

# Untersuchungen zur Interaktion von *Staphylococcus aureus* mit Thrombozyten und Endothelzellen

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel



vorgelegt von

Silke Niemann

Kiel, 2007

Referent/in: .....

Koreferent/in: .....

Tag der mündlichen Prüfung: .....

Zum Druck genehmigt: Kiel, .....

Der Dekan

Für meine Eltern

## Teile der Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht:

### Originalarbeiten:

- Heilmann,C., Niemann,S., Sinha,B., Herrmann,M., Kehrel,B.E., & Peters,G. (2004). Staphylococcus aureus fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *Journal of Infectious Diseases*, 190(2), 321-329.
- Niemann,S., Spehr,N., Van Aken,H., Morgenstern,E., Peters,G., Herrmann,M., & Kehrel,B.E. (2004). Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets. *Circulation*, 110(2), 193-200.
- Rennemeier, C., Hammerschmidt, S., Niemann, S., Inamura, S., Zähringer, U. & Kehrel B.E. (2007). Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of Gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *The FASEB Journal*, 21(12), 3118-3132.

### Abstracts:

- Engelbert, S., Köhler,N., Van Aken,H., Morgenstern,E., Peters,G., Herrmann,M., & Kehrel,B.E. (2002) Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets. *Annals of Hematology*, 81 (Suppl. 1), A15.
- Niemann,S., Hartleib,J., Heilmann,C., Sinha,B., Hussain,M., Van Aken,H., Peters,G., & Kehrel,B. (2004). Thrombospondin-1 mediates Staphylococcus aureus binding via protein A, Clumping factor A and B and fibronectin-binding protein A, but not via fibrinectin-binding protein B, Eap and coagulase. *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 165.
- Niemann,S., Kehrel,B.E., Heilmann,C., Rennemeier,C., & Hammerschmidt,S. (2006). Soluble fibrin is a major mediator of Streptococcus pneumoniae adhesion to platelets. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 144.
- Niemann,S., Hartleib,J., Schafers,S., Brodde,M.F., Heilmann,C., Spehr,N., Sinha,B., Hussain,M., Herrmann,M., Van Aken,H., Peters,G., & Kehrel,B.E. (2006). The major Staphylococcus aureus MSCRAMMs are promiscuous and bind fibrinogen, von Willebrand factor, as well as thrombospondin-1. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 148-149.
- Niemann,S., Heilmann,C., Peters,G., Van Aken,H., & Kehrel,B.E. (2006). Activated platelets enhance the adherence to and the invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 141-142.
- Rennemeier,C., Niemann,S., Zaehring,U., Hammerschmidt,S., & Kehrel,B.E. (2006). Thrombospondin-1 mediates adherence of Streptococcus pneumoniae to host cells via recognition of the peptidoglycan backbone. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, 149-150.

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	aqua destillata
ATIII	Antithrombin III
BCA	„bicin chonic acid“ (Bicinchinon-Säure)
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
CD	„cluster of differentiation“
CGSE	Puffer, der Natriumcitrat, Glukose, Natriumchlorid und EDTA (Citrato-Glycose-Sodium-EDTA) enthält
Clf	Clumping factor
Da	Dalton
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	Dithioerythritol
DTS	„dense tubular system“ (elektronendichtes tubuläres System)
Eap	„Extracellular adherence protein“ (extrazelluläres Adhärenz Protein)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	„epithel growth factor“ (epithelialer Wachstumsfaktor)
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“ (Enzym-gekoppelter Immunfluoreszenz-Test)
EM	Elektronenmikroskopie
FA	Formaldehyd
FACS	„fluorescence-activated cell sorter“ (Durchflusszytometer)
FCS	„fetal calf serum“ (Fötale Kälberserum)
Fg	Fibrinogen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fn	Fibronectin
FnBP	„Fibronectin binding protein“ (Fibronectin bindendes Protein)
FSC	„forward scatter“ (Vorwärtsstreulicht)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )

gelf.	gelfiltriert
GP	Glycoproteine
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
HBMEC	„human brain-derived microvascular endothelial cells“ (humane Hirnendothelzellen)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIT	Heparin-induzierte-Thrombozytopenie
HMEC	„human microvascular endothelial cells“ (menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen)
IAA	Iodacetamid
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunglobulin
Kap.	Kapitel
kDa	kilo Dalton
k.o.	knock out
LIBS	„ligand-induced binding site“
log	logarithmisch(e)
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
m.	monoklonal
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
n	Anzahl des Messwerte
n.s.	nicht signifikant
OCS	„open canalicular system“ (offenes Kanalsystem)
OD	optische Dichte
p	Signifikanzmaß
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PBS	„phosphat buffered saline“ (Phosphat gepufferte Natriumchloridlösung)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PE	R-Phycoerythrin
PGE-1	Prostaglandin E1
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

---

PPP	„platelet poor plasma“ (Plättchenarmes Plasma)
PRP	„platelet rich plasma“ (Plättchenreiches Plasma)
RT	Raumtemperatur
SAK	Staphylokinase
s	Sekunde
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SDS	„sodium dodecyl sulfate“ (Natriumdodecylsulfat)
SK	Streptokinase
SPA	Protein A
SSC	„side scatter“ (Seitwärtsstreulicht)
TBS	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan gepufferte Natriumchloridlösung (“Tris buffered saline”)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TF	„tissue factor“ (Gewebsfaktor)
TFPI	„tissue factor pathway inhibitor“ (Inhibitor des Gewebsfaktor Reaktionswegs)
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
t-PA	gewebsabhängiger Plasminogen Aktivator (tissuetype plasminogen activator)
TRAP	Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-amminomethan
TSP-1	Thrombospondin-1
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
Tz	Thrombozyten
U	„unit“ (Einheit)
u-PA	Urokinase Plasminogen Aktivator
vWF	von Willebrand Faktor





2. Material und Methoden.....	30
2.1 Chemikalien.....	30
2.2 Geräte.....	30
2.3 Verwendete Antikörper.....	32
2.4 Verwendete Bakterienstämme.....	32
2.5 Anzucht und Präparation der Bakterien.....	33
2.5.1 Anzucht der Bakterien.....	33
2.5.2 Bestimmung der Bakterienzahl.....	34
2.6 Durchflusszytometrie.....	35
2.7 Bindung von plasmatischen Adhäsionsproteinen an <i>S. aureus</i> .....	39
2.8 Präparation der Thrombozyten.....	41
2.8.1. Plättchenisolierung durch Zentrifugation.....	41
2.8.2 Erstellung von Plättchen-armen Plasma.....	42
2.8.3 Abtrennung der Thrombozyten von Plasmaproteinen mittels Gelfiltration.....	42
2.8.4 Bestimmung der Thrombozytenkonzentration.....	42
2.9 Bakterien-Plättchen-Assoziation.....	42
2.9.1 Markierung der Bakterien mit Syto 13.....	43
2.9.2 Markierung der Thrombozyten zur Bestimmung der Bakterien- Plättchen-Assoziation.....	43
2.9.3 Koinkubation der Thrombozyten mit Bakterien.....	43
2.9.4 Durchflusszytometrische Ermittlung der Bakterien-Plättchen- Assoziate.....	44
2.10 Zellensortierung.....	44
2.11 In vitro-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	45
2.11.1 Thrombin.....	45
2.11.2 ADP.....	46
2.11.3 Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid (TRAP) .....	46
2.11.4 Hemmung von Thrombin durch Hirudin.....	47
2.12 Spaltung von Fibrinogen durch Ancrod.....	47
2.13 Aggregometrie.....	48
2.14 Detektion der Plättchenaktivierung.....	49
2.14.1 Fibrinogenbindung.....	49

