenfalls die Anzahl der PAC-1 positiven Events wieder an. Möglich wäre diese verspätete Aktivierung durch im Laufe der Zeit exprimierte Proteine, welche als Plättchenagonisten wirken. Es kann auch sein, dass es durch den lang andauernden Toxineinfluss zur Lyse einiger Plättchen kam, welche dadurch plättchenaktivierende Substanzen freisetzen. Obwohl am Durchflusszytometer keine gravierende Abnahme der Anzahl an Zellen, also der gemessenen Events pro Zeiteinheit, festgestellt wurde, reichen sicherlich relativ wenig lysierte Zellen aus, um weitere Thrombozyten durch freigesetzte Mediatoren wie ADP oder Serotonin, zu aktivieren.

Bei den mit 500 HU/ml SLO inkubierten Thrombozyten fiel auf, dass sich die Verläufe der Graphen aller Aktivierungsparametern mit den unter α -Toxinzusatz erhaltenen Graphen ähneln, welches vermutlich an dem gleichen, über Toxinporen vermittelten, Aktivierungsmechanismus beider Toxine liegt. Bei den mit SLO stimulierten Plättchen fiel der nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten ermittelte Wert von $30,46 \pm 6,08\%$ für die PAC-1 positiven Events nach einer halben Stunde auf Kontrollniveau ab und stieg nach zwei Stunden, also zwei Stunden früher als unter α -Toxin-Stimulation, über einen Zeitraum von 24 Stunden auf $61,93 \pm 8,17\%$ an. Auch hier fiel auf, dass letztendlich ein Teil der Plättchen in relativ kurzer Zeit aktiviert wird, während der restliche Teil deutlich verspätet eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors erfährt. Die gemessenen CD62P positiven Ereignisse zeigten nicht wie bei α -Toxin zwei Maxima, sondern stiegen innerhalb von 24 Stunden allmählich auf $42,36 \pm 3,80\%$ an. Ursache ist vielleicht, die innerhalb der ersten Stunde im Vergleich zu α -Toxin geringere Aktivierung der Plättchen, also die niedrigere Anzahl an ermittelten PAC-1 positiven Events, die womöglich nicht hoch genug war, um eine deutliche Degranulation auszulösen. Nach zwei Stunden stieg die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors stärker an und dementsprechend konnte wieder eine Degranulation gemessen werden. Der Verlauf des Graphen von detektierten PMP und Aggregaten ähnelte dem unter α -Toxin Stimulation. Generell kann man sagen, dass sich die Werte der Thrombin, SLO und α -Toxin induzierten PMP und Aggregatbildung gleichen, die Toxine bzw. der endogene Agonist Thrombin also gleich potent sind eine PMP- sowie Aggregatbildung zu induzieren. Bei den PAC-1 und CD62P positiven Events ist α -Toxin zu Beginn der Inkubationszeit potenter und aktiviert mehr Plättchen, während im weiteren Verlauf der Inkubationszeit SLO die Thrombozyten sowohl schneller als auch stärker aktivierte. Des Weiteren führte Thrombin zu einer etwa doppelt so hohen Anzahl an detektierten CD62P positiven Events als SLO und α -Toxin. Die SLO stimulierte Bcl-3 Expression zeigte einen Gauß'schen Kurvenverlauf mit einem Maximum nach vier Stunden, verlief also in etwa genau umgekehrt zu den detektierten PAC-1 positiven Events.

Weiterhin wurde die inhibitorische Wirkung der Medikamente Abciximab, Iloprost und NPN auf die mit Thrombin- bzw. den Toxinen stimulierten Plättchen getestet. Dabei wurden die Thrombozyten während der 24 Stunden Inkubationsversuche mit den jeweiligen Inhibitoren versetzt und nach verschiedenen Zeiträumen auf die thrombozytären Aktivierungsparameter untersucht. Die durch Stimulation der Plättchen mit den Toxinen bzw. Thrombin erhaltenen Ergebnisse wurden in den hier abgebildeten Tabellen gleich eins gesetzt und die Werte mit Inhibitorzusatz darauf bezogen. In Klammern unterhalb der Aktivierungsparameter wurde die Inkubationszeit, bei der die Proben entnommen

wurden und der Aktivierungsparameter die maximale Aktivierung zeigte, angegeben. Tabelle 48 zeigt die relativen Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Plättchen.

Tabelle 46 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungs- marker		Thrombin (0,1 U/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1	(5 min)	1	0,06	0,07	0,08
CD62P	(5 min)	1	0,59	0,09	0,18
PMP	(2 hr)	1	0,48	0,21	0,32
Aggregate	(1 hr)	1	0,33	0,35	0,32

Im Vergleich zu der nur mit Thrombin versetzten Probe wurden alle Aktivierungsparameter durch die zugesetzten Medikamente signifikant gesenkt. Bis auf die durch Abciximab nicht so stark inhibierten CD62P positiven Events und die PMP-Bildung, hemmten alle eingesetzten Medikamente die mit 0,1 U/ml Thrombin induzierten Aktivierungsparameter vergleichbar stark

Auch bei den mit 0,1 µg/ml α-Toxin inkubierten Plättchen wurden alle Aktivierungsmarker signifikant im Vergleich zu nur der mit α-Toxin inkubierten Probe gesenkt (siehe Tabelle 49). Wieder konnten mit Abciximab die gemessenen CD62P positiven Events nicht so stark wie mit Iloprost und NPN gehemmt werden. Die restlichen ermittelten Aktivierungsparameter wurden etwa gleich stark durch den Medikamentenzusatz gesenkt. Im Vergleich zu den mit Thrombin behandelten Proben, wurden die durch α-Toxin Stimulation erhaltenen PAC-1 positiven Ereignisse durch den Zusatz der Medikamente weiter verringert. Die ermittelten CD62P positiven Events reduzierten sich unter Abciximabzusatz etwas. Die Werte der CD62P positiven Events mit Iloprost und NPN waren dagegen wesentlich höher als die ermittelten Werte der mit Thrombin behandelten Proben. Die Bildung von PMP konnte mit Abciximab ähnlich stark wie bei den mit Thrombin stimulierten Proben reduziert werden. Iloprost und NPN konnten die PMP-Bildung nahezu gleich stark hemmen, inhibierten dennoch nicht so stark, wie bei den Proben mit Thrombinzusatz ermittelt wurde. Des Weiteren konnte die Aggregatbildung mit den Medikamenten besser gehemmt werden als unter Thrombinstimulation.

Tabelle 47 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α-Toxin stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungs- marker		α-Toxin (0,1 µg/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1	(5 min)	1	0,02	0,04	0,04
CD62P	(0,5 hr)	1	0,40	0,23	0,27
PMP	(1 hr)	1	0,58	0,52	0,51
Aggregate	(12 hr)	1	0,15	0,26	0,16

Schließlich wurde die inhibitorische Wirkung der Medikamente auf die mit 500 HU/ml SLO stimulierte Thrombozyten untersucht (siehe Tabelle 50). Wieder unterschieden sich alle gemessenen Werte signifikant im Vergleich zu der nur mit SLO behandelten Probe. Es fiel auf, dass sich die Werte der Inhibition der bakteriell stimulierten Toxine ähnlicher waren als die mit Thrombin gemessenen Werte. Abciximab führte zwar ebenfalls nicht zu einer so starken Reduktion der CD62P positiven Events wie Iloprost und NPN, erreichte hierbei jedoch die stärkste Reduktion von den getesteten Toxinen bzw. dem endogenen Agonisten Thrombin.

Nachdem Puromycin bei der Thrombozytenaggregation einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchen zeigte, wurde dessen Wirkung auf die Aktivierungsparameter am Durchflusszytometer untersucht. Das Peptid RGDS wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Integrine wie der GPIIb/IIIa-Rezeptor erkennen Liganden mit der RGD-Aminosäuresequenz, etwa den vWF, Fibronectin oder Fibrinogen. Das synthetische Peptid RGDS fungiert als kompetitiver Inhibitor gegenüber den physiologischen Liganden des Fibrinogenrezeptors. Somit wird die Bindung von Fibrinogen sowie von PAC-1 durch das Tetrapeptid RGDS gehemmt und es ergeben sich niedrige PAC-1 Werte [268].

Tabelle 48 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Abciximab, Iloprost und NPN

Aktivierungsmarker	SLO (500 HU/ml)	+ Abciximab (5 µg/ml)	+ Iloprost (50 ng/ml)	+ NPN (25 µg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,05	0,05	0,11
CD62P (8 hr)	1	0,20	0,12	0,23
PMP (1 hr)	1	0,43	0,46	0,40
Aggregate (4 hr)	1	0,12	0,17	0,13

Alle durch Puromycin- bzw. RGDS-Zusatz ermittelten Werte waren im Vergleich zu der nur mit dem Toxin bzw. Thrombin behandelten Proben signifikant erniedrigt. Anhand der Ergebnisse von mit 0,1 U/ml Thrombin behandelten (siehe Tabelle 51) und mit 1mM Puromycin inhibierten bzw. mit 1 mg/ml RGDS blockierten Fibrinogenrezeptoren fiel auf, dass Puromycin die Thrombin stimulierten Plättchen nicht so stark wie die eingesetzten Medikamenten inhibierte. RGDS hingegen blockierte nahezu vollständig die aktivierten Fibrinogenrezeptoren und bestätigte sich als Negativkontrolle.

Tabelle 49 Relative Ergebnisse der Inhibierung von Thrombin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungsmarker	Thrombin (0,1 U/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,34	0,01
CD62P (5 min)	1	0,62	/
PMP (2 hr)	1	0,42	/
Aggregate (1 hr)	1	0,62	/

Bei den mit α -Toxin stimulierten Plättchen (siehe Tabelle 52) konnten sowohl Puromycin als auch RGDS die PAC-1 positiven Events effektiv reduzieren. Auch die CD62P positiven Ereignisse wurden stärker reduziert als bei den mit Thrombin aktivierten Plättchen. Während die PMP-Bildung den gleichen Wert wie bei den mit Thrombin stimulierten Plättchen ergab, konnte die Aggregatbildung unter Puromycinzusatz effektiver gehemmt werden.

Tabelle 50 Relative Ergebnisse der Inhibierung von α -Toxin stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungsmarker	α-Toxin (0,1 µg/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,06	0,01
CD62P (0,5 hr)	1	0,24	/
PMP (1 hr)	1	0,42	/
Aggregate (12 hr)	1	0,14	/

Anhand der ermittelten Werte aus Tabelle 53 erkennt man, dass sich bei den Toxinen, mit Ausnahme der Aggregatbildung, die unter SLO Stimulation nicht so stark wie unter α -Toxinzusatz mittels Puromycin gehemmt werden konnte, wieder ähnliche Werte für die Inhibition mit Puromycin und RGDS ergaben.

Tabelle 51 Relative Ergebnisse der Inhibierung von SLO stimulierten Thrombozyten mit Puromycin und RGDS

Aktivierungsmarker	SLO (500 HU/ml)	+ Puromycin (1 mM)	+ RGDS (0,1 mg/ml)
PAC-1 (5 min)	1	0,07	0,01
CD62P (8 hr)	1	0,20	/
PMP (1hr)	1	0,41	/
Aggregate (4 hr)	1	0,40	/

Mit Aktivierungsmarkern, wie der CD11b Expression sowie der Bildung von PMN-Aggregaten wurde der Einfluss der bakteriellen Toxine SLO, LPS und α -Toxin auf die PMN am Durchflusszytometer untersucht. Das Integrin CD11b ist Teil des CD11b/CD18 Heterodimers (MAC-1). Es wird als Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche von PMN und in der Zellmembran der Granula exprimiert. Nach Aktivierung der PMN wird das Integrin innerhalb weniger Minuten durch Fusion der Granulamembran mit der Zellmembran vermehrt auf der Granulozytenoberfläche exprimiert [269]. Des Weiteren ist die Bildung von PMN-Aggregaten ein wesentliches Merkmal der Aktivierung von PMN. Die mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PMA als Positivkontrolle inkubierten PMN zeigten nach fünf Minuten Inkubationszeit eine hohe Aktivierung, sodass die Qualität der PMN-Präparation sowie die Bedingungen bei der Versuchsdurchführung bestätigt wurden.

Bei den mit α -Toxin versetzten PMN verschob sich das Maximum der gemessenen CD11b positiven Events wie schon oft beobachtet ab einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin von fünf Minuten auf eine halbe Stunde Inkubationszeit. Innerhalb von vier Stunden fiel der Maximalwert dann wieder auf Kontrollniveau ab. Bei mit 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin stimulierten Granulozyten wurden die meisten PMN mit $22,81 \pm 4,66\%$ CD11b positiven Ereignissen nach fünf Minuten aktiviert. Eine weitere Erhöhung der α -Toxin Konzentration erzielte nur unwesentlich höhere Aktivierungswerte. Auch die Aggregatbildung konnte mit α -Toxin stimulierten PMN angeregt werden. Mit steigender Konzentration an α -Toxin konnte der Maximalwert der Aggregatbildung von $12,86 \pm 1,98\%$ mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin leicht auf $14,83 \pm 1,09\%$ mit 1 $\mu\text{g/ml}$ α -Toxin nach einer Stunde Inkubationszeit erhöht werden.

Wie bei *Lynn et al.* konnte ebenso am Durchflusszytometer eine vermehrte CD11b Expression von LPS simulierten PMN beobachtet werden [270]. Das Endotoxin LPS wird von dem im Blut zirkulierenden LBP gebunden, welches dessen Bindung an den membranständigen CD14-Rezeptor ermöglicht. Dieser befindet sich beispielsweise auf Makrophagen, dendritischen Zelle und PMN. Die Bindung von LPS an CD14 führt zur Dissoziation von LPB, wodurch LPS an den MD2-TLR-4 Komplex binden kann. Nach der LPS-Bindung an diesen Komplex wird ein Signal in die Zelle geleitet, welches über verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B zur Genexpression inflammatorischer Mediatoren führt. Daneben bindet LPS auch an das Integrin CD11/CD18 auf Leukozyten und führt hierüber zur Expression inflammatorischer Mediatoren [271,272], welche wesentlich zu der generalisierten Entzündung im Geschehen einer Sepsis beitragen können. Die durch eine vermehrte Adhärenz von aktivierten PMN an das Endothel resultierende lokale Gewebeschädigung sowie Störung der Mikrozirkulation, bildet die Grundlage eines Endotoxinschocks [273].

Bei den mit LPS von *E. coli* und LPS von *S. ent.* stimulierten PMN kam es erwartungsgemäß zu ähnlichen Graphenverläufen. Innerhalb von einer Stunde stiegen die CD11b positiven Events auf ein Maximum von $49,7 \pm 7,34\%$ für *E. coli* bzw. auf $50,47 \pm 5,39\%$ für mit LPS von *S. ent.* behandelte PMN, welches mit der Ausnahme des Maximums nach einer halben Stunde den Beobachtungen von *Lynn et al.* entsprach [270]. Die PMN zeigten ebenso nach einer Stunde unter Zusatz von LPS von *E. coli* mit $23,36 \pm 1,67\%$ bzw. LPS von *S. ent.* mit $23,06 \pm 3,39\%$ positive Ereignisse an Aggregaten.

Das Toxin SLO ist auch ein potenter Aktivator von PMN, wie auch *Nilson et al.* sowie *Bryant et al.* in ihren Untersuchungen feststellen konnten [274,275]. In dieser Arbeit wurde am Durchflusszytometer eine vermehrte Expression von CD11b bei durch SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz stimulierten PMN beobachtet. Es fiel auf, dass die Graphen der mit SLO aktivierten PMN mit denen der mit SLO unter Cysteinzusatz ermittelten Graphen fast identisch waren. Der einzige Unterschied war, dass mit Cystein aktiviertes SLO in einer zehnfach niedrigeren Dosierung in der Lage war die gleichen CD11b Expressionsraten, wie nicht aktiviertes SLO auszulösen.

Bei mit 500 HU/ml SLO stimulierten PMN wurden schon nach einer halben Stunde $52,66 \pm 3,00\%$ CD11b positive Events gemessen. Ab der Schwellenkonzentration von 750 HU/ml SLO wurden die PMN nach fünf Minuten mit einem Maximalwert von $56,30 \pm 5,03\%$ aktiviert. Die größte Aktivierung der PMN von $65,52 \pm 5,07\%$, die weder mit α -Toxin- noch mit LPS-Simulation erreicht wurde, konnte mit 1000 HU/ml SLO ermittelt werden. Um den alleinigen Einfluss des biologischen Aktivators Cystein auf die Aktivierung der PMN auszuschließen, wurden diese nur mit Cystein versetzt. Von den gemessenen Werten unterschieden sich nur die Ergebnisse nach vier Stunden Inkubation mit 750 HU/ml SLO nicht signifikant von dem Wert der nur mit Cystein behandelten Probe, welche im Bereich der Kontrollwerte lag. Demzufolge konnte eine alleinige Aktivierung der PMN durch Cystein ausgeschlos-

sen werden. Des Weiteren zeigten SLO stimulierte PMN eine vergleichbar niedrige Aggregatbildung, wie es bei den mit α -Toxin stimulierte PMN der Fall war. Ab einer Konzentration von 750 HU/ml SLO konnte der Maximalwert der positiven Events an Aggregaten mit $15,64 \pm 2,22\%$, der nach einer halben Stunde erreicht wurde und sich kaum von dem Wert nach fünf Minuten Inkubationszeit unterschied, nicht mehr gesteigert werden. Die Aggregatbildung der mit SLO bzw. mit zehnfach niedriger dosiertem SLO mit Cysteinzusatz inkubierten PMN ähnelte sich sehr und unterschied sich bis auf die erhaltenen Werte nach vier Stunden signifikant im Vergleich zu den Werten der nur mit Cystein versetzten Proben, die auf Kontrollniveau blieben .

Die mikroskopische Betrachtung der Zellen bestätigte die am Durchflusszytometer gemessenen Ergebnisse. Die meisten der aggregierten PMN waren in einem vitalen Zustand, da sie in der Trypanblau-Lösung nicht blau gefärbt vorlagen.

Die letzten Untersuchungen bewiesen die synergistischen Interaktionen von bakteriell stimulierten Thrombozyten und PMN. Es zeigte sich, dass Thrombozyten, die mit $0,1 \mu\text{g/ml}$ LPS von E. coli versetzt wurden nach vier Stunden Inkubationszeit nur zu $5,08 \pm 0,28\%$ PAC-1 positive Events führten. Durch den Zusatz von PMN in physiologischer Konzentration konnte die Aktivierung der Thrombozyten jedoch signifikant auf $36,49 \pm 5,25\%$ erhöht werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Um die bis heute noch nicht genau geklärte Pathogenese der Sepsis und Endokarditis zu untersuchen wurde der Einfluss der drei pathogenen Toxine α -Toxin von S. aureus, SLO von S. pyogenes und LPS von E. coli auf den Aktivierungszustand von Thrombozyten und PMN untersucht. Dazu wurde die Aggregation der Zellen am Aggregometer, die thrombozytäre de novo Proteinsynthese mittels Western Blot Analysen sowie der Aktivierungsstatus der Zellen am Durchflusszytometer untersucht. Einen schematischen Überblick über die gewonnenen Erkenntnisse gibt Abbildung 197.