2.14.2 $\alpha$ -Granula Sekretion (CD62P-Expression).....	50
2.15. Aktivierung von Thrombozyten durch <i>S. aureus</i> .....	50
2.16 Immunisierung von Kaninchen mit Staphylokinase.....	51
2.17 <i>S. aureus</i> und Endothelzellen.....	52
2.17.1 Kultivierung von HMEC-1 und HBMEC .....	52
2.17.2 Vorbereitung der Bakterien für die Inkubation mit Endothelzellen....	53
2.17.3 Inkubation der Endothelzellen mit <i>S. aureus</i> .....	54
2.17.4 Bestimmung der in die Endothelzellen invadierten <i>S. aureus</i> ....	54
2.17.5 Infektion von Endothelzellen mit <i>S. aureus</i> mit anschließender Doppelimmunfluoreszenzfärbung.....	55
2.17.6 Einfluss von Fibrinogen, Fibrin und TSP-1 auf die Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen.....	56
2.17.7 Einfluss von Thrombozyten auf die Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen.....	57
2.18 Aufreinigung von TSP-1.....	57
2.19 vWF-Aufreinigung aus Haemate <sup>®</sup> HS 500.....	60
2.20 Bestimmungen der Proteinkonzentrationen von Lösungen.....	61
2.21 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung.....	61
2.21.1 Elektrophorese.....	62
2.21.2 Silberfärbung.....	65
2.22 Markierung von Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC).....	66
2.23 Statistische Auswertung der experimentellen Daten.....	67
3. Ergebnisse.....	68
3.1 Die Bindung von plasmatischen Adhäsionsproteinen an <i>S. aureus</i> .....	68
3.1.1 Bindung von Fibrinogen an <i>S. aureus</i> .....	68
3.1.2 Bindung von TSP-1 an <i>S. aureus</i> .....	68
3.1.3 Bindung von Fibronectin an <i>S. aureus</i> .....	70
3.1.4 Bindung von vWF an <i>S. aureus</i> .....	71

3.1.5 Konkurrenz von Fibrinogen, TSP-1 und vWF um die Bindung an <i>S. aureus</i> .....	71
3.1.6 Bindung von Fibrinogen und vWF an mit Proteinase K behandelte <i>S. aureus</i> .....	72
3.2 Bindung von <i>S. aureus</i> an Thrombozyten.....	73
3.2.1 Einfluss des Aktivierungszustands der Plättchen auf die Assoziation mit <i>S. aureus</i> .....	74
3.2.2 Einfluss von Plasmaproteinen auf die Assoziation von <i>S. aureus</i> und Plättchen.....	75
3.2.2.1 Bindung von <i>S. aureus</i> an gelfiltrierte Plättchen.....	75
3.2.2.2 Einfluß von humanem Albumin auf die <i>S. aureus</i> -Plättchen- Assoziation.....	76
3.2.2.3 Bedeutung von Fibrinogen für die <i>S. aureus</i> -Plättchen- Assoziation.....	77
3.2.2.4 Bedeutung von löslichem Fibrin für die <i>S. aureus</i> -Plättchen- Assoziation.....	78
3.2.2.5 Einfluss der Konzentration des zugesetzten Fibrinogens.....	79
3.2.2.6 Vernetzung des durch Ancrod gebildeten Fibrins durch Faktor XIII.....	81
3.2.2.7 Bedeutung von Thrombospondin-1 für die <i>S. aureus</i> - Plättchen-Assoziation.....	82
3.2.2.8 Einfluss von Fibronektin auf die <i>S. aureus</i> -Plättchen- Assoziation.....	83
3.2.3 Assoziatbildung von unterschiedlichen <i>S. aureus</i> Wildtyp-Stämmen mit Thrombozyten.....	84
3.2.4 Einfluss der Bakterienwachstumsphase auf die Assoziation.....	85
3.3 Aggregation von Thrombozyten nach Fibrinbildung und <i>S. aureus</i> Zusatz.	86
3.4 Bindung von Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronektin an genetisch veränderte <i>S. aureus</i> Stämme.....	88
3.4.1 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von Fibrinogen.....	88
3.4.1.1 Bindung von Fibrinogen an Clumping factor (Clf) B und ClfA/ClfB defiziente <i>S. aureus</i> Stämme.....	88

3.4.1.2 Bindung von Fibrinogen an <i>S. carnosus</i> Stämme, welche das Fibronektinbindeprotein A (FnBPA) bzw. das Fibronektinbindeprotein B (FnBPB) produzieren.....	89
3.4.1.3 Bindung von Fibrinogen an Eap defiziente <i>S. aureus</i> Mutante.....	90
3.4.2 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von TSP-1	91
3.4.2.1 Bindung von TSP-1 an <i>S. aureus</i> Protein A defiziente Mutanten.....	91
3.4.2.2 Bindung von TSP-1 an Clumping factor A, B und A/B defiziente Mutanten.....	92
3.4.2.3 Bindung von TSP-1 an FnBP produzierende <i>S. carnosus</i> Stämme.....	93
3.4.2.4 Bindung von TSP-1 an Koagulase und Eap defiziente Mutanten von <i>S. aureus</i> .....	94
3.4.3 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von von Willebrand Faktor (vWF).....	95
3.4.3.1 Bindung von vWF an Clumping factor A, B und A/B defiziente Mutanten.....	95
3.4.3.2 Bindung von vWF an FnBP produzierende <i>S. carnosus</i> Stämme.....	96
3.4.3.3 Bindung von vWF an <i>S. aureus</i> Koagulase-Deletionsmutanten.....	97
3.4.3.4 Bindung von vWF an <i>S. aureus</i> Eap-Deletionsmutanten.....	97
3.4.4 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von Fibronektin.....	98
3.4.4.1 Bindung von Fibronektin an <i>S. aureus</i> Protein A-Deletionsmutanten.....	98
3.4.4.2 Bindung von Fibronektin an <i>S. aureus</i> Clumping factor A, B und A/B Deletionsmutanten.....	99
3.4.4.3 Bindung von Fibronektin an FnBP produzierende <i>S. carnosus</i> Stämme.....	100
3.5 Bindung von genetisch veränderten <i>S. aureus</i> bzw. <i>S. carnosus</i> an Plättchen.....	100

3.5.1 Rolle von Protein A bei der Thrombozyten- <i>S. aureus</i> -Assoziation.....	101
3.5.2 Rolle von ClfA bei der Thrombozyten- <i>S. aureus</i> -Assoziation.....	102
3.5.3 Rolle von FnBPA und FnBPB bei der Thrombozyten- <i>S. aureus</i> -Assoziation.....	104
3.6 Auslösung der Plättchenaggregation durch einen <i>S. carnosus</i> Stamm, in dem das Gen, dass FnBPA codiert, heterolog exprimiert wurde.....	108
3.7 Assoziation von Plättchen mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	109
3.8 Die Rolle von Syndecan-1 und Syndecan-4 bei <i>S. aureus</i> -Thrombozyten-Assoziation.....	112
3.9 Aktivierung von Thrombozyten durch <i>S. aureus</i> in Anwesenheit von Antikörpern gegen Staphylokinase.....	113
3.10 Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen (HMEC-1).....	115
3.10.1 Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen in Abhängigkeit von der Bakterienzahl.....	115
3.10.2 Bestimmung der in die Endothelzellen invadierten <i>S. aureus</i>	117
3.10.3 Abhängigkeit der Adhäsion und Invasion von <i>S. aureus</i> Cowan 1 von der Zeit.....	119
3.10.4 Einfluss von Fibrinogen und Fibrin auf die Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen.....	120
3.10.5 Einfluss von TSP-1 auf die Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen.....	121
3.10.6 Bedeutung von Thrombozyten und Fibrinogen bzw. Fibrin für die Bindung und Invasion von <i>S. aureus</i> an/in Endothelzellen.....	123
3.10.7 Bedeutung von Thrombozyten und TSP-1 für die Bindung und Invasion von <i>S. aureus</i> an/in Endothelzellen.....	126
3.10.8 Zusammenspiel von (aktivierten) Thrombozyten, Fibrinogen bzw. Fibrin und TSP-1 bei der Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen.....	127
4. Diskussion.....	129
4.1 Plasmatische Adhäsionsproteine binden an <i>S. aureus</i> .....	129

4.2 Die Bindung von <i>S. aureus</i> an Thrombozyten.....	133
4.3 Die wichtigsten MSCRAMMs sind promiskuitiv und binden Fibrinogen, vWF, TSP-1 und Fibronectin.....	139
4.4 Die Bedeutung einiger MSCRAMMs für die Bakterien-Plättchen-Assoziation.....	149
4.5 Die Assoziation von Plättchen mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	153
4.6 Syndecan-1 und Sydecan-4 sind Vermittler der <i>S. aureus</i> -Thrombozyten-Assoziation.....	155
4.7 Beeinflussung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch <i>S. aureus</i> durch Antikörper gegen Staphylokinase.....	156
4.8 Die Bindung von <i>S. aureus</i> an Endothelzellen (HMEC-1).....	158
5. Ausblick.....	163
6. Zusammenfassung.....	167
7. Summary.....	169
8. Literaturverzeichnis.....	171
Danksagung.....	191
Lebenslauf.....	192
Erklärung.....	193

## 1. Einleitung

### 1.1. Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, sind die kleinsten zellulären Bestandteile des menschlichen Blutes. Ihr Durchmesser beträgt im ruhenden Zustand  $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$  und sie sind  $0,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$  dick. Das mittlere Plättchenvolumen liegt bei  $7,1 \pm 4,9 \text{ fl}$  bei einem Gewicht von ca.  $10 \text{ pg}$ . Es sind kernlose Zellfragmente, die im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet werden. Junge Plättchen enthalten noch mRNA und sind in begrenztem Umfang zu Proteinsynthese fähig. Die physiologische Plättchenzahl liegt in der Regel zwischen  $15$  und  $35 \times 10^{10}$  pro Liter Blut. Etwa ein Drittel aller Thrombozyten wird in der Milz gespeichert und steht im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil. Die Plättchen zirkulieren 8 bis 14 Tage, bevor sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber durch Gewebsmakrophagen entfernt werden (Jurk und Kehrel, 2005a).

Blutplättchen sind an vielen wichtigen physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Hämostase und der Thromboseentstehung beteiligt. Außerdem sind Thrombozyten auch spezialisierte Zellen der innate Immunabwehr, werden von Leukozyten mit in entzündetes Gewebe gebracht, haben eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und sind an der hämatogenen Metastasierung von Tumoren beteiligt (Kehrel und Jurk, 2004; Jurk und Kehrel, 2007).

Ist eine Gefäßwand verletzt und Endothel zerstört, werden Thrombozyten aus dem zirkulierenden Blut rekrutiert. Durch eine Folge von Interaktionen zwischen den Plättchen und der subendothelialen Matrix (Adhäsion, Kap. 1.1.3) und den Plättchen untereinander (Aggregation, Kap. 1.1.4) wird ein Verschlusspfropfen gebildet. Thrombozyten können aber auch direkt an ein aktiviertes Endothel anbinden (Kehrel, 2003).

#### 1.1.1 Morphologie der Thrombozyten

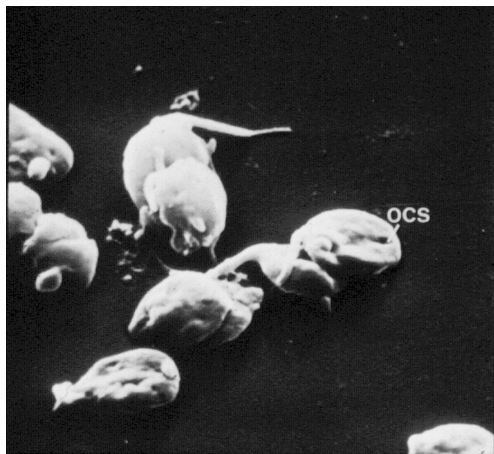
Thrombozyten zirkulieren im ruhenden Zustand und haben dabei eine diskoide Gestalt (Abb. 1-1). Ihre Plasmamembran ist eine klassische Lipid-Doppelschicht. Sie ist außen umhüllt von der Glykokalix, die Rezeptoren für die verschiedenen Plättchenagonisten und -inhibitoren enthält. Die Signalübertragung in die Plättchen hinein hat hier ihren Ursprung. Unterhalb der Plasmamembran befinden sich Aktinfilamente, die über Filamin

mit dem Glykoprotein (GP)Ib der Plasmamembran verbunden sind. Die Plättchen werden so im ruhenden Zustand in Form gehalten. Charakteristisch für Plättchen sind das geschlossene und das offene Tubularsystem. Das offene kanikuläre Membransystem (OCS) dient als Membranspeicher beim Formwandeln der Plättchen. Weitere Charakteristika sind die Speichergranula: dichte Granula („dense bodies“),  $\alpha$ -Granula und Lysosomen. Die „dense bodies“ haben ihren Namen wegen ihrer charakteristischen elektronenoptischen Dichte erhalten. Sie enthalten niedermolekulare Verbindungen wie ATP, ADP, Serotonin, Phosphat und  $\text{Ca}^{2+}$  (Morgenstern, 1999).

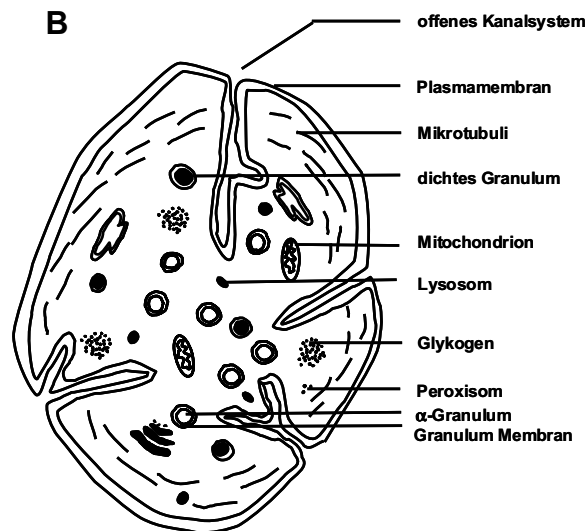
Die zahlenmäßig am häufigsten vorkommenden  $\alpha$ -Granula enthalten Adhäsionsproteine, wie z. B. Fibrinogen, Thrombospondin-1, Fibronectin, von Willebrand Faktor, Vitronectin, aber auch  $\beta$ -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4 (PF4), Gerinnungsfaktoren und Zytokine, Koagulationsfaktoren (Faktor V, Faktor XIII, Plasminogen) sowie Wachstumsfaktoren wie den „platelet derived growth factor“ (PDGF) (Kehrel, 2003). Thrombozyten sind in der Lage, Moleküle wie z. B. Fibrinogen, Immunglobuline und Albumin aus dem Blutplasma mittels Endozytose über Transportvesikel in die  $\alpha$ -Granula aufzunehmen. In den Lysosomen sind hydrolytische Enzyme enthalten, wie z. B. Galactosidase, Elastase und Kollagenase.

**Abb. 1-1**

**A**



**B**



**Abb. 1-1/A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von ruhenden humanen Thrombozyten** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Troyer, Institut für Arterioskleroseforschung, Universität Münster). OCS: offenes Kanalsystem

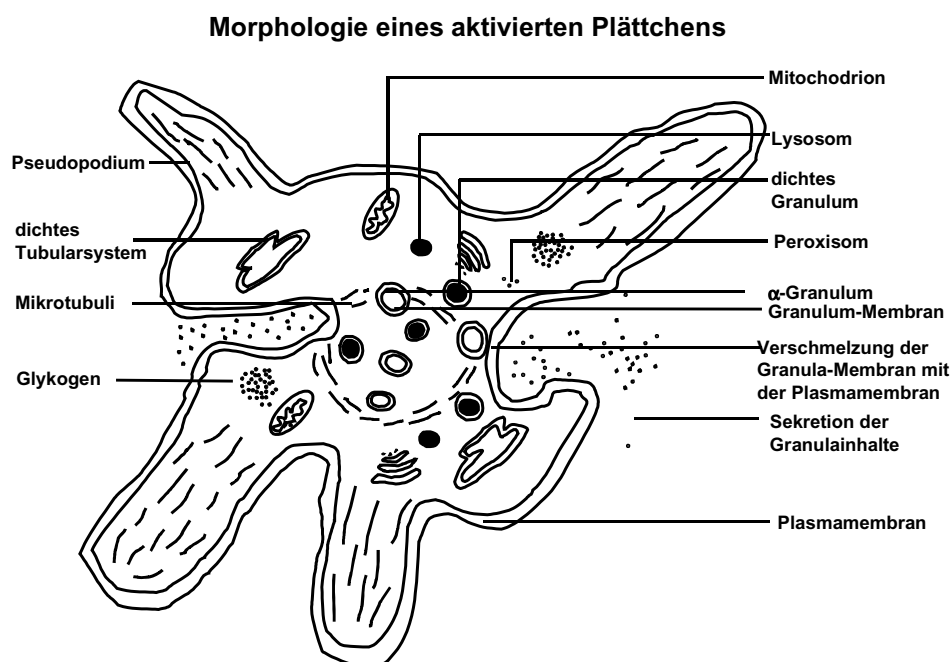
**Abb. 1-1/B: Skizzenhafte Zeichnung der Ultrastruktur eines ruhenden Plättchens** (nach Kehrel, 2003)



### 1.1.2 Funktion der Thrombozyten

Durch eine Vielzahl von physiologischen Agonisten können Thrombozyten aktiviert werden, zu ihnen gehören z. B. Thrombin, Thromboxan-A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und ADP. Auch durch Kontakt mit Proteinen der extrazellulären Matrix wie z. B. Kollagen, von Willebrand Faktor, Thrombospondin oder Fibronektin oder mechanisch durch Scherstress ist eine Aktivierung der Plättchen möglich. Die Anbindung von Plättchen an Agonisten über spezifische Plättchenrezeptoren führt zur Plättchenaktivierung (Savage *et al.*, 1992; Kehrel *et al.*, 1998). Ein intrazellulärer Botenstoffmechanismus führt zu aktivierenden Stoffwechselsignalen innerhalb der Plättchen und verändert damit die Zelle. Die Blutplättchen erfahren einen Formwandel („shape change“). Sie gehen dabei von der diskoiden in die sphärische Form über. Die Plättchen breiten sich durch eine Umorganisation des Zytoskeletts aus, und durch Membranausstülpungen des offenen kanikulären Systems werden Pseudopodien ausgebildet.