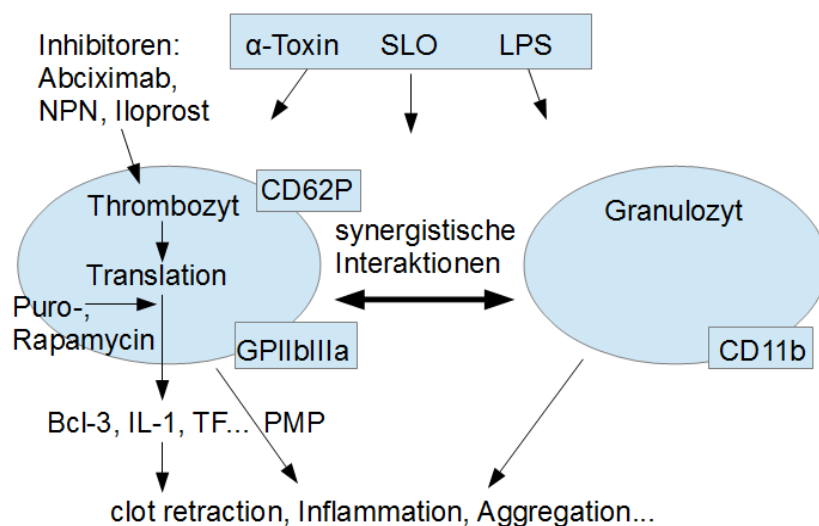


Abbildung 197 Schematischer Überblick über die gewonnenen Ergebnisse zur Aktivierung und Interaktion von durch bakterielle Toxine stimulierte Thrombozyten und PMN

Bei den Aggregationsmessungen konnte innerhalb des Messzeitraums von drei Minuten nur mit α -Toxin eine Aggregation ausgelöst werden. Bei SLO bzw. aktiviertem SLO mit Cysteinzusatz konnte zwar eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors am Durchflusszytometer festgestellt werden, diese war jedoch vermutlich zu gering um eine Aggregation auszulösen. Sowohl die durch physiologische Agonisten als auch die durch α -Toxin induzierte Thrombozytenaggregation konnte durch die auf unterschiedlichen Ebenen wirkenden Inhibitoren Abciximab, Iloprost und NPN dosisabhängig inhibiert werden. Dabei erwiesen sich Abciximab und NPN als effektive Inhibitoren der α -Toxin vermittelten Plättchenaggregation. Mit Iloprost konnte eine relative Aggregation von circa 20% nicht unterschritten werden. Anhand ähnlicher IC_{50} -Werte konnte geschlussfolgert werden, dass die aggregationsinduzierende Potenz von α -Toxin der von Kollagen und Ristocetin gleicht. Mit dem Translationsinhi-

bitor Puromycin konnte ebenso eine Abnahme der Thrombozytenaggregation festgestellt werden, die möglicherweise durch die Inhibierung der Expression wichtiger Proteine, die für die Aggregation benötigt werden oder durch direkte toxische Effekte des Antibiotikums auf die Plättchen verursacht, wurde. Schließlich konnte der Zusatz von PMN zu α -Toxin stimulierten Plättchen die Aggregation um mehr als das Doppelte des ursprünglichen Wertes erhöhen, was die synergistischen Interaktionen zwischen Thrombozyten und PMN bestätigt. Mit den Toxinen LPS und SLO mit bzw. ohne Cysteinuzusatz konnte durch den Zusatz von PMN zu α -Toxin bzw. ohne α -Toxin stimulierten Plättchen keine messbare Aggregation innerhalb von drei Minuten festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin der Einfluss der Toxine auf die Expression des Proteins Bcl-3 untersucht. Es gelang der Nachweis, dass SLO ebenso wie α -Toxin und das endogene Thrombin in der Lage sind die Bcl-3 Expression in Thrombozyten zu induzieren. Mit den drei verwendeten Matrices löslichem Fibrinogen sowie adhärentem Kollagen bzw. Fibrinogen konnten ähnliche Tendenzen zur Bcl-3 Expression beobachtet werden. Dabei war die α -Toxin und Thrombin induzierte Bcl-3 Expression annähernd gleich, während SLO zu deutlich höheren Expressionsraten führte.

Die bei den Versuchen ohne Fibrinogenzusatz deutlich verringerte Bcl-3 Synthese bestätigte, dass die Proteinexpression durch Bindung von Fibrinogen an das aktivierte Integrin α IIb β ₃-vermittelt stattfindet. Dabei war die Reduktion der Bcl-3 Expressionsrate umso höher, je potenter der Agonist war. Des Weiteren konnte eine sowohl zeit-, als auch konzentrationsabhängige Bcl-3-Expression durch SLO stimulierte Plättchen nachgewiesen werden. Innerhalb von 24 Stunden wurde ein Gauß'scher Kurvenverlauf der Proteinexpression, mit einer maximalen relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression nach vier Stunden, erhalten. Bei der Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit stieg der Wert der relativen Signalintensität bis zu einer Konzentration von etwa 2000 HU/ml SLO auf den Maximalwert an und konnte durch eine weitere Erhöhung der Toxinkonzentration nicht mehr signifikant gesteigert werden. Weiterhin konnte die Beobachtung, dass Reduktionsmittel wie Cystein die biologische Aktivität von SLO verstärken bei der Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit der Bcl-3 Expression von Thrombozyten, die mit 20 mM Cystein versetztem SLO oder nur mit SLO stimuliert wurden, nicht bekräftigt werden. Eine alleinige Wirkung von Cystein auf die thrombozytäre Bcl-3 Expression konnte ebenso ausgeschlossen werden. Somit scheint die Bcl-3 Expression unabhängig von dem Oxidationsstatus des Toxins zu sein.

Außerdem konnte durch die mit Puromycin um etwa die Hälfte verringerte Bcl-3 Expression von mit Thrombin, α -Toxin und SLO stimulierten Thrombozyten bestätigt werden, dass Bcl-3 ein Translationsprodukt ist. Ähnlich wie Puromycin konnte auch der mTOR-Inhibitor Rapamycin das Signal der relativen Bcl-3 Expression von Toxin stimulierten Thrombozyten um etwa die Hälfte reduzieren, was beweist, dass Bcl-3 ebenso unter translationaler Kontrolle von mTOR reguliert wird. Die Reduktion der Bcl-3 Expression unter Puro- und Rapamycin war dabei umso stärker, je potenter der Plättchenagonist war. Schließlich wurde der Effekt von Thrombozyteninhibitoren auf die Bcl-3 Expression untersucht. Da nur aktivierte Plättchen in der Lage sind Proteine zu translatieren, konnten Abciximab, Iloprost und NPN eine Reduktion der relativen Signalintensität der Bcl-3 Expression um mehr als 50% erreichen. Die durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen der Proben bestätigten die Ergebnisse der Western Blot Analysen.

Am Durchflusszytometer konnte die toxinvermittelte konzentrationsabhängige Aktivierung von Thrombozyten und PMN anhand verschiedener Aktivierungsparameter nachgewiesen werden.

Mit α -Toxin als auch SLO ergab sich eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Fibrinogenrezeptors. Mit beiden Toxinen zeigte sich, dass es ab einer bestimmten Schwellenkonzentration zu einer Verschiebung des Maximums der PAC-1 positiven Events von einer halben Stunde auf fünf Minuten Inkubationszeit kam. Nachdem der Maximalwert der Aktivierung erreicht wurde, führten immer höhere Toxinzugaben zu immer niedrigeren Aktivierungswerten. Weiterhin fiel unter SLO-Zusatz auf, dass umso höher die eingesetzte SLO Konzentration war, der Wert der PAC-1 positiven Events nach fünfminütiger Inkubationszeit sank, während der Wert nach vierstündiger Inkubation weiter anstieg. Mit 20 mM Cystein aktiviertes SLO war ebenfalls in der Lage den Fibrinogenrezeptor zu aktivieren. Das Maximum der Fibrinogenrezeptoraktivierung konnte zumeist nach einer halben Stunde gemessen werden. Anders als mit nicht aktiviertem SLO führte eine höhere Toxinzugabe nur zu unwesentlich höheren Aktivierungswerten. Ebenfalls kam es auch nicht zu einem späteren Anstieg der GPIIb/IIIa-

Aktivierung. Des Weiteren scheint der Zusatz von Cystein die biologische Aktivität des Toxins um etwa das Zehn- bis Fünffache, bezogen auf die PAC-1 positiven Events, zu erhöhen.

Der weitere zeitlichen Verlauf der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors, der CD62P Expression sowie der PMP- und Aggregatbildung wurde mit 24 Stunden-Inkubationsversuchen untersucht. Bei den mit 0,1 µg/ml α-Toxin stimulierten Plättchen konnte nach vier Stunden Inkubationszeit eine weitere Steigung der Fibrinogenrezeptoraktivität festgestellt werden. Der zeitliche Verlauf der gemessenen CD62P positiven Events passte zu den gemessenen PAC-1 positiven Ereignissen. Bei der α-Toxin induzierten Aggregatbildung konnte ein Gauß'scher Kurvenverlauf bestimmt werden, während sich bei der PMP-Bildung innerhalb des Messzeitraumes zwei Maxima ergaben.

Bei den mit 500 HU/ml SLO inkubierten Thrombozyten fiel auf, dass sich die Verläufe der Graphen aller Aktivierungsparametern mit den unter α-Toxinzusatz erhaltenen Graphen ähneln, welches vermutlich an dem gleichen Aktivierungsmechanismus beider Toxine liegt. Generell kann man sagen, dass sich die Werte der Thrombin, SLO und α-Toxin induzierten PMP und Aggregatbildung gleichen, die Toxine bzw. der endogene Agonist Thrombin hierbei also gleich potent sind eine PMP- sowie Aggregatbildung zu induzieren. Bei den PAC-1 und CD62P positiven Events ist α-Toxin zu Beginn der Inkubationszeit potenter und aktiviert mehr Plättchen, während im weiteren Verlauf der Inkubationszeit SLO die Thrombozyten sowohl schneller als auch stärker aktivierte. Bei mit 0,1 µg/ml LPS stimulierten Plättchen lagen die Werte für die Aktivierungsparameter nur im Bereich der Kontrollproben.

Weiterhin wurde die Wirkung der Medikamente Abciximab, Iloprost und NPN sowie Puromycin und RGDS auf die mit Thrombin bzw. den Toxinen stimulierten Plättchen getestet. Im Vergleich zu den nur mit Thrombin bzw. den Toxinen versetzten Proben wurden alle Aktivierungsparameter durch die eingesetzten Substanzen signifikant gesenkt. Es fiel auf, dass sich die Werte der Inhibition der bakteriell stimulierten Plättchen ähnlicher waren als die mit Thrombin gemessenen Werte. Zu bemerken ist außerdem, dass Abciximab nicht zu einer so starken Reduktion der CD62P positiven Events wie Iloprost und NPN führte.

Anhand von Aktivierungsmarkern wie der CD11b Expression sowie der Bildung von PMN-Aggregaten wurde der Einfluss der bakteriellen Toxine SLO, LPS und α-Toxin auf die PMN am Durchflusszytometer untersucht. Bei den mit α-Toxin versetzten PMN verschob sich das Maximum der gemessenen positiven Events, wie schon oft beobachtet, ab einer Schwellenkonzentration von fünf Minuten auf eine halbe Stunde Inkubationszeit. Bei mit 1 µg/ml α-Toxin stimulierten Granulozyten wurde der Maximalwert der CD11b positiven Ereignissen nach fünf Minuten bestimmt. Eine weitere Erhöhung der α-Toxin Konzentration erzielte nur unwesentlich höhere Aktivierungswerte. Auch die Aggregatbildung konnte mit α-Toxin stimulierten PMN ebenfalls mit einem Maximalwert nach einer Stunde angeregt werden. Bei den mit LPS von *E. coli* und LPS von *S. ent.* stimulierten PMN kam es erwartungsgemäß zu ähnlichen Graphenverläufen mit einem Maximalwert nach einer Stunde sowohl für die CD11b positiven Events als auch für die Aggregatbildung.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit am Durchflusszytometer eine vermehrte Expression von CD11b bei durch SLO bzw. SLO mit Cysteinzusatz stimulierten PMN beobachtet. Es fiel auf, dass die Graphen der mit SLO aktivierten PMN mit denen der mit SLO unter Cysteinzusatz ermittelten Graphen fast identisch waren. Der einzige Unterschied war, dass mit Cystein aktiviertes SLO in einer etwa zehnfach niedrigeren Dosierung in der Lage war die gleichen CD11b Expressionsraten, wie nicht aktiviertes SLO auszulösen. Ab der Schwellenkonzentration von 750 HU/ml SLO wurden die PMN nach fünf Minuten aktiviert. Eine alleinige Aktivierung der PMN durch Cystein konnte ausgeschlossen werden. Des Weiteren zeigten SLO stimulierte PMN eine vergleichbar niedrige Aggregatbildung, wie es bei den mit α-Toxin stimulierten PMN der Fall war. Die mikroskopische Betrachtung der Zellen bestätigte die am Durchflusszytometer gemessenen Ergebnisse.

Die letzten Untersuchungen bewiesen die synergistischen Interaktionen von bakteriell stimulierten Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten. Es zeigte sich, dass Thrombozyten, die mit 0,1 µg/ml LPS von *E. coli* versetzt wurden nach vier Stunden Inkubationszeit nicht aktiviert vorlagen. Durch den Zusatz von PMN in physiologischer Konzentration konnte die Aktivierung der Thrombozyten jedoch signifikant erhöht werden.

Ausblick

Sowohl bei der Sepsis als auch bei der Endokarditis handelt es sich um schwerwiegende Erkrankungen. Die Sepsis wird durch eine überschießende Immunantwort und Koagulation auf eine Infektion charakterisiert. Bei der Endokarditis handelt es sich um eine lebensbedrohliche Infektionskrankheit mit septischem Krankheitsbild, bei der Erreger das Endokard des Herzens befallen und zu einer Entzündung führen. Eine besondere Rolle im Prozess der septischen Krankheitsentstehung spielen bakterielle Toxine von klinisch relevanten Erregern, wie die porenformenden Zytolysine α -Toxin von *S. aureus* und SLO von *S. pyogenes* sowie das LPS von *E. coli*, die zu vielfältigen primären und sekundären zellulären Effekten führen. Besonders Thrombozyten als Zellen der Hämostase und neutrophile Granulozyten als wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr sind aktiv an der Pathophysiologie der Sepsis und Endokarditis beteiligt und verstärken ihre Effekte gegenseitig.

Trotz der modernen Medizin versterben immer noch 30-50 % der Patienten mit Sepsis und bis zu 80% der Erkrankten mit einem septischen Schock an dieser Infektionskrankheit [276]. Zudem ist die Inzidenz der Erkrankung hauptsächlich aufgrund einer steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung, der Zunahme chronisch Kranker sowie der Fortschritte in der intensivmedizinischen apparativen Versorgung, steigend [277]. Es bedarf also weiterer gründlicher Untersuchungen der noch nicht genau geklärten Pathomechanismen im septischen Krankheitsprozess sowie weiterer klinischer Studien. Bei allen hier durchgeführten Untersuchungen handelt es sich um *in vitro* Testungen. Diese geben erste Anhaltspunkte, über die grundlegenden Pathomechanismen und entsprechen in der Regel nicht den realen *in vivo* Bedingungen. Ein zukünftiger Schritt wäre, die hier gewonnenen *in vitro* Ergebnisse mit *in vivo* Ergebnissen zu bekräftigen.

Die α -Toxin induzierte Thrombozytenaggregation konnte mit Inhibitoren der Thrombozyten, wie Abciximab, Iloprost und NPN effektiv gehemmt werden. Die Toxine SLO und LPS induzieren nicht direkt eine Plättchenaggregation, können jedoch über eine Aktivierung des Endothels oder von PMN ebenfalls eine Plättchenaggregation induzieren. Da es bei einer Sepsis und Endokarditis zu einer verstärkten Plättchenaggregation kommt, könnte die Behandlung von Patienten mit geeigneten Thrombozytenaggregationsinhibitoren neben der antibiotischen Therapie und Volumensubstitution ein neuer Ansatzpunkt in der Patientenmedikation sein.

Interessant scheint auch die Rolle der *de novo* Protein Expression in Thrombozyten. Anhand des Bcl-3 Proteins erfolgte der Nachweis, dass alle drei untersuchten Toxine in der Lage waren die Thrombozyten zu aktivieren und eine Expression des Proteins zu induzieren. Durch eine Aktivierung der Thrombozyten, wie es auch mit α -Toxin und SLO am Durchflusszytometer nachgewiesen werden konnte, synthetisieren Plättchen eine Vielzahl an Proteinen wie TF oder IL-1, die unter anderem an wichtigen Prozessen wie der Koagulation und Inflammation beteiligt sind. Diese Proteine und deren genaue Funktionen sollten näher untersucht werden, um weitere Ansatzpunkte in der Sepsis- und Endokarditisbehandlung zu finden. Interessant scheint auch der Einsatz von Translationsinhibitoren, wodurch es erst gar nicht zur Proteinexpression in aktivierten Plättchen kommt.

Ebenso konnte der Nachweis erbracht werden, dass sich die Aktivierung von bakteriell stimulierten Thrombozyten und PMN durch die Interaktion beider Zellarten synergistisch verstärkt, wodurch es zu einer Perpetuierung der Inflammation kommt. Somit sollte auch der weitere Einfluss von PMN im Zuge der Sepsis bzw. Endokarditis näher betrachtet werden.

Eine Frage, die ebenfalls geklärt werden sollte, ist die Konzentration der Toxine unter *in vivo* Bedingungen, um genau abschätzen zu können, ob die Toxine überhaupt in diesen Konzentrationen Effekte auf die Zellen haben. Da es im Verlauf einer Sepsis oft zu Koinfektionen kommt, spielt es ebenso eine Rolle, die weitere synergistische Wirkung der Toxine zu untersuchen.