**Abb. 1-2**



**Abb. 1-2: Skizzenhafte Zeichnung der Ultrastruktur eines aktivierten Plättchens.** Aktivierte Thrombozyten zeigen einen Formwandel und bilden Pseudopodien aus. Die Membranen der Granula verschmelzen mit der Plasmamembran, und die Inhaltsstoffe der Granula werden sezerniert (nach Kehrel, 2003).

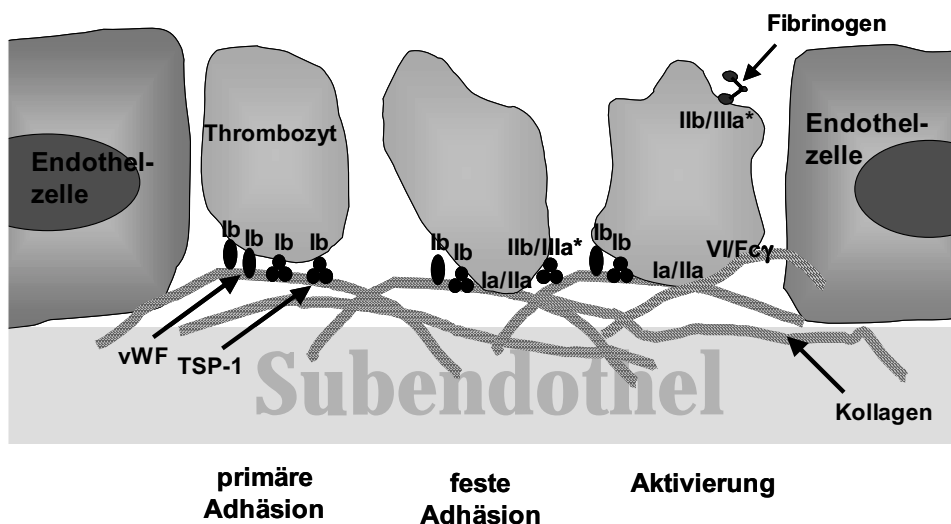
## 1. Einleitung

Durch Veränderung der Zytoskelettproteine werden  $\alpha$ -Granula und „dense bodies“ zentralisiert und ihre Membranen verschmelzen im Rahmen von Exozytosevorgängen mit der Zellmembran. Das führt zur Freisetzung der Granulainhaltsstoffe. Diesen dienen nun auch als Agonisten für weitere Plättchenaktivierung und -aggregation. Granulamembran verankerte Glykoproteine wie das P-Selektin (CD62) der  $\alpha$ -Granula und das Granulophysin (CD63) der „dense bodies“ gelangen durch Membranverschmelzungen an die Thrombozytenoberfläche.

Im Rahmen von Hämostasevorgängen lagern sich Plättchen an geschädigtes Endothel oder Subendothel an, um einen Verschlusspfropf zu bilden. Dieser Vorgang verläuft in drei Schritten:

1. Plättchenadhäsion
2. Plättchenaktivierung
3. Plättchenaggregation

**Abb. 1-3**



**Abb. 1-3: Die ersten Schritte der primären Hämostase.** Über eine Brückenbildung zwischen GPIIb/IIIa-Komplex und von Willebrand Faktor (vWF) werden Plättchen aus dem Blutstrom eingefangen. Eine weitere Adhäsionsachse bildet Thrombospondin-1 mit GPIIb (Jurk *et al.*, 2003). Durch Aktivierung der Plättchen wird auch GPIIb/IIIa aktiviert. Dieser Glykoproteinkomplex ist dadurch fähig, Fibrinogen und vWF zu binden. Bei niedrigem Scherstress erfolgt auch eine direkte Bindung der Thrombozyten über GPIIb/IIIa an Kollagen, sie werden voraktiviert und über GPIIb/IIIa weiteraktiviert (nach Kehrel, 2003).

### 1.1.3 Adhäsion und Aktivierung

Die Adhäsion von Blutplättchen an geschädigtes Endothel erfordert besondere Adhäsionsmechanismen, die in der Lage sind, den mechanischen Kräften des Blutflusses entgegenzuwirken. Bei hohen Scherkräften ist vorwiegend der von Willebrand Faktor (vWF) für die Plättchenadhäsion an der Gefäßwand verantwortlich (Ruggeri *et al.*, 1999). VWF-Moleküle werden aus dem Blutplasma an Proteine der extrazellulären Matrix, z. B. Kollagen, des freigelegten Subendothels immobilisiert. Die Adhäsion der Plättchen an den immobilisierten vWF erfolgt über den Glykoproteinkomplex GPIb/V/IX. Eine weitere Adhäsionsachse bildet Thrombospondin-1 mit GPIb (Jurk *et al.*, 2003). Durch diese Adhäsionsprozesse werden über ein GPIb/V/IX-vermitteltes Signal innerhalb der Plättchen Signalreaktionen initiiert. Dadurch wird wiederum der Komplex GPIIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin) auf der Oberfläche aktiviert („inside-out signaling“) und seine Konformation verändert, so dass er weitere vWF-Moleküle binden kann. Dies resultiert in einer irreversiblen Plättchenadhäsion.

Unter statischen Bedingungen (offene Wunde) oder bei geringen Scherkräften, wie sie in großen Venen vorkommen, können Plättchen auch direkt über GPIa/IIa (auch  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin genannt) an Kollagenfasern anbinden (Moroi *et al.*, 1996). Die Quervernetzung des GPIa/IIa Komplexes mit anderen GPIa/IIa Komplexen auf dem Blutplättchen führt dann zur Plättchenaktivierung.

Über Fibrinogenrezeptoren, Kollagenrezeptoren und Fibronectinrezeptoren wird die Adhäsion stabilisiert.

Das Glykoprotein VI ist der wichtigste Signalübertragungsrezeptor für Kollagen. Es ist mit Fc $\gamma$  verbunden und aktiviert die Thrombozyten (Kehrel *et al.*, 1998). Dabei verliert das Plättchen die diskoide Form und geht in eine kugelige Form mit Pseudopodien über, welche die Abdichtung der Läsion begünstigt.

Eine Folge der Plättchenaktivierung ist die Freisetzung von Arachidonsäure, die abgespalten und daraus Thromboxan-A<sub>2</sub> gebildet wird. Aus den Granula werden gespeicherte Stoffe wie ADP, Matrixmetalloproteinasen und TXA<sub>2</sub> freigesetzt. Diese aktivieren ihrerseits vorbeischwimmende Plättchen durch Anlagerung an die entsprechenden Rezeptoren. ADP ist für die Verstärkung der beginnenden Plättchenaktivierung der bedeutendste Agonist (Gachet, 2001).

### 1.1.4 Plättchenaggregation

Die Aneinanderbindung zweier Thrombozyten im lockeren Zustand über Fibrinogen- oder vWF-Brücken kennzeichnet die primäre Aggregation. In diesem Stadium ist der Vorgang der Aggregation noch reversibel. Die sekundäre Aggregation beginnt mit der Freisetzung der Granulainhaltsstoffe (siehe oben). Das Brückenmolekül bindet an GPIIb/IIIa, das vorher aktiviert worden sein muss, da ruhendes GPIIb/IIIa nicht in der Lage ist, lösliche Liganden zu binden. Eine andere Möglichkeit ist die Bindung von immobilisiertem Fibrinogen (z. B. an Gefäßverletzungen, Herzklappen, Kathetern) an ruhendes GPIIb/IIIa. Dieses führt zu einer Aktivierung des Integrins und zu einer Plättchenaktivierung. Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, welche eine lokale Zusammenlagerung der Fibrinogenrezeptoren („clustering“) auf der Plättchenoberfläche bewirkt. Multiple Bindungsstellen erhöhen die Avidität der Bindung von Plättchen an Fibrinogen über GPIIb/IIIa-Komplexe und verstärken damit die Aggregatbildung (Lüscher und Weber, 1993).

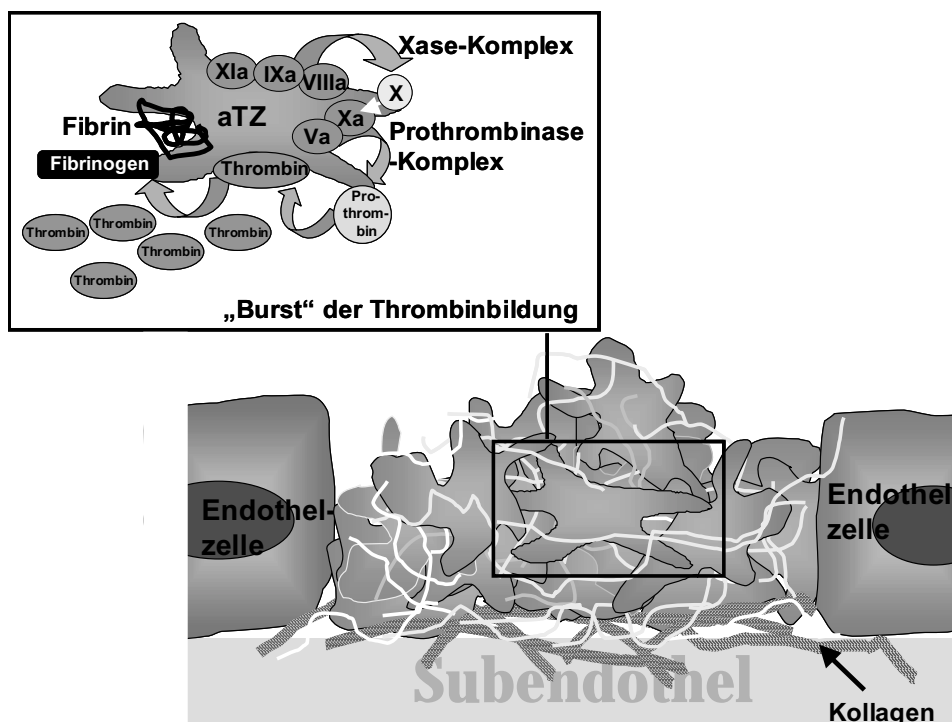
### 1.1.5 Ausbildung einer prokoagulanten Plättchenoberfläche

Die Bildung eines festen undurchlässigen Plättchenaggregates, welches von einem Netz aus Fibrinfäden durchdrungen ist, charakterisiert die sekundäre Hämostase. Hierbei wird kontrolliert Thrombin gebildet und dieses führt zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und sorgt so für die Stabilität des Plättchenthrombus. Außerdem werden weitere Thrombozyten aktiviert. An der Membran der Plättchen wird die sekundäre Hämostase induziert, gesteuert und kontrolliert (Zell-basiertes Modell der Koagulation) (Bouchard und Tracy, 2001; Monroe *et al.* 2002; Jurk und Kehrel, 2005b; Roberts *et al.*, 2006). Die Blutplättchen besitzen spezifische Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren, gebundene Faktoren werden vor der Inaktivierung geschützt, die Gerinnung ist auf den Ort der Verletzung begrenzt und der anfängliche Stimulus wird durch Vervielfältigung der Thrombinbildung verstärkt. Als Folge der Thrombozytenaktivierung werden negativ geladene Phospholipide, insbesondere Phosphatidylserin, an die Oberfläche der Plättchen gebracht. Sie haben eine hohe Bindungsaktivität für eine Gruppe von Gerinnungsfaktoren, den Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren, zu denen die Gerinnungsfaktoren Va, VIIIa, IX und Xa gehören.

Nur Faktor Xa, der auf der Plättchenoberfläche durch den Faktor IXa/VIIIa Komplex in Nachbarschaft zu Faktor Va gebildet wird, kann in den Prothrombinasekomplex

eingebaut werden (Scandura und Walsh, 1996). Faktor Xa im Komplex mit Faktor Va wandelt große Mengen Prothrombin in Thrombin um und löst einen „thrombin burst“ aus (Abb. 1.4). Der „thrombin burst“ ist notwendig für die Ausbildung eines Fibringerinnsels (Hoffman und Monroe, 2001). Die Transglutaminase (Faktor XIIIa) stabilisiert die durch Thrombin gebildeten, sich polymerisierenden Fibrin-Monomere, und es kommt zu einer intermolekularen Vernetzung, die zu einer Stabilisierung des Gerinnsels führt (Herrick *et al.*, 1999).

**Abb. 1-4**



**Abb. 1-4: Fibrinbildung auf Thrombus.** Faktor X wird durch den Faktor IXa/VIIIa Komplex zu Faktor Xa umgewandelt. Faktor Xa im Komplex mit Faktor Va wandelt große Mengen Prothrombin in Thrombin um und löst einen „Thrombin Burst“ aus. Der „Thrombin Burst“ ist notwendig für die Ausbildung eines Fibringerinnsels, welches den Plättchenthrampus stabilisiert (nach Jurk und Kehrel, 2005b)

### 1.1.6 Fibrinolyse

Das im Plasma vorhandene Plasminogen kann mit Hilfe des gewebsabhängigen Plasminogen Aktivators („tissue-plasminogen activator“ (tPA)) und des Urokinase Plasminogen Aktivators (u-PA) zu Plasmin gespalten werden. Das Plasmin ist das

Hauptenzym der Fibrinolyse. Es spaltet Fibrin in Proteinfragmente und Peptide (Booth, 1999). Die beiden Plasminogenaktivatoren können durch die Plasminogen Aktivator Inhibitoren 1 und 2 (PAI-1 und PAI-2) gehemmt werden, Plasmin durch  $\alpha_2$ -Antiplasmin.

Anstelle von tPA und u-PA kann Plasminogen auch durch prokaryotische Streptokinase (SK) oder Staphylokinase (SAK) gespalten werden. Dabei handelt es sich bei SK und SAK nicht selber um Enzyme, aber sie formen zusammen mit Plasminogen einen 1:1-Komplex, der die Fähigkeit besitzt, Plasminogen zu Plasmin zu spalten. SAK aktiviert primär nur Fibrin-gebundenes Plasminogen. (Lähteenmäki *et al.*, 2001).

### 1.2 Endothel

Das Endothel kleidet bei Vertebraten als innerste Zellschicht die Blut- und Lymphgefäße aus. Die Endothelzelloberfläche beträgt bei einem erwachsenen, 70 kg schweren Menschen etwa 1000 m<sup>2</sup>. Die Endothelzellen haben nur eine geringe „turnover“ Rate von 1000 Tagen (Helisch und Ware, 1999).

Als Barriere zwischen dem Blutstrom und der Gefäßwand übt das Endothel vielfältige Funktionen aus, z. B. die Kontrolle des Stoffaustausches zwischen intra- und extravasalem Raum, Regulation des Blutdrucks durch Modulation des vaskulären Tonus, Funktionen in der Hämostase, sowie die Beteiligung an immunologischen Prozessen wie akuten und chronischen Entzündungsreaktionen. Unter normalen Bedingungen haben die Endothelzellen eine Oberfläche, an die Plättchen oder andere Blutzellen nicht adhären können. Prostacyclin und Stickstoffmonoxid sind zwei der physiologisch wichtigen Moleküle für die Hemmung der Plättchenaktivierung und der Plättchen-Gefäßwand-Interaktion. Moleküle, die Einfluss auf die Koagulation haben, sind z. B. Thrombomodulin, Protein S und „tissue factor pathway inhibitor“ (Wu und Thiagarajan, 1996).