Es werden also noch weitere Forschungen von Nöten sein, um Erkrankungen mit septischem Krankheitsbild besser behandeln zu können und neue pharmakologische Ansätze zu finden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Sepsis History - Deutsche Sepsisgesellschaft, [cited 2013 May 11]; Available from: <http://www.sepsisgesellschaft.de/DSG/Englisch/Disease+pattern+of+Sepsis/Sepsis+History?sid=QZwyqniQiNAOR8oDFGa4Bg&iid=2>
- [2] Kreymann G., Wolf M., Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie?, Georg Thieme Verlag, 1996, 31, 9–14.
- [3] Lever A., Mackenzie I., Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis, *BMJ*, 2007, 879-883
- [4] Mewis C., Riessen R., *Kardiologie compact: Alles für Station und Facharztprüfung*, Georg Thieme Verlag, 2006
- [5] Kern W. V., Bakteriämie and Sepsis, *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 2011, 136, 182-185
- [6] Hombach V., *Interventionelle Kardiologie, Angiologie und Kardiovaskularchirurgie: Technik, Klinik, Therapie*, Schattauer Verlag, 2001
- [7] Musser J.M., Hauser A. R., *Streptococcus pyogenes causing toxic-shock-like syndrome and other invasive diseases: clonal diversity and pyrogenic exotoxin expression*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88 (7), 2668–72
- [8] Paumgartner G., Brandt T., *Therapie innerer Krankheiten*, Springer Verlag, 1999
- [9] Opal S. M., Scannon P. J., Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock, *The Journal of infectious diseases*, 1999, 180 (5), 1584–9
- [10] Bhakdi S., Bayley H., Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin O, and Escherichia coli hemolysin : prototypes of pore-forming bacterial cytolysins, *Arch Microbiol*, 1995, 165, 73–79
- [11] Singer G., Urakami H., Platelet recruitment in the murine hepatic microvasculature during experimental sepsis: role of neutrophils, *Microcirculation*, 2006, 13, 89-97
- [12] Levi M., Platelets at a crossroad of pathogenic pathways in sepsis, *Journal of thrombosis and haemostasis*, 2004, 2(12), 2094–5
- [13] Deviri E., Glenville B.E., Inflammatory response in infective endocarditis, *European Journal of Inflammation*, 2007, 5(2), 57–63
- [14] Alberti C., Brun-Buisson C., Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study, *Intensive care medicine*, 2002, 28 (2), 108–21
- [15] Sundararajan V., Macisaac C. M., Epidemiology of sepsis in Victoria, Australia, *Critical care medicine*, 2005, 33 (1), 71–80
- [16] Friedman G., Silva E., Has the mortality of septic shock changed with time, *Critical care medicine*, 1998, 26 (12), 2078–86
- [17] Angus D. C., Linde-Zwirble W. T., Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care, *Critical care medicine*, 2001, 29 (7), 1303–10

- [18] Martin G. S., Mannino D. M., The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000, *The New England journal of medicine*, 2003, 348 (16), 1546–54
- [19] Geffers C., Gastmeier P., Gesundheitsberichterstattung des Bundes Heft 8 - Nosokomiale Infektionen, Robert-Koch Institut, 2012
- [20] Moerer O., Quintel M., Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects, *Der Internist*, 2009, 50 (7), 788-798
- [21] Hagel S., Brunkhorst F., *Intensivmedizin und Notfallmedizin-Sepsis*, 2011, 48, 57–73
- [22] Schottmüller H., Wesen und Behandlung der Sepsis, *Verhandlungen des 31. Deutschen Kongresses für Innere Medizin*, 1914, 31, 257–280
- [23] Werdan K., Schuster H. P., *Sepsis und MODS*, Springer Verlag, 2005
- [24] Bodmann K. F., Vogel F., Antimikrobielle Therapie der Sepsis, *Chemotherapie Journal*, 2001, 2, 43-56
- [25] Becker A., Rosenthal E. J. K., Antibiotika-Empfindlichkeit von Sepsis Erregern 2006-2007, *Chemotherapie Journal*, 2010, 28–39
- [26] Okazaki Y., Matsukawa A., Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis, *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 2009, 3 (1), 26–32
- [27] Engel C., Prävalenz, Morbidität und Mortalität der schweren Sepsis auf deutschen Intensivstationen, 2006, 1–34
- [28] Bone R. C., Balk R. A., Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians, Society of Critical Care Medicine, *Chest*, 1992, 101 (6), 1644-55
- [29] Zhou X., Gao X., LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b / CD18 expression in neutrophils, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physio*, 2005, 288, 655–662
- [30] Markiewski M. M., De Angelis R. A., Complexity of complement activation in sepsis, *J Cell Mol Med*, 2009, 12 (6A), 2245–54
- [31] Oberholzer A., Oberholzer C., Sepsis Syndromes: Understanding the Role of Innate and Aquired Immunity, *Shock*, 2001, 16 (2), 83-96
- [32] Löffler G., *Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie*, Springer, 2008
- [33] Pathophysiologie Sepsis, [cited 2013 Apr 7]; Available from: <http://www.sepsisgesellschaft.de/DSG/Deutsch/Krankheitsbild+Sepsis/Informationen+fuer+Mediziner/Pathophysiologie?sid=9zj4w12NYgzbtdqbpslp0&iid=2>
- [34] Trappe U., Riess H., Pathophysiologische Grundsätze bei Sepsis, *Hämostaseologie*, 2005, 2 (25), 167-254
- [35] Russell J. A., Management of sepsis, *The New England journal of medicine*, 2006, 355 (16), 1699–713
- [36] Thaller F., Stickler K., Sepsis, *Wiener klinische Wochenschrift*, Springer Verlag, 2006, 2, 93–108
- [37] Snowden C., Kirkman E., The pathophysiology of sepsis, *British Journal of Anaesthesia*, 2002, 2 (1), 11–14

- [38] Cohen J., The immunopathogenesis of sepsis, *Nature*, 2002, 420, 885–891
- [39] *Harrisons Innere Medizin Online*, 18. Auflage [Internet]. [cited 2014 May 9]; Available from: http://www.eharrison.de/b2b-web/public/images/chapter/cp_H18_8_124
- [40] Graumann, Sasse, *Compact Lehrbuch Anatomie: in 4 Bänden*, Schattauer Verlag, 2004
- [41] Fießl H. S., *Innere Medizin in Frage und Antwort*, Georg Thieme Verlag, 2004
- [42] Brodt W. *Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung ; mit 121 Tabellen* [Internet]. Schattauer Verlag; 2013 [cited 2014 May 14]. Available from: <http://books.google.com/books?id=Ffep3V3CKScC&pgis=1>
- [43] *Innere Medizin: 299 Synopsen, 611 Tabellen* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2001 [cited 2014 May 9]. Available from: http://books.google.com/books?id=5d3Z_GTFjEYC&pgis=1
- [44] Reiche D. *Roche Lexikon Medizin* [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2003 [cited 2014 May 16]. Available from: <http://books.google.com/books?id=UJe3tx9KQ-AC&pgis=1>
- [45] Naber CK. [S2 Guideline for diagnosis and therapy of infectious endocarditis]. *Zeitschrift für Kardiologie* [Internet]. 2004 Dec [cited 2014 Apr 11];93(12):1005–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15599576>
- [46] Furger P. *Innere quick: der Fakten-Turbo* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2003 [cited 2014 May 16]. Available from: http://books.google.com/books?id=eA9vD_WD8NIC&pgis=1
- [47] ... vom S. Siegenthalers *Differenzialdiagnose: innere Krankheiten - vom Symptom zur Diagnose ; 323 Tabellen* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2005 [cited 2014 Apr 11]. Available from: <http://books.google.com/books?id=mm9su5fuL58C&pgis=1>
- [48] Schifferli J, Schoenenberger RA, Haefeli WE. *Internistische Notfälle: Sicher durch die Akutsituation und die nachfolgenden 48 Stunden* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2008 [cited 2014 Apr 11]. Available from: <http://books.google.com/books?id=YhIRWyamwNMC&pgis=1>
- [49] Wappler F, Tonner P, Bürkle H. *Anästhesie und Begleiterkrankungen: Perioperatives Management des kranken Patienten* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2011 [cited 2014 Apr 11]. Available from: <http://books.google.com/books?id=ADOxI9SpEj4C&pgis=1>
- [50] *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt ; mit 712 Tabellen* [Internet]. 2007 [cited 2014 May 23]. Available from: <http://books.google.com/books?hl=de&id=OJhqMMF8syYC&pgis=1>
- [51] Buerke M. 3.4 Infektiöse Endokarditis . 2006;:323–332.
- [52] Marsh P, Martin M V. *Orale Mikrobiologie: 60 Tabellen* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2003 [cited 2014 May 16]. Available from: <http://books.google.com/books?id=uYBJ9ExfTuQC&pgis=1>
- [53] Baenkler H-W, Goldschmidt H, Hahn J-M, Hinterseer M, Knez A. *Kurzlehrbuch Innere Medizin* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2010 [cited 2014 May 16]. Available from: <http://books.google.com/books?id=i1OUCFF82V4C&pgis=1>
- [54] *Spezielle Pathologie* [Internet]. Schattauer Verlag; 1996 [cited 2014 May 9]. Available from: <http://books.google.com/books?id=tpu7s2eWsFYC&pgis=1>
- [55] *Histopathologie kompakt: Kursbuch der allgemeinen und speziellen Histopathologie* [Internet]. Schattauer Verlag; 2004 [cited 2014 May 14]. Available from: <http://books.google.com/books?id=I7CUiyS3qj4C&pgis=1>

- [56] PowerPoint Presentation - Herz 1 Endokarditis.pdf [Internet]. [cited 2014 May 15];Available from: <http://www.meduniwien.ac.at/expatho/leit/Herz 1 Endokarditis.pdf>
- [57] Red_White_Blood_cells.jpg (JPEG Image, 500 × 326 pixels) [Internet]. [cited 2014 Mar 26];Available from: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/24/Red_White_Blood_cells.jpg
- [58] Neumann HA. Das Gerinnungssystem [Internet]. 2007 [cited 2013 Feb 18]. Available from: <http://books.google.com/books?hl=de&lr=&id=urs2DiV0y4oC&pgis=1>
- [59] Michelson AD. Platelets (Google eBook) [Internet]. Academic Press; 2011 [cited 2013 Feb 17]. Available from: <http://books.google.com/books?id=GnlQGmiSylkC&pgis=1>
- [60] Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. Platelets [Internet]. 2001 Aug;12(5):261–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487378>
- [61] Morgenstern E. 2 Thrombozytenmorphologie.
- [62] Bergmann F. Physiologie des Thrombozyten. 2001;:333–339.
- [63] Kehrel BE. Biochemie und Physiologie. 2008;(42):289–298.
- [64] 45_05PlateletAggregation.jpg (JPEG Image, 594 × 300 pixels) [Internet]. [cited 2013 Feb 22];Available from: http://bio1151b.nicerweb.net/Locked/media/ch45/45_05PlateletAggregation.jpg
- [65] Ago TY, Were R. Beyond Clotting : The Powers of Platelets. 2010;328(April).
- [66] Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology [Internet]. 2005 Jul [cited 2013 May 30];25(7):1321–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831808>
- [67] Lip GY, Blann a. von Willebrand factor: a marker of endothelial dysfunction in vascular disorders? Cardiovascular research [Internet]. 1997 May;34(2):255–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9205537>
- [68] Reininger AJ. Koagulatorische Aktivität der Thrombozyten. 2007;:247–250.
- [69] Andrews RK, Shen Y, Gardiner EE, Dong JF, López J a, Berndt MC. The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. Thrombosis and haemostasis [Internet]. 1999 Aug;82(2):357–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10605725>
- [70] Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. Thrombosis and haemostasis [Internet]. 2001 Jul;86(1):189–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487007>
- [71] Haas T a, Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. Current opinion in cell biology [Internet]. 1994 Oct;6(5):656–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7833046>
- [72] Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. Blood reviews [Internet]. 2011 Jul [cited 2013 Mar 3];25(4):155–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21496978>
- [73] Smyth SS, Whiteheart S, Jr JEI, Coller BS. CHAPTER 114 PLATELET MORPHOLOGY , BIOCHEMISTRY , AND FUNCTION. :1735–1814.

- [74] Woulfe DS. Platelet G protein-coupled receptors in hemostasis and thrombosis. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* [Internet]. 2005 Oct;3(10):2193–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16194198>
- [75] Gawaz M. *Blood Platelets: Physiology, Pathophysiology, Membrane Receptors, Antiplatelet Drug, Coronary Heart Disease, Stroke, Peripheral Arterial Disease* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2001 [cited 2013 Feb 17]. Available from: http://books.google.com/books?id=osiV9K7w_RoC&pgis=1
- [76] Flaumenhaft R. Molecular basis of platelet granule secretion. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [Internet]. 2003 Jul 1 [cited 2013 May 28];23(7):1152–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12738684>
- [77] Pötzsch B, Gawaz MP, Madlener K. *Hämostaseologie* [Internet]. Springer DE; 2010 [cited 2013 Feb 20]. Available from: <http://books.google.com/books?id=EdVNHR7GI44C&pgis=1>
- [78] Samara WM, Gurbel P a. The role of platelet receptors and adhesion molecules in coronary artery disease. *Coronary artery disease* [Internet]. 2003 Feb [cited 2013 Mar 4];14(1):65–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12629328>
- [79] Jurk K, Kehrel BE. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. 2005;;:39–49.
- [80] Steeber A, Tedder F. The selectins : L-Selectin. 1995;9(July):866–873.
- [81] Mcnicol A, Israels SJ. Critical Review Platelets and Anti-platelet Therapy. 2003;396:381–396.
- [82] Fibrinogen from human plasma (F4883) - Product Information Sheet - f4883pis.pdf [Internet]. [cited 2013 Jun 1]; Available from: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/f4883pis.Par.0001.File.tmp/f4883pis.pdf
- [83] Phillips DFL, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa : The Responsive Integrin Minireview. 1991;65:359–362.
- [84] Heemskerk JWM, Bevers EM, Lindhout T. Platelet activation and blood coagulation. *Thrombosis and haemostasis* [Internet]. 2002 Aug;88(2):186–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12195687>
- [85] Spies C, Kochs E, Adams HA. *Anästhesiologie* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2008 [cited 2013 Jun 2]. Available from: <http://books.google.com/books?id=Ew7QlagAixUC&pgis=1>
- [86] Morel O, Morel N, Freyssinet J-M, Toti F. Platelet microparticles and vascular cells interactions: a checkpoint between the haemostatic and thrombotic responses. *Platelets* [Internet]. 2008 Feb [cited 2013 May 21];19(1):9–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18231934>
- [87] Soriano AO, Jy W, Chirinos J a., Valdivia M a., Velasquez HS, Jimenez JJ, et al. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Critical Care Medicine* [Internet]. 2005 Nov [cited 2013 Aug 24];33(11):2540–2546. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00003246-200511000-00015>
- [88] Diamant M, Tushuizen ME, Sturk a, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *European journal of clinical investigation* [Internet]. 2004 Jun;34(6):392–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15200490>

- [89] Steiner-Welz S. Die wichtigsten Körperfunktionen [Internet]. Reinhard Welz Vermittler Verlag e.K.; [cited 2013 Jun 2]. Available from: <http://books.google.com/books?id=3QIW0a0rbRUC&pgis=1>
- [90] Weyrich AS, Denis MM, Schwertz H, Tolley ND, Foulks J, Spencer E, et al. mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets. 2007;109(5):1975–1983.
- [91] Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, et al. Incomplete Inhibition of Platelet Aggregation and Glycoprotein IIb-IIIa Receptor Blockade by Abciximab : Importance of Internal Pool of Glycoprotein IIb-IIIa Receptors. 2000;(8):915–922.
- [92] Nurden a. T, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors : Basic and Clinical Aspects. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [Internet]. 1999 Dec 1 [cited 2013 Mar 3];19(12):2835–2840. Available from: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.ATV.19.12.2835>
- [93] Oh OH. 1/30 emea 2004. 2004;;1–30.
- [94] Nicolini FA, Mehta JL, Affairs V. Press pk. All rights. 1990;;337–342.
- [95] Lidbury PS, Nucci D, Vane JR. Interactions of iloprost and sodium nitroprusside on vascular smooth muscle and platelet aggregation. 1989;46619:1275–1280.
- [96] Grant SM, Goa KL. Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. Drugs [Internet]. 1992 Jun [cited 2013 Mar 4];43(6):889–924. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379160>
- [97] Doni MG, Alexandre A, Padoin E, Bertoncetto S, Deana R. Nitrovasodilators and cGMP inhibit human platelet activation. Cardioscience [Internet]. 1991 Sep [cited 2013 Mar 4];2(3):161–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1660321>
- [98] BEHANDLUNG DER HYPERTENSIVEN KRISE - arzney telegramm [Internet]. [cited 2013 Mar 4]; Available from: http://www.arzney-telegramm.de/html/1999_01/9901002_02.html
- [99] Sigma brand products are sold through Sigma-Aldrich, Inc. Sigma-Aldrich, Inc. warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for thei. 2003;70(3):9041.
- [100] Kehrel BE. Biochemie und Physiologie. 2008;(42):289–298.
- [101] Fraser J. Effects of the cell adhesion peptide, Arg-Gly-Asp-Ser, on responses of washed platelets from humans, rabbits, and rats. 2013;;132–136.
- [102] Tomiyama Y, Tsubakio T, Kurata Y. The Arg-Gly-Asp (RGD) recognition site of platelet glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets is accessible to high-affinity macromolecules. 2013;;2303–2312.
- [103] Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M, Brass LF. Changes in the Platelet Membrane Glycoprotein IIb * IIIa Complex during Platelet Activation *. 1985;260.
- [104] Weyrich a S, Schwertz H, Kraiss LW, Zimmerman G a. Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives. Journal of thrombosis and haemostasis : JTH [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Jun 3];7(2):241–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3027201&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- [105] Biology C. Signal-dependent translation of a regulatory protein , Bcl-3 , in activated human platelets. 1998;95(May):5556–5561.
- [106] Bundy DL, McKeithan TW. Diverse effects of BCL3 phosphorylation on its modulation of NF-kappaB p52 homodimer binding to DNA. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1997 Dec 26;272(52):33132–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407099>
- [107] Brasier a R, Lu M, Hai T, Lu Y, Boldogh I. NF-kappa B-inducible BCL-3 expression is an autoregulatory loop controlling nuclear p50/NF-kappa B1 residence. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2001 Aug 24 [cited 2013 Mar 3];276(34):32080–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387332>
- [108] Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, Bray PF, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Integrin-dependent Control of Translation: Engagement of Integrin α . 1999;144(1):175–184.
- [109] Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. 2006;203(11):2433–2440.
- [110] Weyrich AS, Schwertz H, Kraiss LW, Guy A. NIH Public Access. 2011;7(2):241–246.
- [111] Graw J. Genetik [Internet]. Springer DE; 2006 [cited 2013 Jun 11]. Available from: http://books.google.com/books?id=9_oHOhnrO8IC&pgis=1
- [112] Lindemann S, Gawaz M. *The Active Platelet : Translation and Protein Synthesis in an Anucleate Cell*. 2007;
- [113] Lindemann S, Tolley ND, Eyre JR, Kraiss LW, Mahoney TM, Weyrich a S. Integrins regulate the intracellular distribution of eukaryotic initiation factor 4E in platelets. A checkpoint for translational control. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 2001 Sep 7 [cited 2013 Mar 4];276(36):33947–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11431478>
- [114] Zimmerman G a, Weyrich AS. Signal-dependent protein synthesis by activated platelets: new pathways to altered phenotype and function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [Internet]. 2008 Mar [cited 2013 Jun 2];28(3):s17–24. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2594008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [115] Hausner T. Proteinbiosynthese und ihre Hemmung durch Antibiotika. 1988;(5).
- [116] ES S, PHC M 01/09. Puromycin Dihydrochloride from *Streptomyces alboniger*. Sigma Aldrich Product Information. 2009;:1.
- [117] *Introd l. vivo 1*. (223):223–243.
- [118] Weyrich a S, Lindemann S, Zimmerman G a. The evolving role of platelets in inflammation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* [Internet]. 2003 Sep;1(9):1897–905. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941029>
- [119] Sehgal S. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation Proceedings* [Internet]. 2003 May [cited 2013 Jun 22];35(3):S7–S14. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041134503002112>
- [120] File:PBNeutrophil.jpg - Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2013 Apr 1]; Available from: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBNeutrophil.jpg>

- [121] File:PBStabkerniger.jpg - Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2013 Apr 1]; Available from: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBStabkerniger.jpg>
- [122] Edwards SW. Biochemistry and Physiology of the Neutrophil [Internet]. Cambridge University Press; 2005 [cited 2013 Feb 23]. Available from: <http://books.google.com/books?id=fywG1DrnbgYC&pgis=1>
- [123] Histologie [Internet]. Walter de Gruyter; 1999 [cited 2013 Mar 27]. Available from: <http://books.google.com/books?id=S1HRxeGOQfMC&pgis=1>
- [124] Egger G. Akute Entzündung [Internet]. Springer DE; 2005 [cited 2013 Apr 1]. Available from: <http://books.google.com/books?id=Z9eMpq6jvVAC&pgis=1>
- [125] Ulfig N. Kurzlehrbuch Histologie [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2011 [cited 2013 Apr 1]. Available from: <http://books.google.com/books?id=aUHemixSTmEC&pgis=1>
- [126] Anatomie [Internet]. Springer DE; 2010 [cited 2013 Jun 12]. Available from: <http://books.google.com/books?id=4cEopwK5DzkC&pgis=1>
- [127] Brown K a, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. Lancet [Internet]. 2006 Jul 8;368(9530):157–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16829300>
- [128] Robbins Basic Pathology [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2012 [cited 2013 Jun 23]. Available from: http://books.google.com/books?id=aLV9nU_7X6UC&pgis=1
- [129] Transfusionsmedizin [Internet]. Springer DE; 2004 [cited 2013 Jun 12]. Available from: http://books.google.com/books?id=_N3ywU3lGe4C&pgis=1
- [130] Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Review article Role of selectins , a new family of adhesion molecules , in ischaemia-reperfusion injury. 1994;:289–294.
- [131] Immunsystem und Infektiologie [Internet]. Springer DE; 1999 [cited 2013 Jun 22]. Available from: http://books.google.com/books?id=e1HqlwoDH_oC&pgis=1
- [132] Chirurgische Forschung [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2005 [cited 2013 Jun 12]. Available from: <http://books.google.com/books?id=jsKdOBqvTxEC&pgis=1>
- [133] Intensivkurs allgemeine und spezielle Pathologie [Internet]. Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2008 [cited 2013 Jun 23]. Available from: <http://books.google.com/books?id=6J9OExyuMFsC&pgis=1>
- [134] Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science (New York, N.Y.) [Internet]. 2004 Mar 5 [cited 2013 May 23];303(5663):1532–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>
- [135] Schiebler TH, Korf H-W. Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie [Internet]. Springer DE; 2007 [cited 2013 Jun 12]. Available from: <http://books.google.com/books?id=lfDAwGTIERwC&pgis=1>
- [136] Duuren BL Van, Orris L. The Tumor-enhancing Principles of Croton Tiglium L . The Tumor-enhancing Principles of Croton tiglium L .'. 1965;:1871–1875.
- [137] Blumberg PM. Protein Kinase C as the Receptor for the Phorbol Ester Tumor Promoters : Sixth Rhoads Memorial Award Lecture Protein Kinase C as the Receptor for the Phorbol Ester Tumor Promoters : Sixth Rhoads Memorial Award Lecture1. 1988;:1–8.