Als weiteres wird der vWF, neben seiner Synthese in den Megakaryozyten, auch in Endothelzellen gebildet und dort in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (Sporn *et al.*, 1986). Bei Anwesenheit von Thrombin in Folge einer vaskulären Verletzung wird verstärkt vWF freigesetzt, der durch seine Bindung an Kollagen und den Thrombozyten-GPIb-Komplex die Plättchenadhäsion vermittelt (siehe Kap. 1.1.3) (Sadler, 1998).

Endothelzellen synthetisieren und sezernieren den gewebsabhängigen Plasminogen Aktivator (tPA) und den Urokinase Plasminogen Aktivator (u-PA) zur Förderung der

Fibrinolyse. Außerdem produzieren die Endothelzellen auch den Plasminogen Aktivator Inhibitor-1 (siehe auch Kap. 1.1.6) (Wu und Thiagarajan, 1996).

Aktivierte Thrombozyten können über eine Protein-Brücke zwischen Thrombozyten-GPIIb/IIIa und dem Interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) der Endothelzellen an Endothelzellen anbinden (Bombeli *et al.*, 1998).

## 1.3 Adhäsionsproteine

### 1.3.1 Fibrinogen

Fibrinogen ist ein 340 kDa großes Glykoprotein, das in einer Konzentration von etwa 3 mg/ml im Blutplasma vorkommt. Die Synthese erfolgt in den Hepatozyten, von wo es aus ins Blut abgegeben wird und von Megakaryozyten und Thrombozyten aufgenommen werden kann. Es spielt eine Schlüsselrolle in der Hämostase und der Koagulation (siehe Kap. 1.1.5) (Herrick *et al.* 1999). Fibrinogen besteht aus sechs Polypeptidketten, zwei  $A\alpha$ , zwei  $B\beta$ , und zwei  $\gamma$ -Ketten, die in einer symmetrischen dimerischen Struktur angeordnet sind.

Abb. 1-5

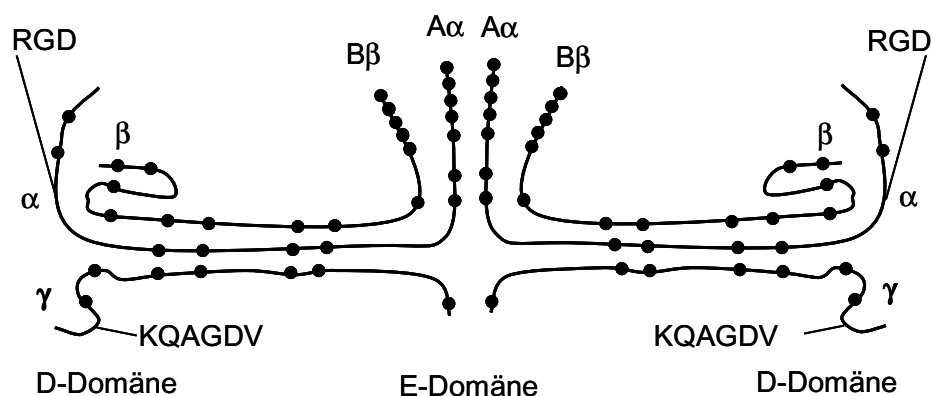


Abb. 1-5: Trimoduläre Struktur von Fibrinogen. Mit den Sequenzen RGD und KQAGDV sind die Integrinbindungsstellen angegeben (nach Gawaz, 1999)

Das C-terminale Ende der  $\gamma$ -Kette ist der Bereich des Fibrinogens, das mit dem Plättchenintegrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  während der Fibrinogen-abhängigen Plättchenadhärenz und

Aggregation interagiert (Kloczewiak *et al.*, 1984). An den gleichen Bereich des Fibrinogens binden auch *S. aureus* Clumping factor (Kap. 1.4.2.1) (Hawiger *et al.*, 1982) und *S. aureus* Fibronektinbindeprotein (Kap. 1.4.2.2) (Wann *et al.*, 2000). Außerdem hat Fibrinogen mit zwei Arg-Gly-Asp-(RGD)-Sequenzen innerhalb der A $\alpha$ -Kette noch zwei weitere Integrinbindungsstellen (Doolittle *et al.*, 1979; Gartner und Bennett, 1985; Plow *et al.*, 1987).

Lösliches Fibrinogen ist kaum in der Lage, an Plättchen anzubinden, dagegen kann immobilisiertes Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Komplex der Plättchen binden und diese damit aktivieren (Savage und Ruggeri, 1991).

Die Bindung von *S. aureus* an Fibrinogen ermöglicht es den Bakterien, an Zellen wie Endothelzellen (Cheung *et al.*, 1991) und Plättchen (Herrmann *et al.*, 1993) zu adhären, aber auch die Bindung von *S. aureus* an Fremdoberflächen wie z. B. Plastik (Herrmann *et al.*, 1988; Cheung und Fischetti, 1990). Deshalb ist die Bindung von *S. aureus* an immobilisiertes Fibrinogen von großer Bedeutung für die Entwicklung von *S. aureus*-Infektionen.

### 1.3.2 Thrombospondin-1 (TSP-1)

1971 wurde erstmals das „Thrombin-sensitive Thrombozytenprotein“ (TSP) durch Baenziger entdeckt. Damals glaubte man, dass TSP ein Plättchen-spezifisches Protein ist. Es liegt aber nicht nur in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten vor, sondern wird auch noch von Endothelzellen (Mosher *et al.*, 1982), Monozyten (Jaffe *et al.*, 1985), glatten Muskelzellen (Raugi *et al.*, 1982) und Fibroblasten (Jaffe *et al.*, 1983) synthetisiert.

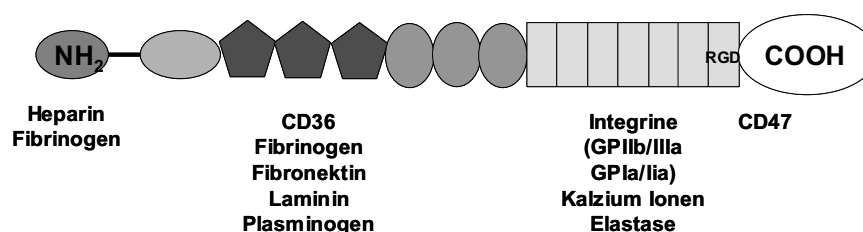
Heute sind fünf Thrombospondine bekannt: TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 und das „cartilage oligomeric matrix protein“ (COMP oder TSP-5) (Adams, 2001). Das Hauptreservoir für gespeichertes TSP-1 sind die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und von dort wird es bei der Plättchenaktivierung freigesetzt. Es macht dabei etwa ein Viertel des sezernierten Gesamtproteins aus (Kehrel *et al.*, 1996). „Platelet-derived growth factors“ (PDGFs), welche von Thrombozyten freigesetzt werden, können ein „immediate early gene“ in glatten Muskelzellen aktivieren, welches zur Expression von TSP-1 führt (Miano *et al.*, 1993). So kann innerhalb von 15 min die Thrombospondinkonzentration gesteigert werden (Majack *et al.*, 1986).



Im Plasma gesunder Probanden liegt TSP-1 nur in sehr geringen Konzentrationen vor (20-300 ng/ml), im Serum dagegen, durch das aus Thrombozyten abgegebene TSP-1, in Konzentrationen von 10-30 µg/ml (Saglio und Slayter, 1982). TSP-1 ist ein 420-450 kDa großes Glykoprotein, welches aus drei identischen Untereinheiten besteht. Jedes Monomer hat eine Masse von 180 kDa. TSP-1 wird vornehmlich während der Entwicklung und des Wachstums und als Antwort auf Verletzungen expremiert. Es ist ein multifunktionelles Protein, welches bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen genauso beteiligt ist wie bei vielen physiologischen Prozessen, wie der Hämostase und der Wundheilung (Bornstein, 2001).

Nach Sekretion von TSP-1 durch Thrombozyten bindet es zum Teil wieder an spezifische Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche zurück (Wolf *et al.*, 1986), z. B. an CD36 (Asch *et al.*, 1987) oder GPIIb/IIIa (Karczewski *et al.*, 1989). Es kann auch an Integrine gebundenes Fibrinogen oder Fibronectin binden (Homandberg und Kramer-Bjerke, 1987; Bornstein, 2001). Über die Interaktion mit Fibrinogen stabilisiert TSP-1 die Plättchenaggregation. TSP-1 wird durch Faktor XIII mit Fibrin vernetzt (Bale *et al.*, 1985).

**Abb. 1-6**



**Abb. 1-6: Schematische Darstellung der Struktur eines TSP-1-Moleküls (nach Adams, 2001)**

TSP-1 ist aus mehreren Domänen aufgebaut (s. Abb. 1.6). Am aminoterminalen Ende besitzt TSP-1 eine Region, an der sich die Heparin- und Fibrinogenbindungsstellen befinden. Darauf folgen eine prokollagenähnliche Domäne und darauf eine properdinähnliche Domäne. In dieser Domäne befinden sich z. B. die CD36-, Fibrinogen-, Plasminogen- und Fibronectinbindungsstellen. Danach folgt im Mittelteil des Moleküls eine EGF („epithel growth factor“-)ähnliche Domäne, und darauf eine

Ca<sup>2+</sup>-bindende Domäne. Hier können verschiedene Integrine wie z. B. GPIIb/IIIa und GPIa/IIa anbinden. Am Carboxyterminus befindet sich eine Bindungsstelle für CD47, das Integrin assoziierte Protein (IAP) (Adams, 2001).

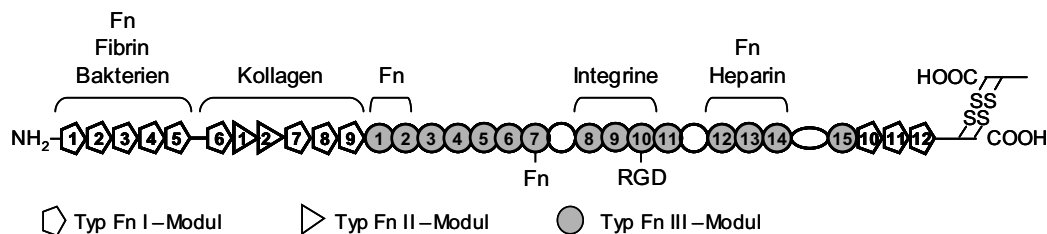
Die Konfirmation von TSP-1 ist stark Kalzium-Ionen abhängig (Lawler *et al.*, 1982). Dadurch kann auch durch Kalzium die Zelladhäsionsfähigkeit beeinflusst werden. Neben seiner Fähigkeit an unterschiedliche Zellen zu binden, kann TSP-1 auch an *S. aureus* binden. Diese Bindung ist Kalzium-Ionen abhängig, und sowohl lösliches als auch immobilisiertes TSP-1 kann mit *S. aureus* interagieren (Herrmann *et al.*, 1991).

### 1.3.3 Fibronektin (Fn)

Fibronektin ist ein ca. 440 kDa großes Glykoprotein, das aus zwei fast identischen 250 kDa großen Untereinheiten aufgebaut ist, die durch ein Paar Disulfidbrücken in der Nähe ihrer C-Termini kovalent miteinander verbunden sind. Das Glykoprotein vermittelt eine Reihe von zellulären Interaktionen mit der extrazellulären Matrix und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, der Migration, dem Wachstum und der Entwicklung. Es ist ein Bestandteil des Plasmas (ca. 300 µg/ml) und anderer Körperflüssigkeiten (Pankov und Yamada, 2002). Im Gegensatz zum plasmatischen Fibronektin, welches hauptsächlich in den Hepatozyten der Leber gebildet wird, gibt es auch eine unlösliche Form in der extrazellulären Matrix. Das unlösliche Fibronektin wird u. a. von Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen und bestimmten Epithelzellen synthetisiert. Fibronektin ist auch in den α-Granula der Thrombozyten zu finden.

Jedes Fibronektin-Monomer ist aus Wiederholungssequenzen von drei unterschiedlichen Modulen aufgebaut (Abb. 1.7), die als Typ I, Typ II und Typ III bezeichnet werden. Die drei Module machen 90 % des Gesamtproteins von Fibronektin aus (Pankov und Yamada, 2002). Für bestimmte Gruppen dieser Module wurde die Interaktion mit einer Reihe von Proteinen gezeigt wie z. B. Kollagen, Fibrin und verschiedene Integrine (Abb. 1.7). (Hynes und Yamada, 1982; Johansson *et al.*, 1997; Pankov und Yamada, 2002). Fibronektin kann auch in einen Plättchen-Thrombus eingebaut werden. Dabei wird plasmatisches Fibronektin durch Faktor XIII mit Fibrin vernetzt (Corbett *et al.*, 1997). Diese Vernetzung fördert die Thrombogenese (Cho und Mosher, 2006).

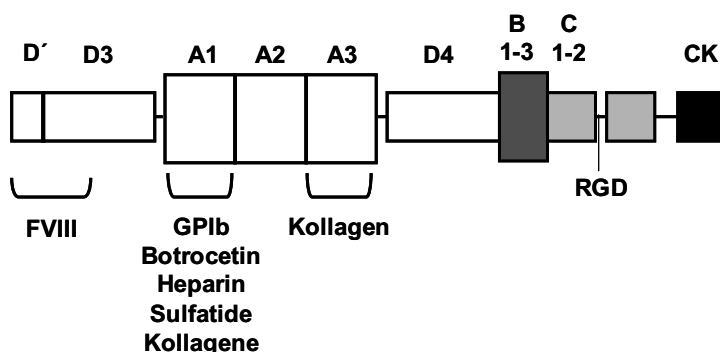
N-terminal besitzt Fibronectin auch eine Bindungsstelle für *S. aureus*. Fibronectin ist besonders wichtig bei der Adhärenz und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen (Sinha *et al.*, 1999) (Kap. 1.4.2.2).



**Abb. 1-7: Schematischer Aufbau einer Fibronectin-Moleküls.** Es sind die drei unterschiedlichen Module, aus denen Fibronectin zu 90 % besteht, dargestellt und die Bindungsstellen für die unterschiedlichen Bindungspartner; RGD: Bindungsstelle für Integrine (nach Pankov und Yamada, 2002 und Schwarz-Linek *et al.*, 2004).

### 1.3.4 Von Willebrand Faktor (vWF)

Von Willebrand Faktor (vWF) ist ein großes multimeres Glykoprotein, das im Blutplasma, in den  $\alpha$ -Granula der Plättchen und in dem mit dem Subendothel in Verbindung stehendem Gewebe gefunden wird. Es wird von Megakaryozyten (Sporn *et al.*, 1985) und Endothelzellen (Jaffe *et al.*, 1974) synthetisiert und dann in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert. Während die Endothelzellen kontinuierlich oder auf Aktivierung hin vWF abgeben, sezernieren die Plättchen vWF nur nach ihrer Aktivierung; der im Blutplasma zirkulierende vWF kommt also nur aus den Endothelzellen (Ruggeri, 2003).



**Abb. 1-8: Schematischer Aufbau eines reifen vWF-Moleküls.** Die Bindungsstellen für unterschiedliche Bindungspartner sind angegeben (nach Sadler, 1998)

Das primäre Translationsprodukt ist der Prä-pro-von Willebrand-Faktor, welcher aus einem Signalpeptid, einem Propolypeptid und dem reifen vWF besteht. Nach Entfernung des Signalpeptides und durch Bildung von Disulfidbrücken wird der pro-vWF zunächst zu Dimären und später zu Multimeren zusammengefügt. Die Dimere aus reifen vWF haben ein Molekulargewicht von 500 kDa, große Polymere können 10.000 kDa erreichen (Ruggeri, 2003).

Die Größe der vWF Multimere steht in direkter Verbindung zu ihrer Funktion: nur die größten Multimere sind in der Hämostase aktiv (Furlan, 1996). Extrem große Multimere führen zu sehr starken Bindungen zu dem Plättchen-Glykoprotein Ib-V-IX-Komplex (Arya *et al.*, 2002). Die großen vWF-Multimere werden in den Speichergranula gespeichert und sind für gewöhnlich nicht im Blut von gesunden Menschen zu finden, da sie dort durch die vWF-Protease ADAMTS-13 gespalten werden. Eine kontrollierte Freisetzung bei einer Verletzung limitiert die Anwesenheit der am stärksten thrombogenen Formen des vWF, und regulatorische Mechanismen, die dafür sorgen, dass der vWF aus der Zirkulation wieder verschwindet, verhindern eine überhöhte Thrombusbildung (Ruggeri, 2003).