- [138] Phorbol 12-myristate 13-acetate (P1585) - Datasheet - p1585dat.pdf [Internet]. [cited 2013 Jun 12]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/4/p1585dat.pdf>
- [139] Koolman J. Taschenatlas der Biochemie [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2003 [cited 2013 Jun 12]. Available from: <http://books.google.com/books?id=ngPVoG3Kl8gC&pgis=1>
- [140] RKI - EM-Aufnahmen - Staphylococcus aureus [Internet]. [cited 2013 Jan 31]; Available from: http://www.rki.de/SharedDocs/Bilder/InfAZ/Staphylokokken/EM_Tab_Staphylokokken.html
- [141] Dulon M, Haamann F, Peters C, Schablon A, Nienhaus A. MRSA prevalence in European healthcare settings: a review. BMC infectious diseases [Internet]. 2011 Jan [cited 2012 Sep 27];11(1):138. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3128047&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [142] Staphylococcus aureus [Internet]. [cited 2012 Oct 17]; Available from: <http://www.fsbio-hannover.de/oftheweek/190.htm>
- [143] Lander F, Berner R, Jugendmedizin K-. Infektionen durch Staphylococcus aureus – verändert sich das Krankheitsspektrum? 2008;:65–71.
- [144] Naber CK. Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America [Internet]. 2009 May 15 [cited 2012 Oct 7];48 Suppl 4(figure 1):S231–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19374578>
- [145] RKI - RKI-Ratgeber für Ärzte - Staphylokokken-Erkrankungen, insbesondere Infektionen durch MRSA [Internet]. [cited 2012 Oct 1]; Available from: http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Staphylokokken_MRSA.html
- [146] Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Trantum- J, Kranz T, Wellensiek H. On the Mechanism of Membrane Damage by Staphylococcus aureus a-Toxin. :83–94.
- [147] Hildebrandlg A, Pohl M, Bhakdill S. Staphylococcus aureus. 1991;
- [148] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. Clinical microbiology reviews [Internet]. 2000 Jan [cited 2012 Oct 5];13(1):16–34, table of contents. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=88931&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [149] Bramley a J, Patel a H, O'Reilly M, Foster R, Foster TJ. Roles of alpha-toxin and beta-toxin in virulence of Staphylococcus aureus for the mouse mammary gland. Infection and immunity [Internet]. 1989 Aug;57(8):2489–94. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=313475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [150] Patel a H, Nowlan P, Weavers ED, Foster T. Virulence of protein A-deficient and alpha-toxin-deficient mutants of Staphylococcus aureus isolated by allele replacement. Infection and immunity [Internet]. 1987 Dec;55(12):3103–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=260034&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [151] Bubeck Wardenburg J, Schneewind O. Vaccine protection against Staphylococcus aureus pneumonia. The Journal of experimental medicine [Internet]. 2008 Feb 18 [cited 2012 Oct 5];205(2):287–94. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2271014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- [152] Menzies BE, Kernodle DS. Passive immunization with antiserum to a nontoxic alpha-toxin mutant from *Staphylococcus aureus* is protective in a murine model. *Infection and immunity* [Internet]. 1996 May;64(5):1839–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174000&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [153] Gouaux E. alpha-Hemolysin from *Staphylococcus aureus*: an archetype of beta-barrel, channel-forming toxins. *Journal of structural biology* [Internet]. 1998 Jan;121(2):110–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9615434>
- [154] Bhakdil S. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. 1991;55(4).
- [155] Grandel U, Bennemann U, Buerke M, Hattar K, Seeger W, Grimminger F, et al. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and *Escherichia coli* hemolysin impair cardiac regional perfusion and contractile function by activating myocardial eicosanoid metabolism in isolated rat hearts. *Critical care medicine* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 May 21];37(6):2025–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19384217>
- [156] Siegel I, Cohen S. Action of *Staphylococcal* Toxin on Human Platelets. *Journal of Infectious Disease*. 1964;114(5):488–502.
- [157] Özel M, Reissbrodt R, Holland G. RKI - Infektionskrankheiten A-Z - *Streptococcus pyogenes* (Scharlach) [Internet]. 2009. [cited 2012 Aug 27]; Available from: <http://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/S/Scharlach/Scharlach.html>
- [158] Gatermann S, Miksits K. 26 Streptokokken. :203–221.
- [159] Rki RK. *Epidemiologisches Bulletin* 42/2008. 2008;2008(42).
- [160] Goldmann O, Sastalla I, Wos-Oxley M, Rohde M, Medina E. *Streptococcus pyogenes* induces oncosis in macrophages through the activation of an inflammatory programmed cell death pathway. *Cellular microbiology* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Aug 27];11(1):138–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19016794>
- [161] Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews* [Internet]. 2000 Jul;13(3):470–511. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18193655>
- [162] Streptolysin O from *Streptococcus pyogenes* lyophilized powder, Protein ~3 % by Lowry, 25,000-50,000 U/vial | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2013 Jan 6]; Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s5265?lang=de®ion=DE>
- [163] Bhakdi S, Tranum-Jensen J, Sziegoleit a. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and immunity* [Internet]. 1985 Jan;47(1):52–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=261464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [164] Alouf JE. (STREPTOLYSIN O , STREPTOLYSIN S , ERYTHROGENIC TOXIN) Deoxyribonucleases A , B , C , D u m. 1980;11.
- [165] Herbert D, Todd EW. Purification and properties of a haemolysin produced by group A haemolytic streptococci (streptolysin O). *The Biochemical journal* [Internet]. 1941 Nov;35(10-11):1124–39. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1265617&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [166] Paste I, Ro D. 443 (1976) 288-300 Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam - Printed in The Netherlands. 1976;443:288–300.
- [167] Walch M, Ziegler U, Groscurth P. Effect of streptolysin O on the microelasticity of human platelets analyzed by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* [Internet]. 2000 Feb;82(1-4):259–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741678>
- [168] Bhakdi S, Roth M, Sziegleit a, Tranum-Jensen J. Isolation and identification of two hemolytic forms of streptolysin-O. *Infection and immunity* [Internet]. 1984 Nov;46(2):394–400. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=261545&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [169] Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD. Cytotoxic Effects of Streptolysin O and Streptolysin S Enhance the Virulence of Poorly Encapsulated Group A Streptococci. 2003;71(1):446–455.
- [170] Limbago B, Penumalli V, Weinrick B, Scott JR. Role of streptolysin O in a mouse model of invasive group A streptococcal disease. *Infection and immunity* [Internet]. 2000 Nov;68(11):6384–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=97723&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [171] Meehl M a, Caparon MG. Specificity of streptolysin O in cytolysin-mediated translocation. *Molecular microbiology* [Internet]. 2004 Jun [cited 2013 Jan 4];52(6):1665–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186416>
- [172] *Streptococcal Infections: Clinical Aspects, Microbiology, and Molecular Pathogenesis* [Internet]. Oxford University Press; 2000 [cited 2013 Feb 1]. Available from: http://books.google.com/books?id=k_gROZ_xu6sC&pgis=1
- [173] File:EscherichiaColi NIAID.jpg - Wikimedia Commons [Internet]. [cited 2014 May 21]; Available from: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg
- [174] *EdiTORial In appreciation of Theodor Escherich*. 2007;5(December):2007.
- [175] Kayser FH, Bo EC. Bakterien als Krankheitserreger. 2005;(Isbn 3134448114):245–262.
- [176] *Escherichia-coli* [Internet]. [cited 2013 Jan 22]; Available from: http://www.zct-berlin.de/klinik.praxis/Escherichia_coli.html
- [177] Pridmore a C, Wyllie DH, Abdillahi F, Steeghs L, Van der Ley P, Dower SK, et al. A lipopolysaccharide-deficient mutant of *Neisseria meningitidis* elicits attenuated cytokine release by human macrophages and signals via toll-like receptor (TLR) 2 but not via TLR4/MD2. *The Journal of infectious diseases* [Internet]. 2001 Jan 1;183(1):89–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11076707>
- [178] Suerbaum S, Karch H. 29 Enterobakterien. :237–268.
- [179] Croxen M a, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology* [Internet]. 2010 Jan [cited 2012 Oct 29];8(1):26–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966814>
- [180] *Bacterial Endotoxin* [Internet]. [cited 2013 Jan 29]; Available from: <http://textbookofbacteriology.net/endotoxin.html>

- [181] Bashir A, Banday MZ, Haq E. Lipopolysaccharide , Mediator of Sepsis Enigma : Recognition and Signaling. 2011;1(1):1–13.
- [182] Triantafilou M, Triantafilou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends in immunology [Internet]. 2002 Jun;23(6):301–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072369>
- [183] Endotoxins: Pyrogens, LAL Testing and Depyrogenation, Third Edition (Google eBook) [Internet]. CRC Press; 2007 [cited 2013 Feb 11]. Available from: <http://books.google.com/books?id=7q7im7Rjvu4C&pgis=1>
- [184] Magalhães PO, Lopes AM, Mazzola PG, Rangel-Yagui C, Penna TC V, Pessoa A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques [Internet]. 2007 Jan;10(3):388–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727802>
- [185] Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya T a, Malik AB, et al. Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) [Internet]. 2009 Jun 15 [cited 2013 Feb 15];182(12):7997–8004. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787095&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [186] Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hänsch GM. CD14 , AND THE FC γ RECEPTORS CD16 AND CD64 ON POLYMORPHONUCLEAR NEUTROPHILS : DATA FROM PATIENTS WITH SEVERE BACTERIAL INFECTIONS AND LIPOPOLYSACCHARIDE-EXPOSED CELLS. 2003;19(1):5–12.
- [187] Miller SI, Ernst RK, Bader MW. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. Nature reviews. Microbiology [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Feb 10];3(1):36–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15608698>
- [188] Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. Research in immunology [Internet]. 1992 Jan;143(1):11–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373512>
- [189] Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, et al. Binding Protein. (13):12–14.
- [190] Lu Y-C, Yeh W-C, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine [Internet]. 2008 May [cited 2012 Oct 29];42(2):145–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304834>
- [191] Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. Current opinion in immunology [Internet]. 2000 Feb;12(1):20–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10679411>
- [192] Opal SM. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. International journal of medical microbiology : IJMM [Internet]. 2007 Sep [cited 2013 Jan 28];297(5):365–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17452016>
- [193] Arora NS, Ramanayake T, Ren Y-F, Romanos GE. Platelet-rich plasma: a literature review. Implant dentistry [Internet]. 2009 Aug [cited 2012 Jul 15];18(4):303–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19667818>
- [194] Kreutz RP, Nystrom P, Kreutz Y, Miao J, Kovacs R, Desta Z, et al. Inhibition of platelet aggregation by prostaglandin E1 (PGE1) in diabetic patients during therapy with clopidogrel and aspirin. Platelets

- [Internet]. 2012 Mar 2 [cited 2012 Aug 13]; Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22385219>
- [195] Platelet Rich Plasma (PRP) [Internet]. [cited 2012 Aug 29]; Available from: <http://www.med-college.hu/de/wiki/artikel.php?id=86&lan=1>
- [196] Axis shield Datasheet Polymorphprep [Internet]. [cited 2012 Jul 16]; Available from: <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Pmpp.pdf>
- [197] BL_9_ZK-Trypanbl-Pfli.pdf (application/pdf Object) [Internet]. [cited 2012 Jul 17]; Available from: http://www.chemieberufe.net/media/BL-Zellkultur/BL_9_ZK-Trypanbl-Pfli.pdf
- [198] c7774pis.doc - c7774pis.pdf [Internet]. [cited 2013 Jun 1]; Available from: http://www.sigmaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c7774pis.Par.0001.File.tmp/c7774pis.pdf
- [199] Laborjournal online: Methoden - 2D-Elektrophorese [Internet]. [cited 2012 Aug 30]; Available from: <http://www.laborjournal.de/rubric/methoden/methoden/v38.lasso>
- [200] Versuch_Gelelektrophorese.pdf (application/pdf Object) [Internet]. [cited 2012 Aug 30]; Available from: http://www.uni-leipzig.de/~belder/Praktikum/Versuch_Gelelektrophorese.pdf
- [201] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 Aug 15 [cited 2012 Jul 13];227(5259):680–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>
- [202] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1979 Sep [cited 2012 Aug 13];76(9):4350–4. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=411572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [203] Moore C. *Introduction to Western Blot*. Oxford: AbD Serotec; 2009.
- [204] Santa Cruz. β -Actin (C4): sc-47778. :47778.
- [205] Born GV. Aggregation of Blood Platelets by Adenosine Diphosphate and its Reversal. *Nature*. 1962;194(927).
- [206] Rahman M. *Introduction to Flow Cytometrie*. ABD Serotec; 2009.
- [207] Schmitz G, Rothe G, Ruf a, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thrombosis and haemostasis* [Internet]. 1998 May;79(5):885–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9609215>
- [208] Matzdorff a C, Berchner D, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Pralle H, Voss R. Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation in vitro. *Haemostasis* [Internet]. 1999;28(6):277–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461010>
- [209] Peterson DM, Stathopoulos N a, Giorgio TD, Hellums JD, Moake JL. Shear-induced platelet aggregation requires von Willebrand factor and platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood* [Internet]. 1987 Feb;69(2):625–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3492225>

- [210] Wolfson M, McPhail LC, Nasrallah VN, Snyderman R. Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* [Internet]. 1985 Sep;135(3):2057–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3160785>
- [211] Dörner K. *Taschenlehrbuch klinische Chemie und Hämatologie* [Internet]. Georg Thieme Verlag; 2006 [cited 2013 Apr 10]. Available from: http://books.google.com/books?id=O_zF4BXRm40C&pgis=1
- [212] Bcl-3 (H-146): sc-13038. 3:13038.
- [213] *Constitutive activity in receptors and other Proteins, Part 1 (Google eBook)* [Internet]. Academic Press; 2010 [cited 2013 Aug 20]. Available from: <http://books.google.com/books?id=N7w9APLHZ9gC&pgis=1>
- [214] Furman MI, Liu L, Benoit SE, Becker RC, Barnard MR, Michelson a D. The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1998 Mar 17;95(6):3082–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19698&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [215] Corum LE, Hlady V. The effect of upstream platelet-fibrinogen interactions on downstream adhesion and activation. *Biomaterials* [Internet]. 2012 Feb [cited 2013 Jul 23];33(5):1255–60. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [216] Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *The New England journal of medicine* [Internet]. 2007 Dec 13;357(24):2482–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077812>
- [217] Jin J. Molecular Basis for ADP-induced Platelet Activation. II. THE P2Y1 RECEPTOR MEDIATES ADP-INDUCED INTRACELLULAR CALCIUM MOBILIZATION AND SHAPE CHANGE IN PLATELETS. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1998 Jan 23 [cited 2013 Aug 3];273(4):2030–2034. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.273.4.2030>
- [218] Alarayed NA, Graham BR, Prichard BNC, Smith CCT. The potentiation of adrenaline-induced in vitro platelet aggregation by ADP, collagen and serotonin and its inhibition by naftopidil and doxazosin in normal human subjects. 1995;:369–374.
- [219] Kobzar G, Mardla V, Ivar J, Samel N, Madis L. Modulatory Effect of 8-iso-PGE2 on Platelets. 1997;28(2):317–321.
- [220] Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet collagen receptors. *Thrombosis and haemostasis* [Internet]. 2001 Jul;86(1):189–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11487007>
- [221] Rittenhouse SE. Activation of phospholipases A and C in human platelets exposed to epinephrine : Role of glycoproteins IIb / IIIa and dual role of epinephrine. 1986;83(December):9197–9201.
- [222] Siess W, Siegel FL, Lapetinag EG. protein phosphorylation, platelet shape Arachidonic Acid Stimulates the Formation of 1, 2-Diacylglycerol and Phosphatidic Acid in Human Platelets. 1983;
- [223] Dawood BB, Wilde J, Watson SP. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets* [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Mar 4];18(5):329–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654303>
- [224] Taylor M, Misso N, Stewart G, Thompson P. The effects of varying doses of aspirin on human platelet activation induced by PAF, collagen and arachidonic acid. *British Journal of Clinical Pharmacology*

- [Internet]. 1992 Jan 26 [cited 2013 Aug 15];33(1):25–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.1992.tb03996.x>
- [225] Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keane JF. -Tocopherol Inhibits Aggregation of Human Platelets by a Protein Kinase C Dependent Mechanism. *Circulation* [Internet]. 1996 Nov 15 [cited 2013 Aug 15];94(10):2434–2440. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/94/10/2434.long>
- [226] Mathur SC, Miller JL, Ph D, Narsipur SS. Emodialysis on. :23187.
- [227] Li Z, Delaney MK, O'Brien K a, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* [Internet]. 2010 Dec [cited 2013 Aug 3];30(12):2341–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3085271&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [228] Focus IN. Platelet function in sepsis. 2004;(December 2003):2096–2102.
- [229] Alexandrakis E. Histopathologie: Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik [Internet]. Schattauer Verlag; 2006 [cited 2014 May 23]. Available from: http://books.google.com/books?id=PnrZt_bL53EC&pgis=1
- [230] Exotoxin-Schock , ausgelöst durch Staphylococcus aureus α -Toxin , am Tiermodell Ratte - Auswirkungen auf Gefäßendothel , Leukozytenakkumulation und Thrombozytenaggregation . Dekan : Prof . Dr . M . Reinacher Prof . Dr . M . Reinacher Tag der mündlichen Pr. 2004;
- [231] Weyrich AS, Franks ZG, Russ M, Presek P, Werdan K, Buerke M. Staphylococcus aureus α -Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets. 2011;:120–133.
- [232] Hugo F, Klapettek K, Mueller C. STAPHYLOCOCCAL α TOXIN PROMOTES BLOOD COAGULATION VIA ATTACK ON HUMAN PLATELETS Staphylococcus aureus plays a major role as a bacterial pathogen in human medicine , causing diseases that range from superficial skin and wound to systemic nosocomial infecti. 1988;168(August).
- [233] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* [Internet]. 2003 May 15 [cited 2013 Aug 3];101(10):3765–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12543869>
- [234] Mascelli M a., Lance ET, Damaraju L, Wagner CL, Weisman HF, Jordan RE. Pharmacodynamic Profile of Short-term Abciximab Treatment Demonstrates Prolonged Platelet Inhibition With Gradual Recovery From GP IIb/IIIa Receptor Blockade. *Circulation* [Internet]. 1998 May 5 [cited 2013 Aug 4];97(17):1680–1688. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/01.CIR.97.17.1680>
- [235] Beghetti M, Reber G, De Moerloose P, Vadas L, Chiappe a., Spahr-Schopfer I, et al. Aerosolized iloprost induces a mild but sustained inhibition of platelet aggregation. *European Respiratory Journal* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2013 Aug 4];19(3):518–524. Available from: <http://erj.ersjournals.com/cgi/doi/10.1183/09031936.02.00094302>
- [236] Marcondes S, Cardoso MHM, Morganti RP, Thomazzi SM, Lilla S, Murad F, et al. Cyclic GMP-independent mechanisms contribute to the inhibition of platelet adhesion by nitric oxide donor: a role for alpha-actinin nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2006 Feb 28;103(9):3434–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413892&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- [237] Uzuki KS, Ato KS, Amohara MK, Aku SK, Awasaki TK. Comparative Studies of a Humanized Anti-glycoprotein IIb / IIIa Monoclonal Antibody , YM337 , and Abciximab on in Vitro Antiplatelet Effect and Binding Properties. 2002;25(8):1006–1012.
- [238] Harder S, Klinkhardt U, Graff J, Westrup D, Kirchmaier CM, Glusa E, et al. In vitro dose response to different GPIIb/IIIa-antagonists: inter-laboratory comparison of various platelet function tests. *Thrombosis research* [Internet]. 2001 Apr 1;102(1):39–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323013>
- [239] Puromycin dihydrochloride | CAS 58-58-2 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. [Internet]. [cited 2013 Aug 15]; Available from: <http://www.scbio.de/datasheet-108071.html>
- [240] Dudani a K, Gupta RS, Gupta R. Species-specific differences in the toxicity of puromycin towards cultured human and Chinese hamster cells. *FEBS letters* [Internet]. 1988 Jul 4;234(1):141–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391265>
- [241] Rosenwald IB, Pechet L, Han a, Lu L, Pihan G, Woda B, et al. Expression of translation initiation factors eIF-4E and eIF-2alpha and a potential physiologic role of continuous protein synthesis in human platelets. *Thrombosis and haemostasis* [Internet]. 2001 Jan;85(1):142–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204566>
- [242] Li Z, Yang F, Dunn S, Gross AK, Smyth SS. *NIH Public Access*. 2012;127(3):184–188.
- [243] Kirschenbaum L a, Aziz M, Astiz ME, Saha DC, Rackow EC. Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* [Internet]. 2000 May;161(5):1602–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806162>
- [244] Zarbock A, Singbartl K, Ley K. Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation. 2006;116(12):3211–3219.
- [245] Elzagallaai A, Rosé SD, Trifaró J, Rose SD. Platelet secretion induced by phorbol esters stimulation is mediated through phosphorylation of MARCKS : a MARCKS-derived peptide blocks MARCKS phosphorylation and serotonin release without affecting pleckstrin phosphorylation Platelet secretion induced b. 2013;:894–902.
- [246] Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* [Internet]. 2005 Aug 12 [cited 2013 Aug 13];122(3):379–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096058>
- [247] *Platelets* (Google eBook) [Internet]. Academic Press; 2012 [cited 2013 May 22]. Available from: <http://books.google.com/books?id=yF5WQdAcdfcC&pgis=1>
- [248] *Platelet Function: Assessment, Diagnosis, and Treatment* (Google eBook) [Internet]. Springer; 2007 [cited 2013 Aug 16]. Available from: <http://books.google.com/books?id=aN58X8dlbosC&pgis=1>
- [249] Schubert P, Devine D V. De novo protein synthesis in mature platelets: a consideration for transfusion medicine. *Vox sanguinis* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2013 Jun 2];99(2):112–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20345520>
- [250] Fujita T, Nolan GP, Liou HC, Scott ML, Baltimore D. The candidate proto-oncogene bcl-3 encodes a transcriptional coactivator that activates through NF-kappa B p50 homodimers. *Genes & Development* [Internet]. 1993 Jul 1 [cited 2013 Aug 19];7(7b):1354–1363. Available from: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.7.7b.1354>

- [251] Khurana. Textbook Of Medical Physiology [Internet]. Elsevier India; 2005 [cited 2013 Aug 19]. Available from: <http://books.google.com/books?id=M6vviWpZ0LsC&pgis=1>
- [252] Liou H, Scott ML. The bcl-3 Proto-Oncogene Encodes a Nuclear I κ B-Like Molecule That Preferentially Interacts with NF- κ B p50 and p52 in a Phosphorylation-Dependent Manner. 1993;13(6):3557–3566.
- [253] Bhakdi S, Weller U, Martin E, Jonas D, Palmer M. Mini review A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilization of cell membranes. 1993;:167–175.
- [254] Pinkney M, Beachey E, Kehoe M. not require a thiol group for cytolytic activity . The Thiol-Activated Toxin Streptolysin O Does Not Require Group for Cytolytic Activity. 1989;57(8).
- [255] Epps DE Van, Burton R. Relationship of Sulfhydryl Groups to Activity. 1971;
- [256] Biochemie [Internet]. Pearson Deutschland GmbH; 2008 [cited 2013 Aug 19]. Available from: <http://books.google.com/books?id=w2fSnIMwPfAC&pgis=1>
- [257] of Action Immunosuppressive Effect Results From Blockade of Signal Transduction and Inhibition of Cell Cycle Progression. 1998;31(5):335–340.
- [258] Pharmakologie und Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie [Internet]. Springer; 2012 [cited 2013 Aug 20]. Available from: <http://books.google.com/books?id=X8Ag6iow5RIC&pgis=1>
- [259] Medizin F. Durchflusszytometrie thrombozytärer Oberflächenantigene : Änderungen im Langzeitverlauf in einer Population gesunder Erwachsener. 2006;
- [260] No C. APPLICATIONS DIRECT B-D. 1807;(800).
- [261] Klinische Kardiologie: Krankheiten Des Herzens, Des Kreislaufs und Der Herznahen Gefäße : [Therapie Evidenzbasiert] (Google eBook) [Internet]. Springer DE; 2006 [cited 2013 Aug 22]. Available from: <http://books.google.com/books?id=k3hgYHzEF1MC&pgis=1>
- [262] Michelson a D, Barnard MR, Hechtman HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, et al. In vivo tracking of platelets: circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 1996 Oct 15;93(21):11877–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38152&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [263] Manuscript A. NIH Public Access. 2011;17(6):578–584.
- [264] Reid VL, Webster NR. Role of microparticles in sepsis. British journal of anaesthesia [Internet]. 2012 Oct [cited 2013 Aug 24];109(4):503–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952169>
- [265] Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. Journal of leukocyte biology [Internet]. 2008 Mar [cited 2013 Aug 22];83(3):536–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032692>
- [266] Platelets, Thrombosis and the Vessel Wall [Internet]. 2004 [cited 2013 Aug 27]. Available from: <http://www.google.de/books?id=Z0BhTpBQRtAC&pgis=1>
- [267] Barrett K. Characterization of the Interaction Between P-selectin Glycoprotein Ligand-1 and Ezrin/radixin/moesin [Internet]. ProQuest; 2008 [cited 2013 Aug 27]. Available from: http://books.google.com/books?id=S1SZ_aAGmUAC&pgis=1

- [268] Glue M, Adhesion AC. RGD Peptides.
- [269] Latger-Cannard V, Besson I, Doco-Lecompte T, Lecompte T. A standardized procedure for quantitation of CD11b on polymorphonuclear neutrophil by flow cytometry: potential application in infectious diseases. *Clinical and laboratory haematology* [Internet]. 2004 Jun;26(3):177–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163315>
- [270] Lynn WA, Raetz CRH, Qureshi N. LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED STIMULATION OF CD11b / CD18 EXPRESSION ON NEUTROPHILS Evidence of Specific Receptor-Based Response and Inhibition by Lipid A-Based. 1991;:3072–3079.
- [271] Zhou X, Gao X, Fan J, Liu Q, Anwar KN, Frey RS, et al. LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b / CD18 expression in neutrophils. 2005;:655–662.
- [272] Neumann J. *Immunbiologie: Eine Einführung* (Google eBook) [Internet]. Springer DE; 2008 [cited 2013 Aug 25]. Available from: <http://books.google.com/books?id=y9DkbLLu47YC&pgis=1>
- [273] *Die Infektiologie* [Internet]. Springer DE; 2004 [cited 2013 Aug 25]. Available from: <http://books.google.com/books?id=g3XnhMhq6ggC&pgis=1>
- [274] Bryant AE, Bayer CR, Chen RYZ, Guth PH, Wallace RJ, Stevens DL. Vascular dysfunction and ischemic destruction of tissue in *Streptococcus pyogenes* infection: the role of streptolysin O-induced platelet/neutrophil complexes. *The Journal of infectious diseases* [Internet]. 2005 Sep 15;192(6):1014–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16107954>
- [275] Nilsson M, Sørensen OE, Mörgelin M, Weineisen M, Sjöbring U, Herwald H. Activation of human polymorphonuclear neutrophils by streptolysin O from *Streptococcus pyogenes* leads to the release of proinflammatory mediators. 2006;(project 13413):982–990.
- [276] Moerer O, Burchardi H. [The cost of sepsis]. *Der Anaesthetist* [Internet]. 2006 Jun [cited 2013 Aug 29];55 Suppl 1:36–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16685555>
- [277] Wade S, Büsow M, Hanisch E. Epidemiologie von SIRS, Sepsis und septischem Schock bei chirurgischen Intensivpatienten. *Der Chirurg* [Internet]. 1998 Jun;69(6):648–655. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001040050470>

7. Anhang

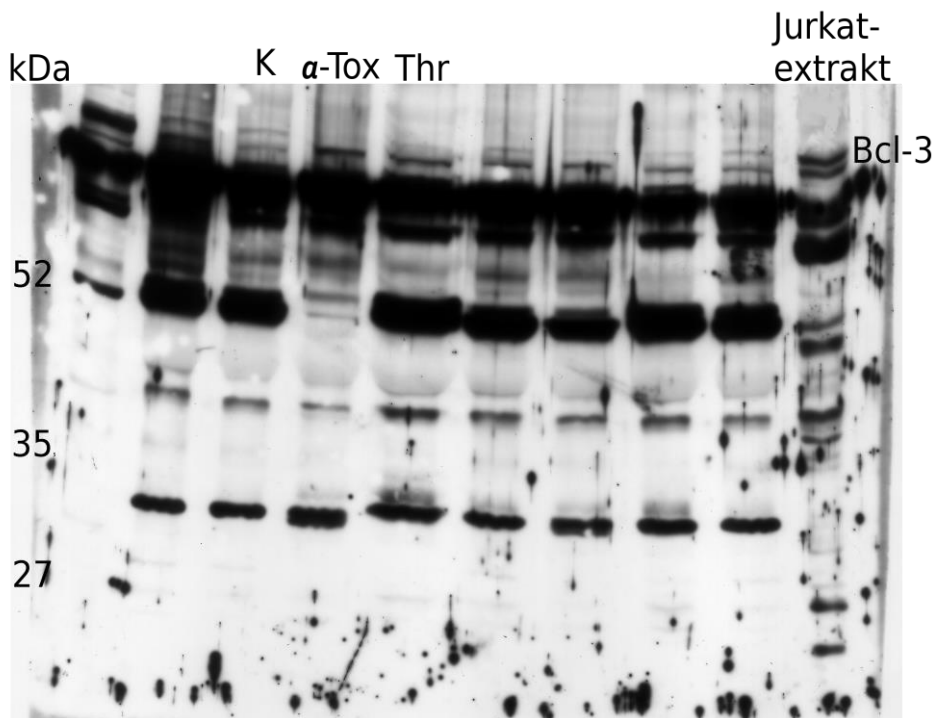


Abbildung 198 Bcl-3 Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen und Jurkat-Positivkontrolle

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 μ g/ml α -Toxin sowie 0,1 U/ml Thrombin für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. In der Tasche rechts wurde zum Vergleich die Bcl-3 Positivkontrolle aus Jurkat-Zellkernextrakt aufgetragen.

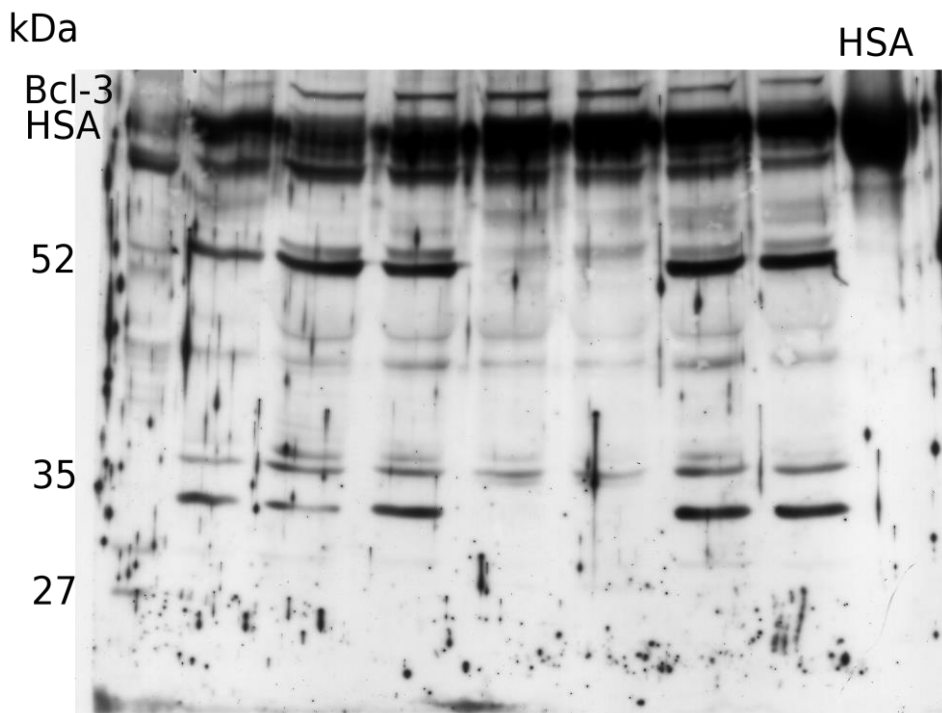


Abbildung 199 Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen und HSA-Kontrollprobe

Zu sehen sind mit bakteriellen Toxinen stimulierte Thrombozyten, die sowohl eine Bcl-3, als auch eine verschmierte HSA-Bande zeigen. In der rechten Tasche wurde nur HSA zum Vergleich aufgetragen.

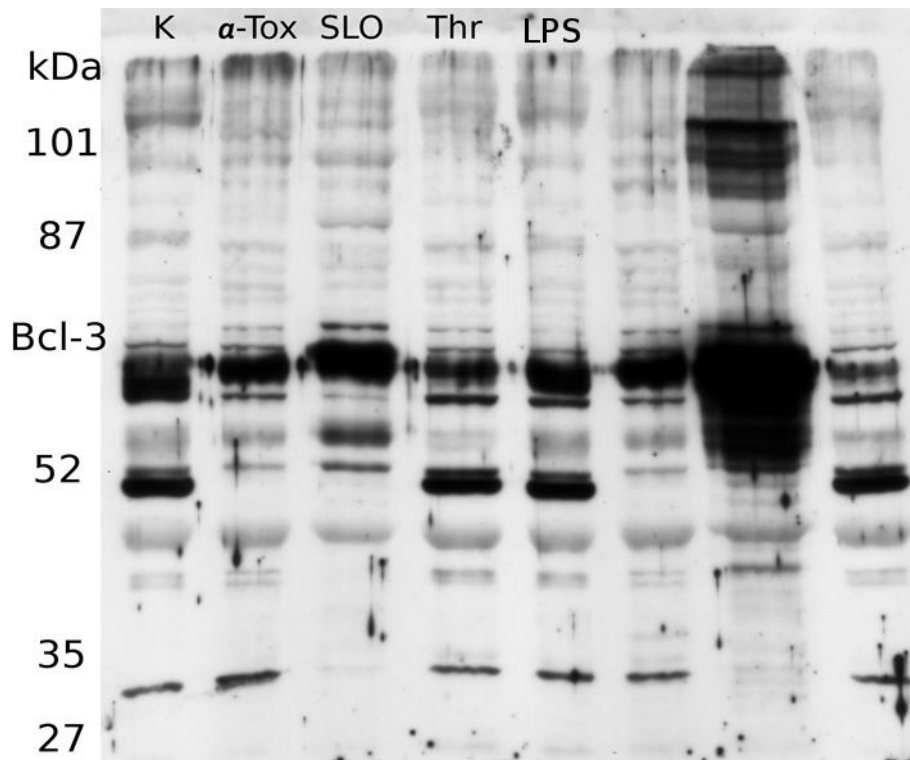
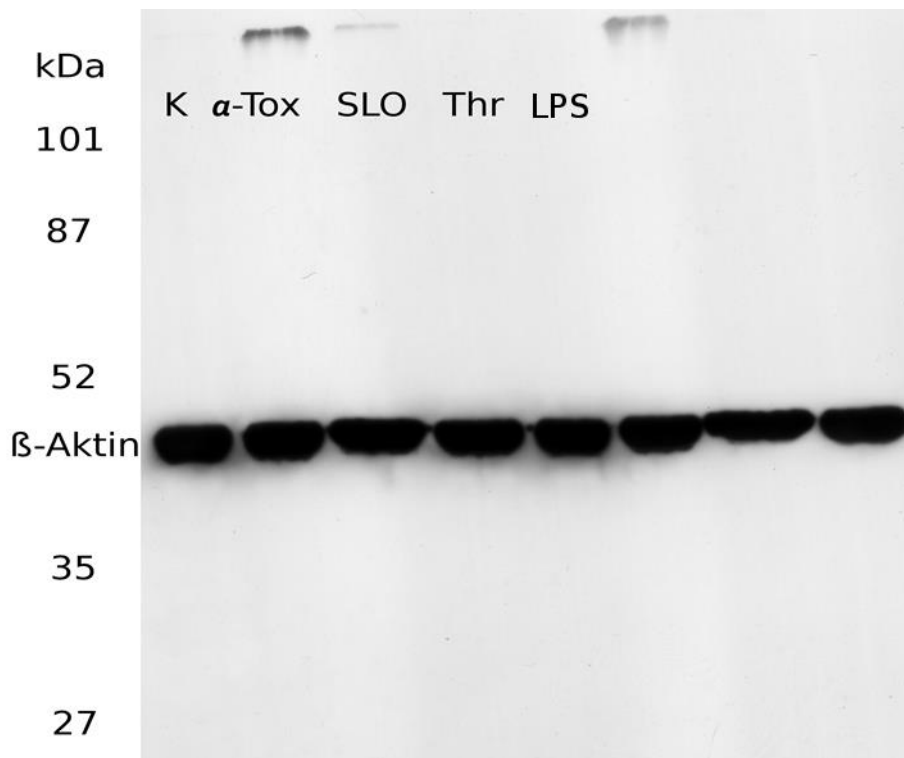


Abbildung 200 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten in Suspension mit Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 μ g/ml α -Toxin; 750 HU/ml SLO, 0,1 U/ml Thrombin sowie 0,1 μ g/ml LPS für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



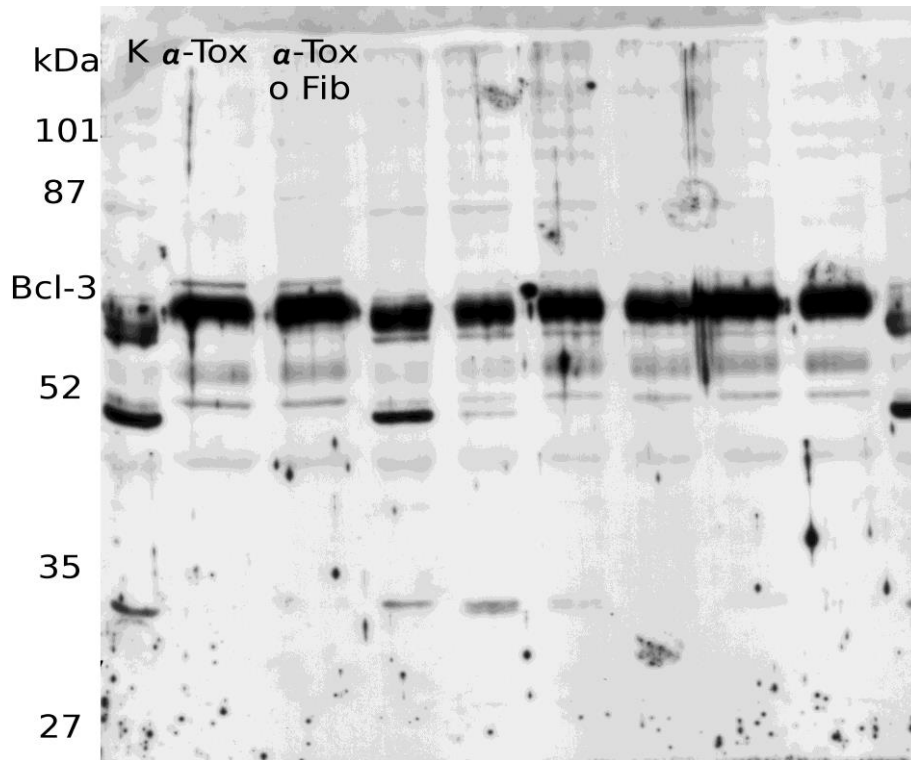
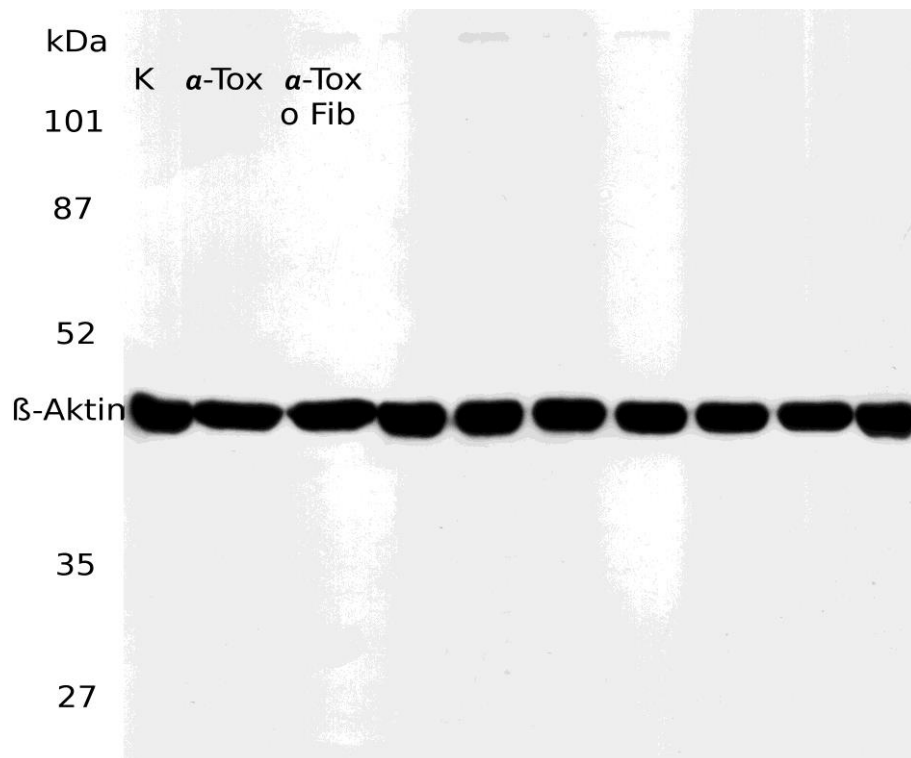


Abbildung 201 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von α -Toxin stimulierten Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen

Thrombozyten wurden mit 0,5 μ g/ml α -Toxin für vier Stunden in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen (o Fib) inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



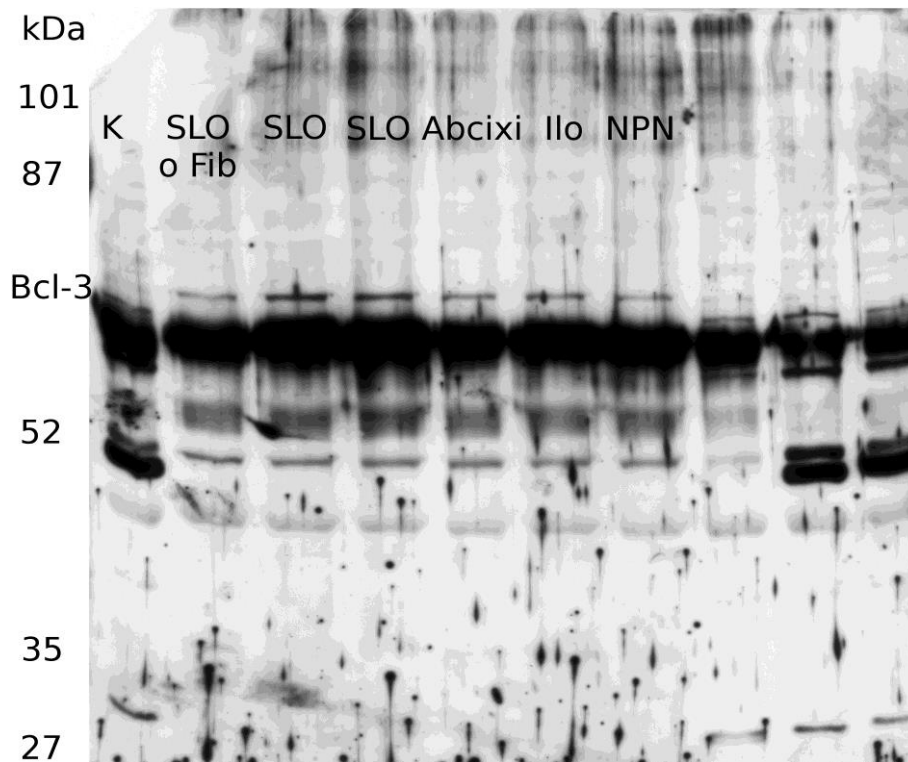
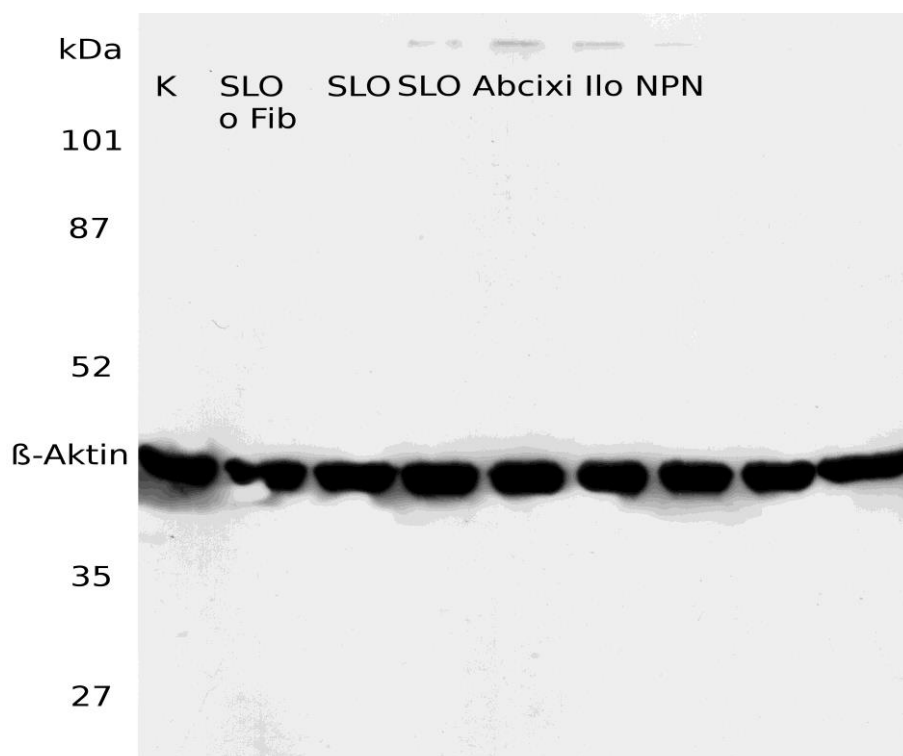


Abbildung 202 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von SLO stimulierten Thrombozyten in Suspension mit bzw. ohne Fibrinogen sowie unter Zugabe von Abciximab, Iloprost und NPN

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO ohne Zusatz von Fibrinogen (o Fib) bzw. mit Fibrinogen sowie unter Zugabe von 5 μ g/ml Abciximab (Abcixi), 50 ng/ml Iloprost (Ilo) bzw. 25 μ g/ml NPN für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



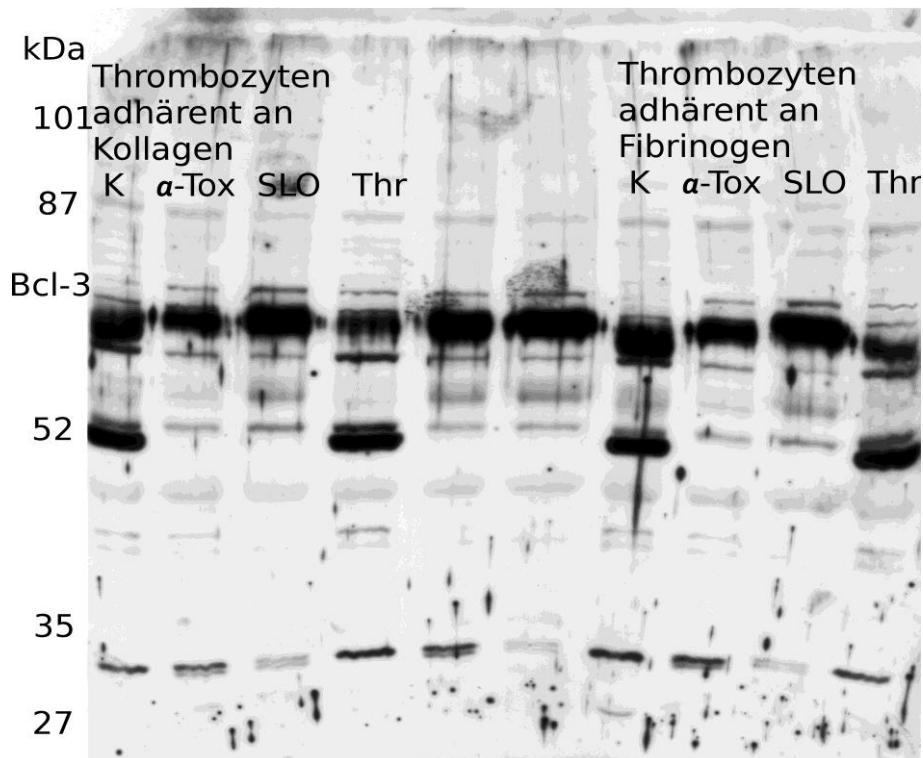
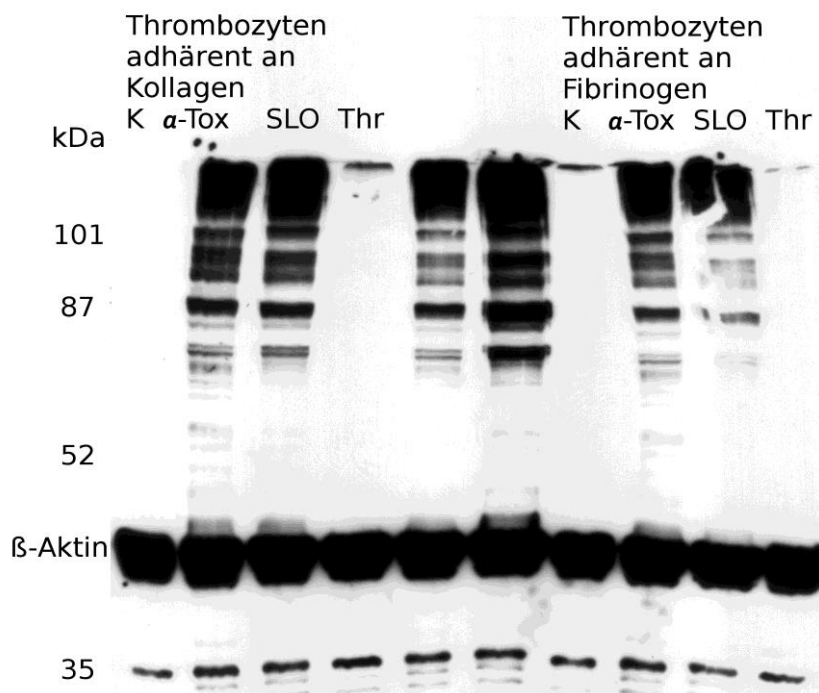


Abbildung 203 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von stimulierten Thrombozyten adhärenent an Kollagen und Fibrinogen

Thrombozyten wurden ohne Stimuli (K) bzw. mit 0,5 μ g/ml α -Toxin; 750 HU/ml SLO oder 0,1 U/ml Thrombin für vier Stunden auf Kollagen bzw. Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



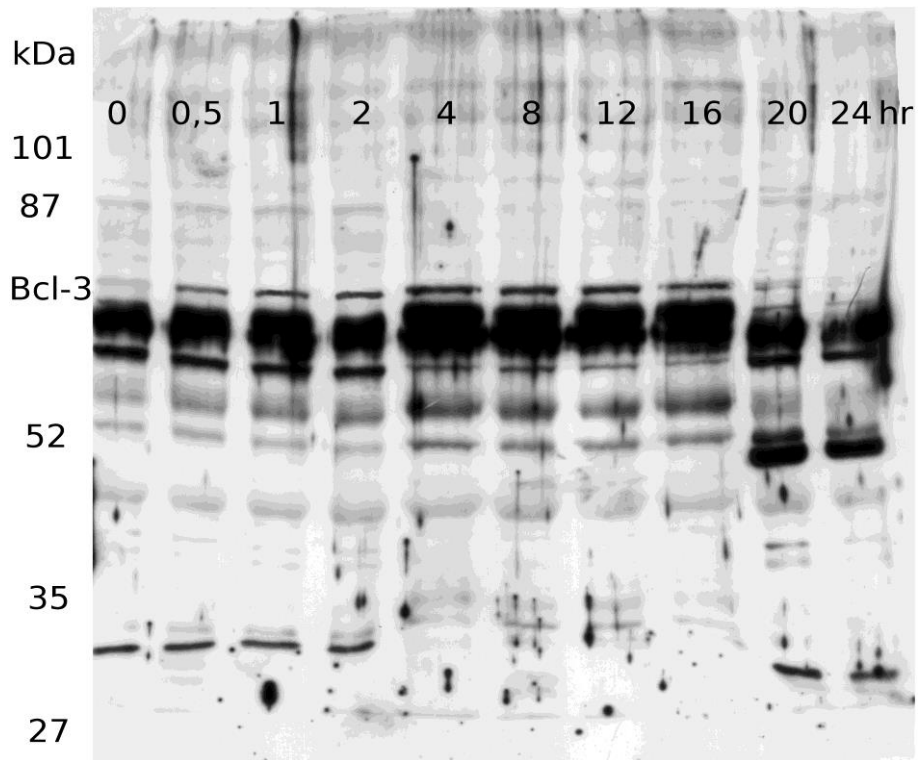
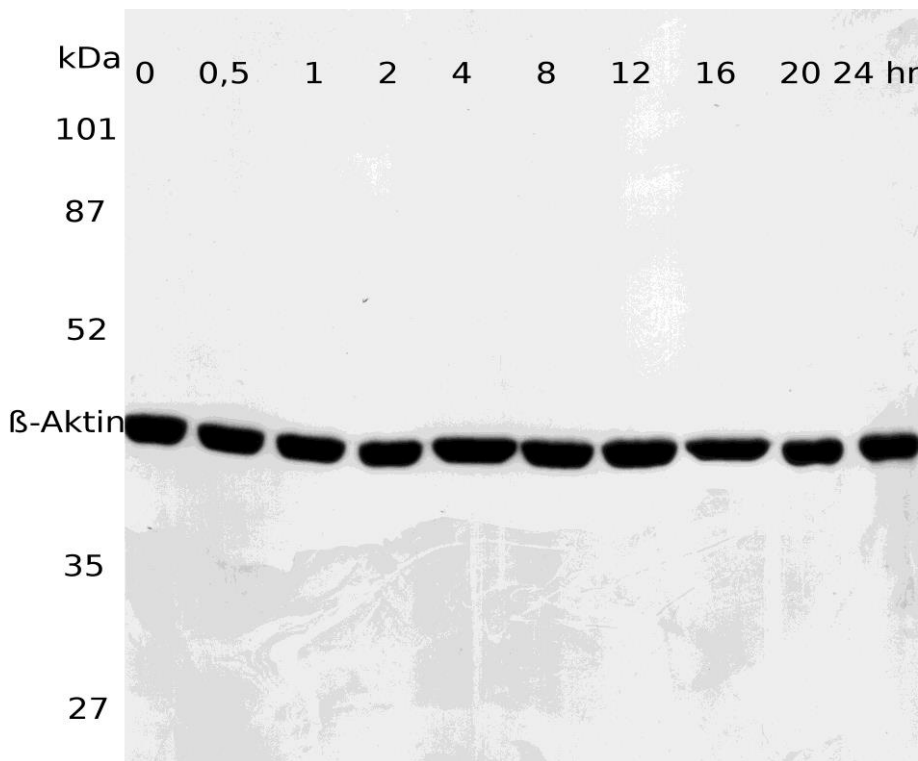


Abbildung 204 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO über 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO über einen Zeitraum von 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Nach verschiedenen Zeiträumen (in hr) wurde die Reaktion gestoppt. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



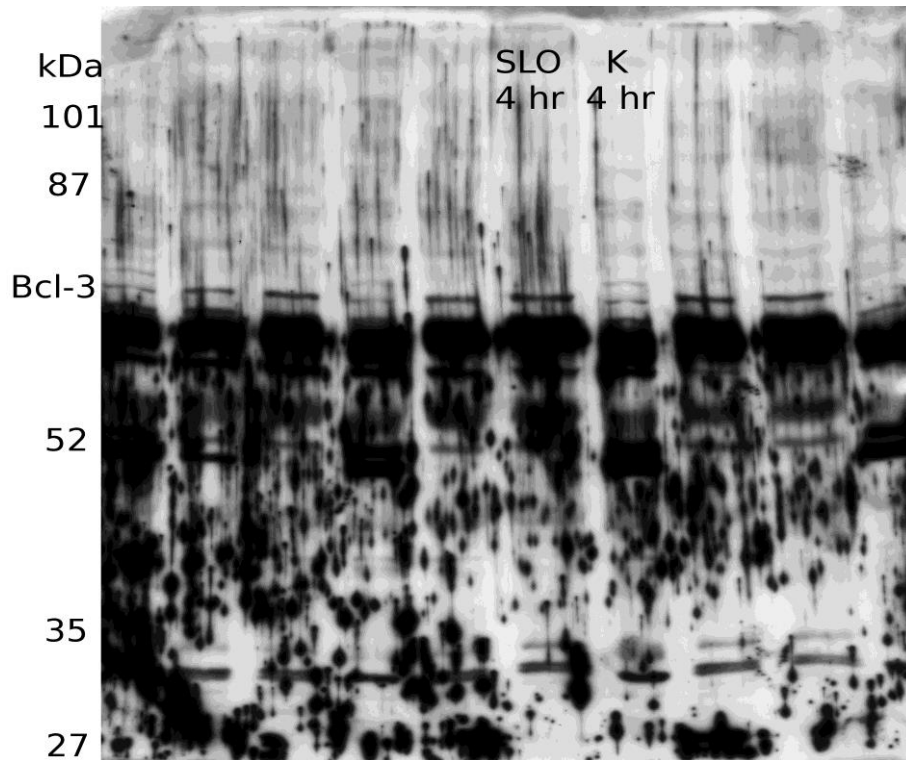
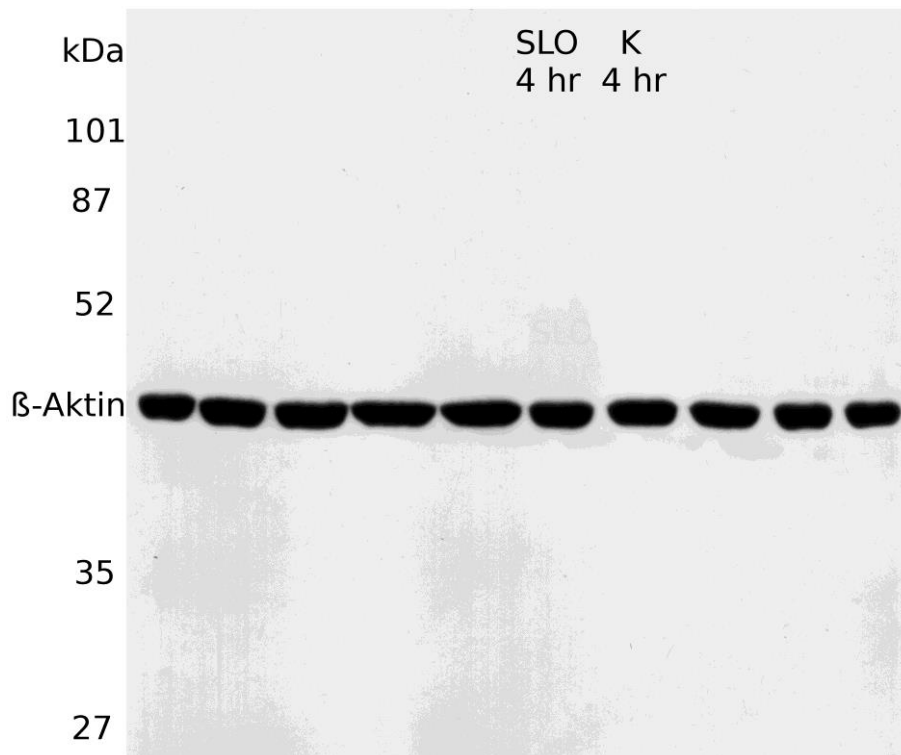


Abbildung 205 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO in Suspension mit Fibrinogen nach vier Stunden

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO bzw. ohne Stimuli (K) für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



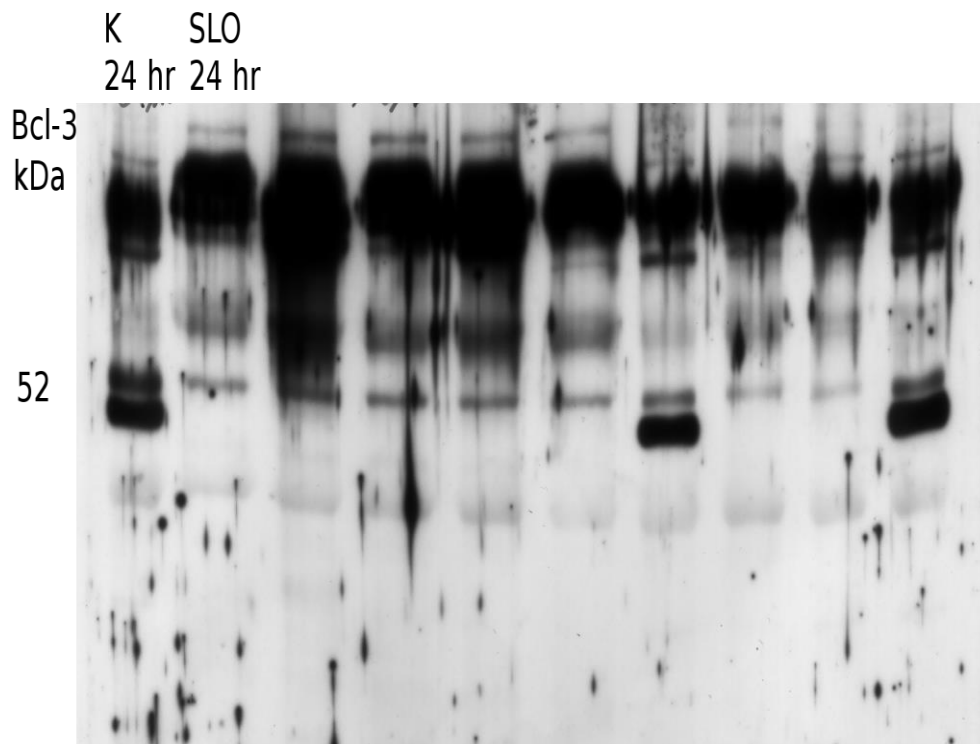
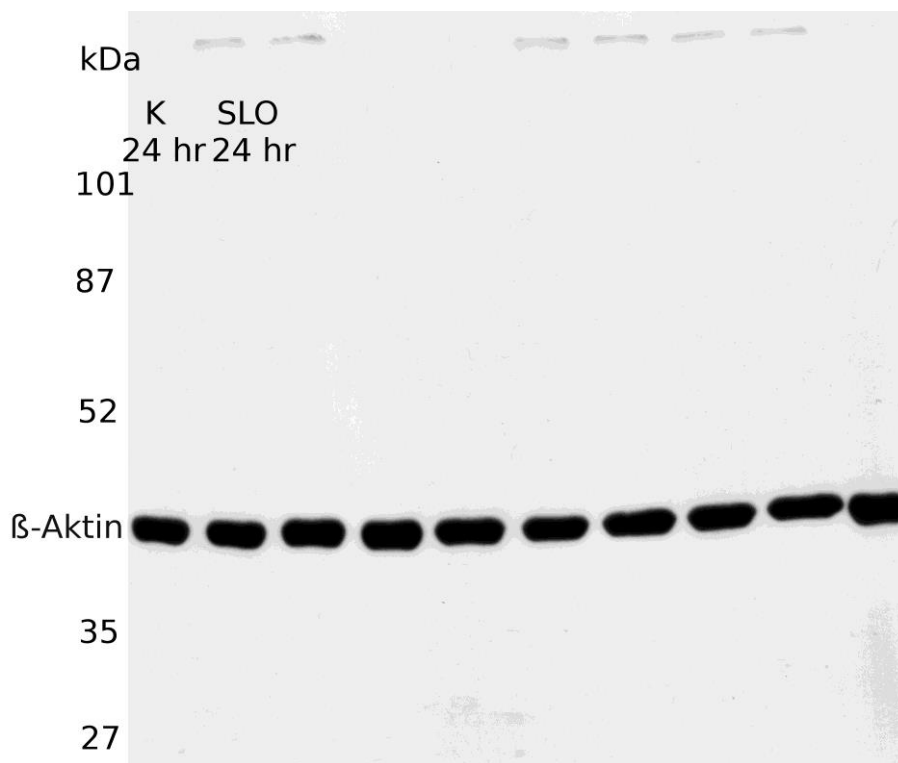


Abbildung 206 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit SLO in Suspension mit Fibrinogen nach 24 Stunden

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO bzw. ohne Stimuli (K) für 24 Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



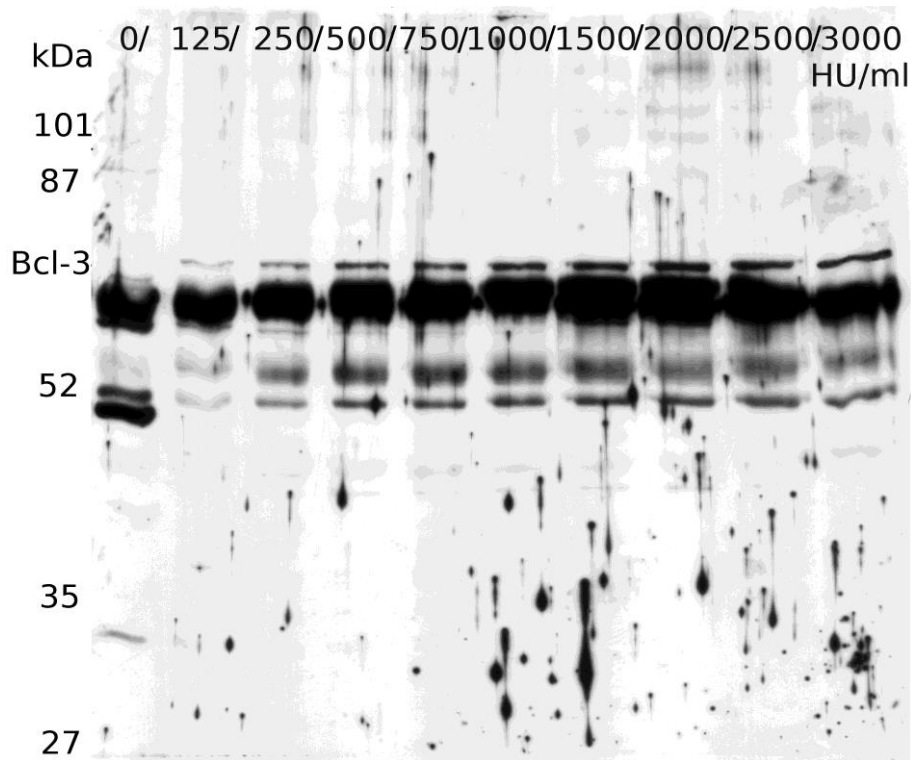
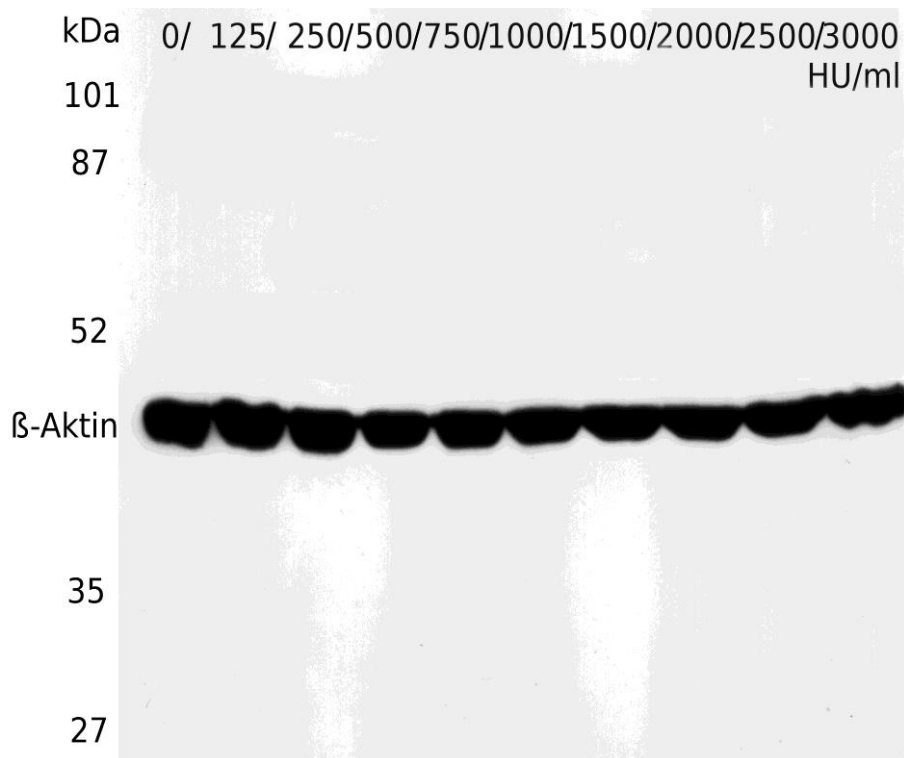


Abbildung 207 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen

Thrombozyten wurden mit steigenden SLO-Konzentrationen (in HU/ml) für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



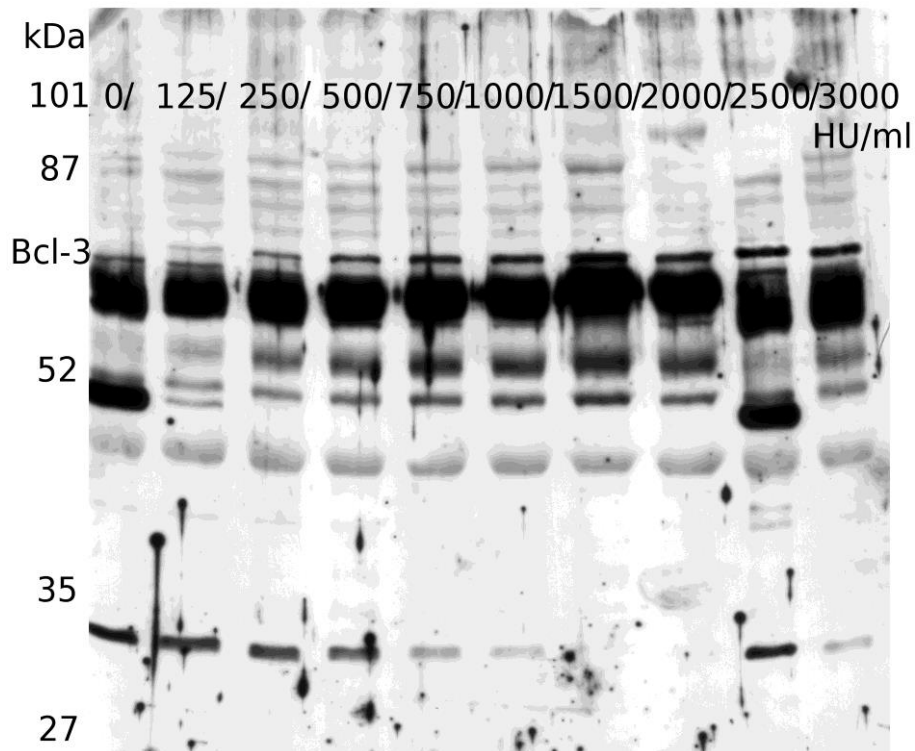
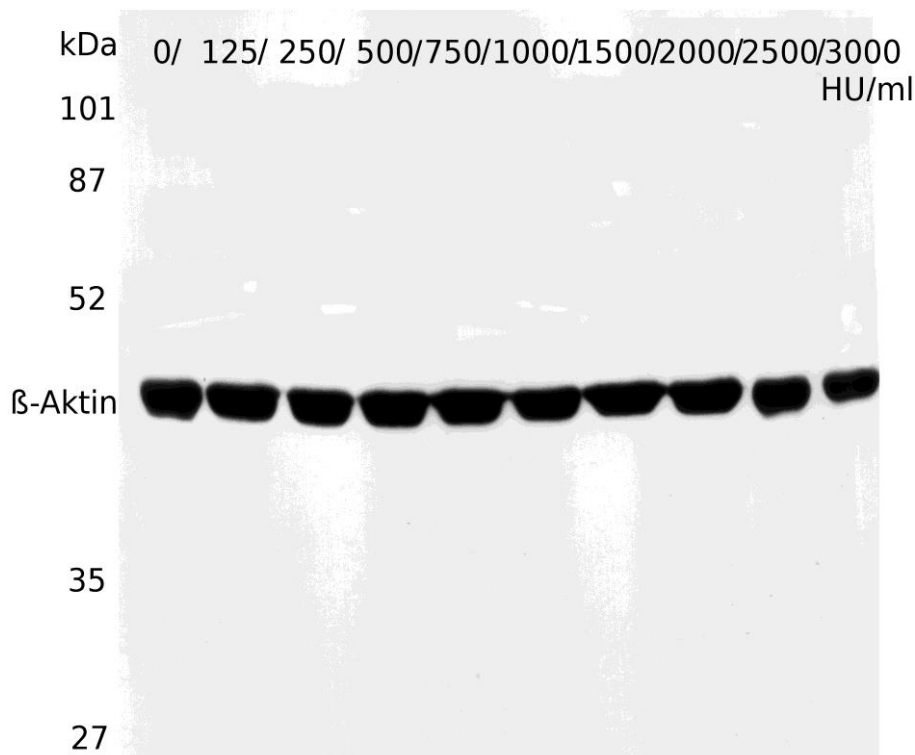


Abbildung 208 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten stimuliert mit steigenden SLO Konzentrationen unter Zusatz von Cystein

Thrombozyten wurden mit steigenden Konzentrationen (in HU/ml) von SLO mit Cysteinzusatz für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



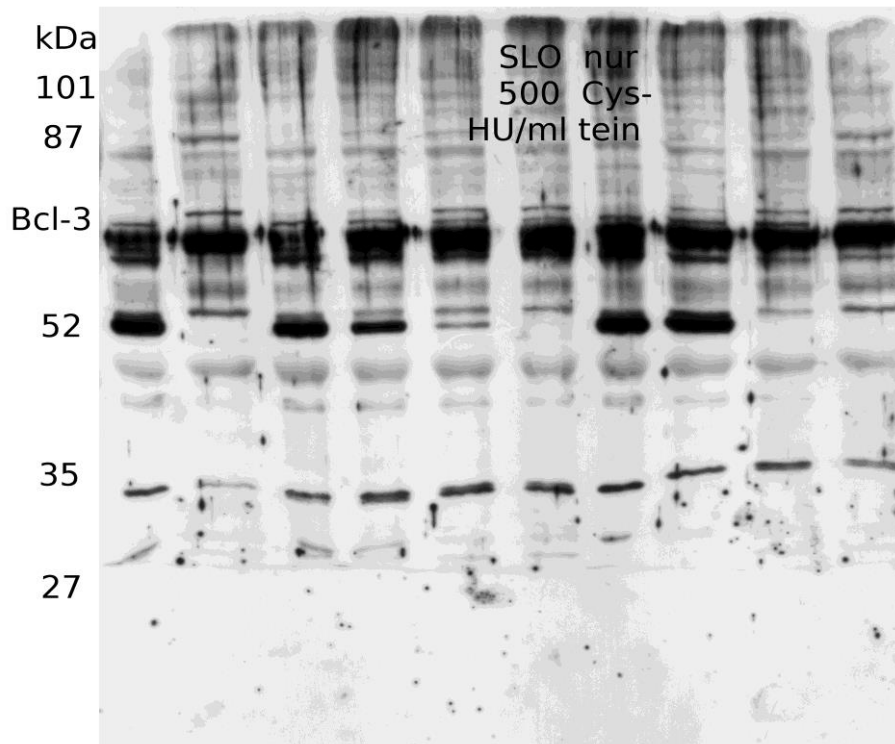
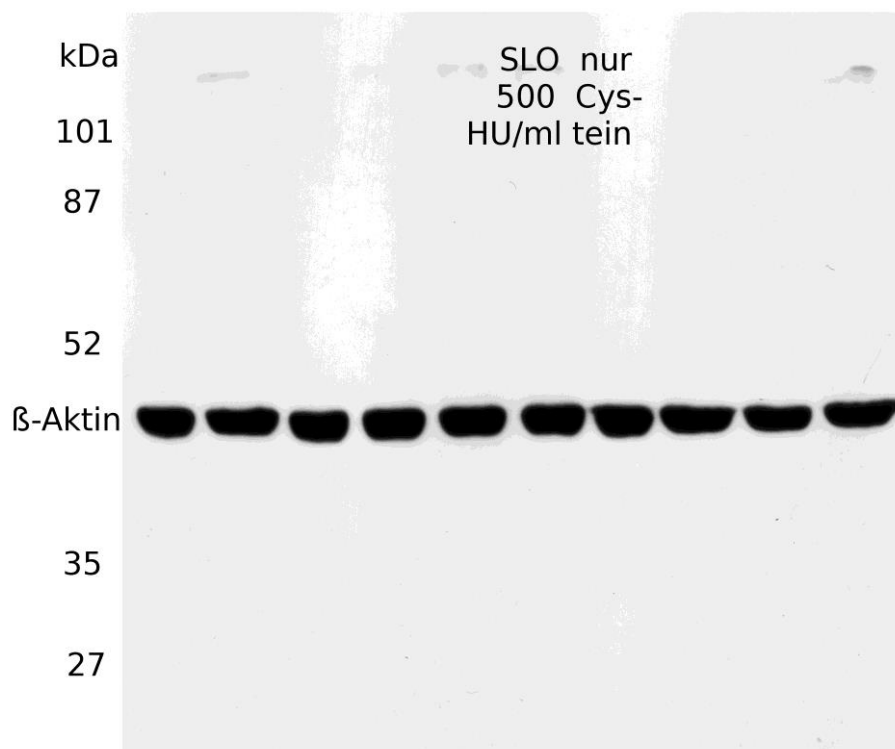


Abbildung 209 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten inkubiert mit 500 HU/ml SLO bzw. nur Cystein

Thrombozyten wurden mit 500 HU/ml SLO oder Cystein in jeweils entsprechender Menge für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



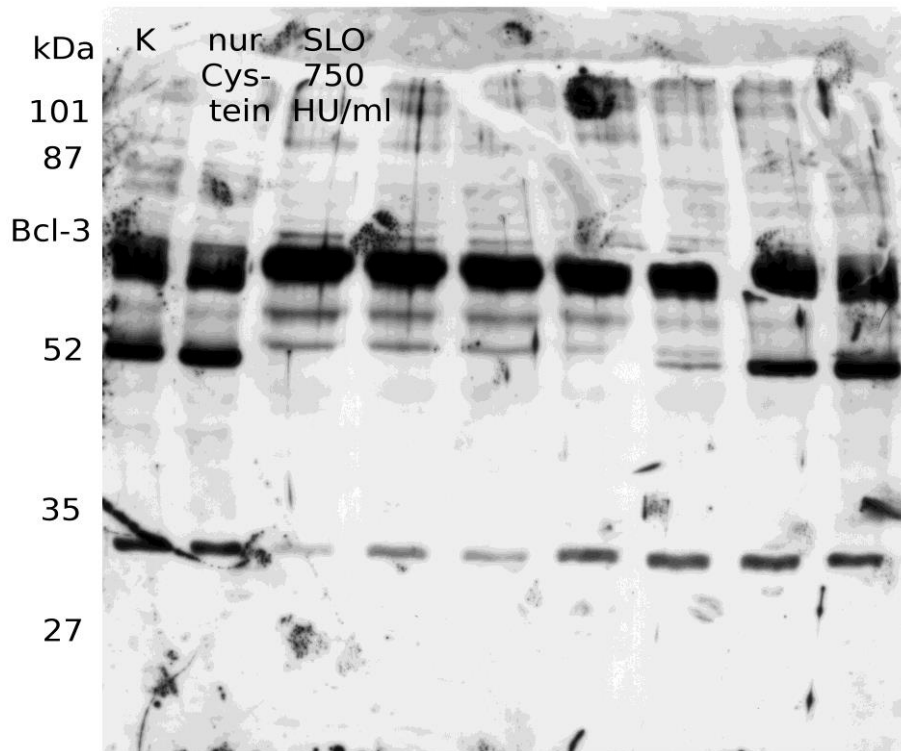
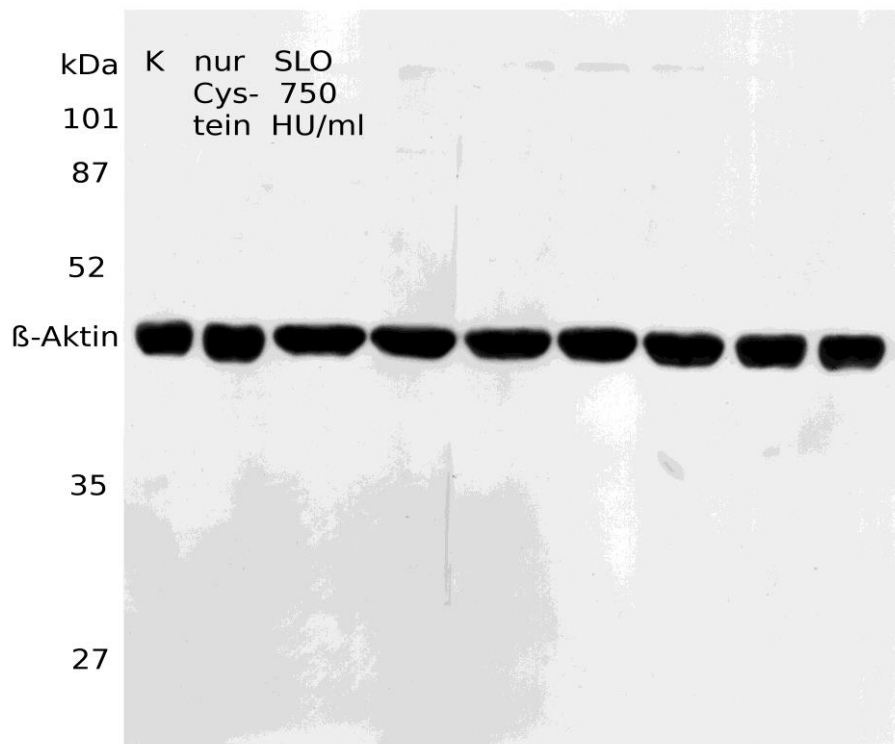


Abbildung 210 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten inkubiert mit 750 HU/ml SLO bzw. nur Cystein

Thrombozyten wurden mit 750 HU/ml SLO oder Cystein in jeweils entsprechender Menge für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



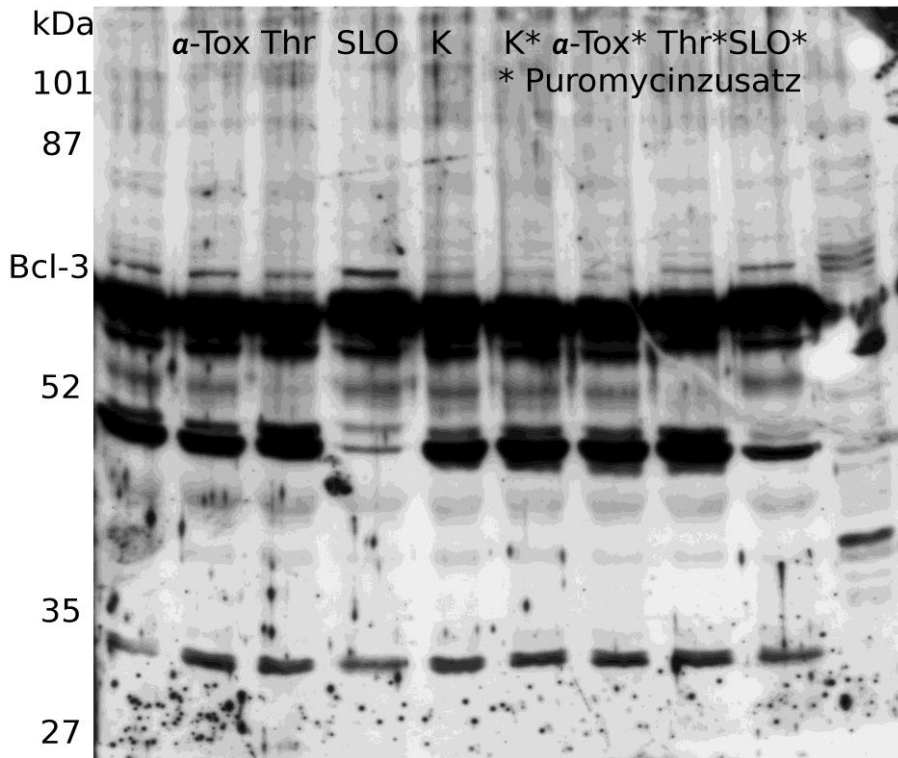
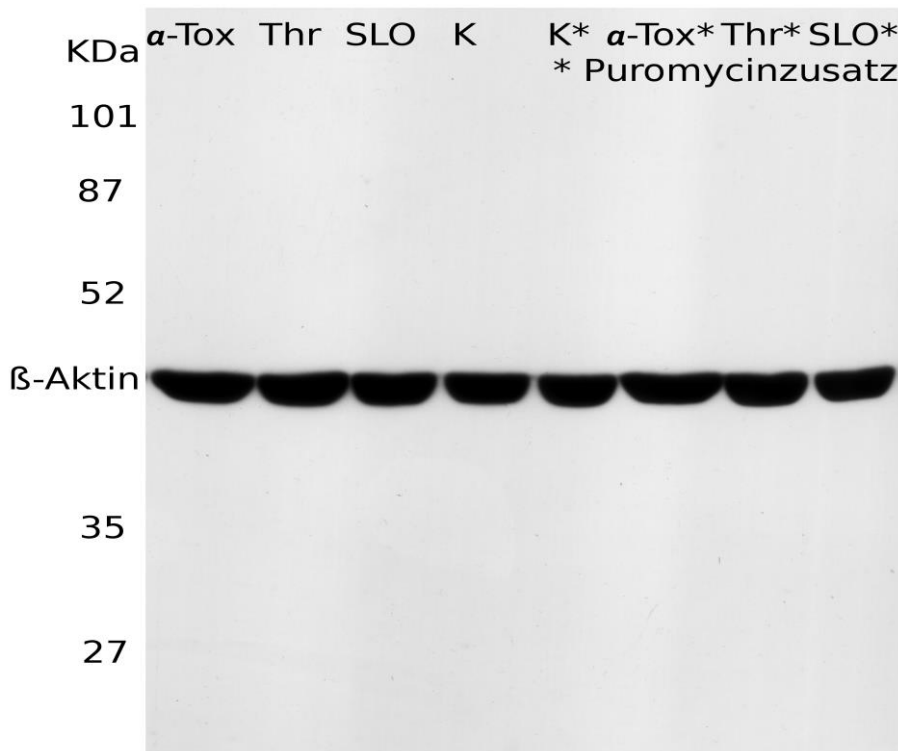


Abbildung 211 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten inhibiert mit Puromycin

Thrombozyten wurden mit bzw. ohne Zusatz von 1 mM Puromycin sowie ohne Stimuli (K), mit 0,5 μ g/ml α -Toxin; 0,1 U/ml Thrombin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.



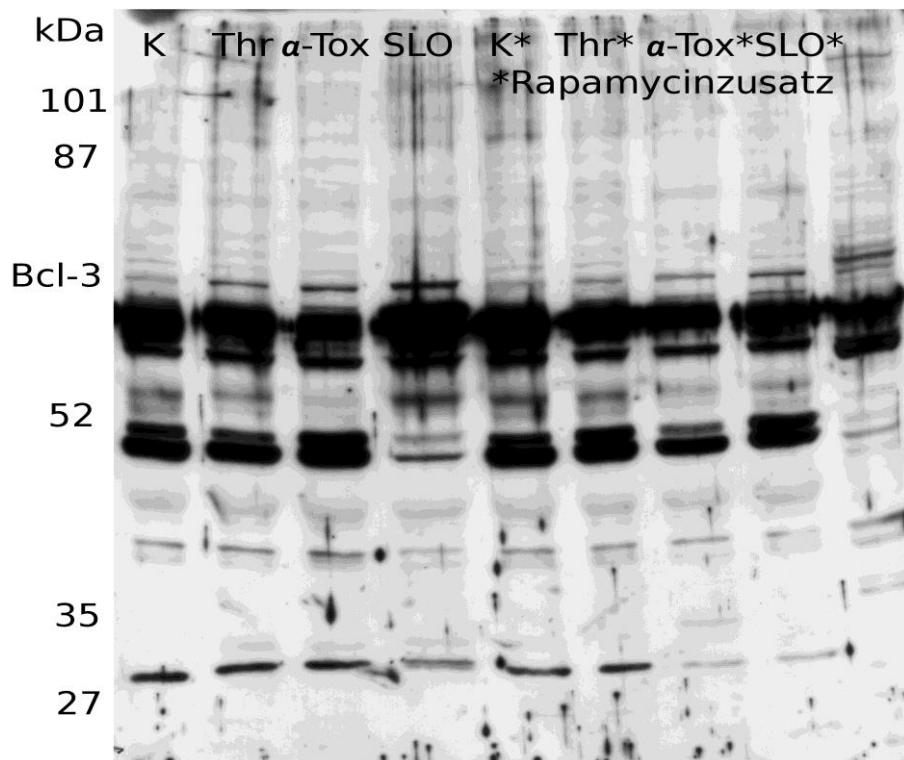
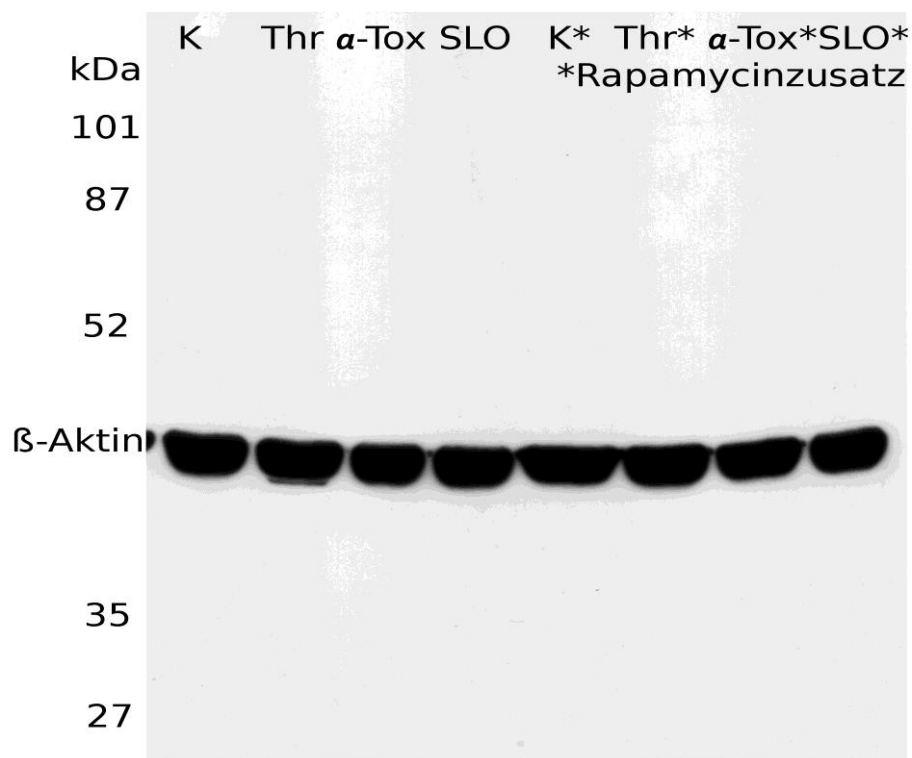


Abbildung 212 Bcl-3 und β -Aktin Western Blot von Thrombozyten inhibiert mit Rapamycin

Thrombozyten wurden mit bzw. ohne Zusatz von 1 mM Rapamycin sowie ohne Stimuli (K), mit 0,5 μ g/ml α -Toxin, 0,1 U/ml Thrombin oder 750 HU/ml SLO für vier Stunden in Suspension mit Fibrinogen inkubiert. Unten abgebildet ist der dazugehörige β -Aktin Blot.





Universitätsklinikum
Halle (Saale)

imebi

Institut für Medizinische
Epidemiologie, Biometrie
und Informatik

Direktor:
Prof. Dr. rer. nat. habil.
Johannes Haerting

www.medicin.uni-halle.de/imebi

BESCHEINIGUNG

zur Vorlage bei der Medizinischen Fakultät

Hiermit wird bescheinigt, dass eine statistische Beratung zur vorliegenden
Dissertation von Frau

Monika Erlenkamp

erfolgte. Die endgültige Arbeit wurde zur Einsichtnahme vorgelegt. Die an-
gewandten mathematischen/statistischen Methoden entsprechen den Fest-
legungen aus der Beratung und sind den in der Arbeit formulierten medizini-
schen Fragestellungen angemessen.

Halle (Saale), 9. Juli 2012

Dr. Susanne Unverzagt
- Statistischer Berater -

Bemerkungen: keine



Medizinische Fakultät der
Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Lebenslauf

Dipl. Pharm. Monika Erlenkamp geb. Otto

geb. am 11.06.1984
in Bad Frankenhausen

Schulischer Werdegang

08/95 - 06/03 Kyffhäuser-Gymnasium Bad Frankenhausen
08/91 - 06/95 Kyffhäuser-Grundschule Udersleben

Beruflicher Werdegang

seit 6/14 Apothekerin in der DocMorris Apotheke Düsseldorf
4/14 – 5/14 Apothekerin bei Medical Order Pharma Bochum
10/12 – 12/13 Apothekerin in der Krankenhausapotheke des Ameos Klinikum Bernburg

Akademischer Werdegang

04/09 - 3/12 Promotionsstudium an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Fachgebiet Pharmakologie
Thema: *Einfluss von Staphylococcus aureus α -Toxin, Streptococcus pyogenes Streptolysin-O und Escherichia coli Lipopolysaccharid auf die Funktion und Interaktion humaner Thrombozyten und neutrophiler Granulozyten*

02/09 Approbation als Apothekerin

01/08 - 06/08 Diplom im Fachbereich der Pharmazeutisch Medizinischen Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe für Wirkstoffentwicklung und –analytik von PD Dr. Hilgeroth
Thema: *Synthese von 1,2-Dihydropyridonen mit potentiell MDR-modulierender Wirkung*

10/03 - 02/09 Studium der Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationsliste

11/11 *Discovery of pyridine-2-ones as novel class of multidrug resistance (MDR) modulators: first structure-activity relationships; Krawczyk S, Otto M, Otto A, Coburger C, Krug M, Seifert M, Tell V, Molnár J, Hilgeroth A., Bioorg Med Chem. 2011 Nov 1; 19(21):6309-15.*

02/11 *Staphylococcus aureus α -Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets; Schubert S, Schwertz H, Weyrich AS, Franks ZG, Lindemann S, Otto M, Behr H, Loppnow H, Schlitt A, Russ M, Presek P, Werdan K, Buerke M. Toxins (Basel). 2011 Feb; 3(2):120-33.*

Postervorträge

10/09-11/11 verschiedene Vorträge und Poster wurden bei dem XVII. Kardiologisch-Hämostaseologischen Workshop in Solingen, dem Basic Science Meeting der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Düsseldorf, der American Heart Association/ Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology in Chicago, der 54. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung / Joint Meeting mit der Niederländischen Gesellschaft für Thrombose und Hämostase in Nürnberg sowie der Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft in Jena präsentiert

Preis 1. Platz Hans-Jürgen Bretschneider Posterpreis bei dem Basic Science Meeting der
10/11 Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung e.V. in Düsseldorf

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr.med. K. Werdan für die Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Klinik. Ganz besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Buerke, der mir das Thema dieser Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat, für seine umfangreiche und kontinuierliche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für die Bereitstellung der finanziellen und apparativen Mittel. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Hilgeroth bedanken, der die Betreuung am Institut für Pharmazie übernahm. Mein Dank gilt auch den zahlreichen Blutspendern und von diesen insbesondere meinem Ehemann, der bei „Blutknappheit“ immer eingesprungen ist und mich während dieser Zeit sowohl mental als auch technisch unterstützt hat. Ebenso möchte ich mich bei Dr. Sebastian Schubert bedanken, der immer ein offenes Ohr für mich hatte. Schließlich gebührt mein Dank auch meiner Familie, für Ihre andauernde Motivation und Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.

☺ **Danke an Euch alle!** ☺

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe. Es wurden keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die aus ihnen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde ausschließlich der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt und an keiner anderen Universität oder Hochschule weder im In- und Ausland zur Erlangung des Doktorgrades eingereicht.

Es liegen keinerlei Vorstrafen bzw. Ermittlungsverfahren gegen mich vor.

Düsseldorf, den 16.7.2014

Monika Erenkamp