In der Hämostase ist der vWF wichtig für die Plättchenadhäsion und die Thrombusbildung bei hohem Scherstress (Ruggeri *et al.*, 1999; s. Kap. 1.1.3). Dabei gelangt vWF aus der subendothelialen Matrix und aus dem Plasma an die geschädigte Stelle. Die Bindung erfolgt über die A1- und die A3-Domäne an Kollagene (Ruggeri, 1999a). Die Konformation des vWF ändert sich daraufhin, und der GPIb-V-IX-Komplex der Plättchen kann an die A1-Domäne des vWF anbinden. Löslicher vWF ist nur bei der Anwesenheit von Modulatoren wie Ristocetin und Botrocetin in der Lage, über GPIb an Plättchen zu binden. Ristocetin bindet zu vWF und Plättchen, dadurch kann vWF an GPIIb/IIIa anbinden (Berndt *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1991). Nach Aktivierung der Plättchen kann auch das Integrin GPIIb/IIIa vWF über dessen Arg-Gly-Asp-(RGD)-Sequenz binden. Dies führt schließlich zu einer irreversiblen Adhäsion der Plättchen an die Oberfläche.

Die Bindung des Gerinnungsfaktor VIII über die D-Domäne ist eine weitere wichtige Aufgabe des vWF. Durch die Bindung an den vWF ist der Faktor VIII im zirkulierenden Blut vor der Aktivierung durch Faktor Xa und vor der Inaktivierung durch aktiviertes Protein C geschützt (Koedam *et al.*, 1988; Koedam *et al.*, 1990). Außerdem konzentriert

vWF Faktor VIII am Ort der vaskulären Verletzung (Sakariassen *et al.*, 1979). Während der Hämostase wird der Faktor VIIIa durch Thrombin freigesetzt.

Eine Interaktion von vWF mit *S. aureus* konnte Herrmann *et al.* (1997) nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass vWF an *S. aureus* sowohl in Suspension anbindet, als auch die *S. aureus* Adhäsion zu Oberflächen fördert. Es wurde gezeigt, dass Protein A auf der *S. aureus* Oberfläche als Bindungsadhäsion für vWF dient (Hartleib *et al.*, 2000).

#### **1.4 *Staphylococcus aureus***

Zur Zeit sind 31 Arten in der Gattung *Staphylococcus* bekannt, wovon etwa die Hälfte den menschlichen Körper (Haut, Schleimhäute) als Kommensalen besiedelt (Kloos und Bannerman, 1994). Staphylococci sind gram-positive, nicht sporenbildende und nicht frei bewegliche Bakterien mit einem Durchmesser von 0,5 -1,5 µM. Pathogene Staphylokokken sind in der Regel in der Lage, Koagulase zu produzieren, so dass man die Staphylokokken in die Koagulase positiven und Koagulase-negativen (CoNS) einteilt.

Die Art *Staphylococcus aureus* hat ihren Namen durch die (oftmals) goldene Farbe der Bakterienkolonien auf festem Medium erhalten. Sie ist ein bei Menschen, anderen Säugetieren und Vögeln vorkommender Kommensale der Haut und der Schleimhäute. Bis zu zwei Drittel der gesunden Normalbevölkerung sind permanent oder vorübergehend, vorwiegend nasal, mit *S. aureus* besiedelt. (von Eiff *et al.*, 2001). Der fakultativ pathogene Keim zählt zu den wichtigsten und vielseitigsten Infektionserregern der klinischen Medizin. Er kann lokal-oberflächliche Hautläsionen wie Furunkel, Karbunkeln und Gerstenkörner verursachen, aber auch ernsthafte Erkrankungen wie z. B. Dermatitis, Synovitis, Mastitis, Phlebitis, Meningitis, Osteomyelitis und Endokarditis. Als Weiteres verursacht *S. aureus* Lebensmittelvergiftungen durch Abgaben von Enterotoxinen in Lebensmitteln oder das Toxische Schock Syndrom durch Abgabe von Superantigenen in den Blutstrom. Eine besondere Bedeutung erlangt *S. aureus* durch den starken Anstieg an Antibiotika-resistenten Stämmen. In den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde Penicillin zur Behandlung von *S. aureus* Infektionen eingeführt, schon Ende der 40er Jahre traten Resistenzen gegen Penicillin auf. Im Jahr 2000 wurde vom „Central Public Health Laboratory“, England, festgestellt, dass 61% der in 96 Krankenhäusern untersuchten nosokomialen *S. aureus* Infektionen Methicillin resistent waren (Harris *et al.*, 2002). Genauso schnell, wie neue Antibiotika entwickelt wurden,

haben die Staphylococcen effiziente Mechanismen entwickelt, sie zu neutralisieren (Lowy, 2003).

### 1.4.1 Infektiöse Endokarditis

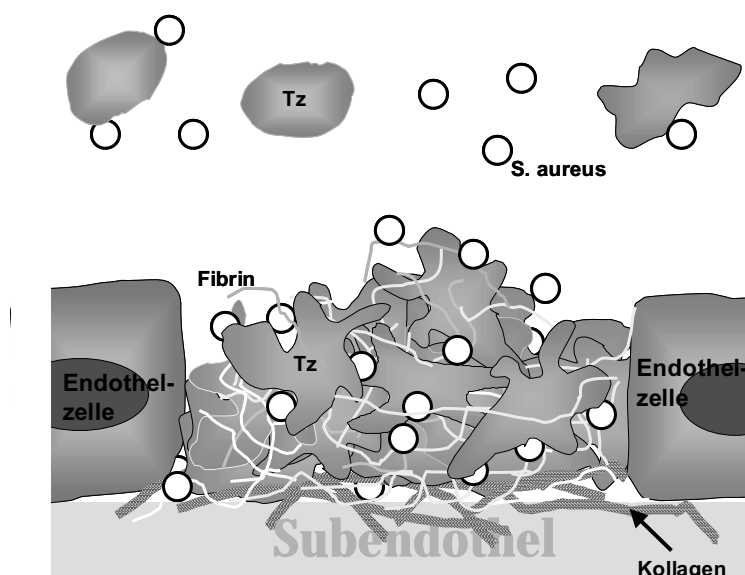
Die infektiöse Endokarditis wird oft in vier Kategorien unterteilt, welche sich in den klinischen Umständen und den mikrobiellen Krankheitserregern unterscheiden. Die native Herzklappenendokarditis wird mit angeborenen Herzfehlern und rheumatischen Fieber assoziiert. 1-5 % der Endokarditis-Patienten haben eine Künstliche Herzklappenendokarditis (prosthetic valve endocarditis, PVE) (Varstela, 1998). Die PVE wird in frühe (Infektion tritt nach weniger als 60 Tagen nach der Operation auf) und späte Infektion (mehr als 60 Tage nach der Operation) eingeteilt. Die frühe PVE wird häufig durch *Staphylococcus epidermidis* oder *S. aureus* verursacht. Patienten, die Drogen intravenös zu sich nehmen, bilden eine dritte Risikogruppe. 60-80 % dieser Patienten haben keine bekannte Schädigung der Herzklappen. Die Krankheitserreger entstammen ursprünglich von der Haut. Aus dem Grunde ist *S. aureus* auch hier ein Hauptpathogen. Die Anzahl der Patienten in der vierten Kategorie, die nosokomiale Infektiöse Endokarditis, ist ansteigend (Lowy, 1998). Oftmals gibt es bei den Patienten zuvor keine Faktoren, die prädisponierend für die Entwicklung einer infektiösen Endokarditis sind. Die Hauptpathogene sind Staphylokokken und Enterokokken. *S. aureus* ist in vielen Regionen der entwickelten Welt die führende Ursache für die infektiöse Endokarditis (Fowler *et al.*, 2005).

Das grundlegende Ereignis bei der Entwicklung einer infektiösen Endokarditis ist die Anbindung von Bakterien an die beschädigte Herzinnenhaut. Dieser Vorgang ist innerhalb von wenigen Minuten während einer transienten Bakteriämie abgeschlossen. Der zweite Schritt beinhaltet Persistenz und Wachstum der Bakterien innerhalb der Herzverletzung, meist verbunden mit lokaler Ausdehnung und Gewebeschädigung. Es folgt dann die Ausbreitung von septischen Embolien zu weiter entfernten Organen wie der Niere oder dem Gehirn.

### 1.4.1.1 Induktion der infektiösen Endokarditis

#### 1.4.1.1.1 Bindung von *S. aureus* an geschädigtes Endokard

Untersuchungen zur Pathogenese von bakteriell-endovaskulären Infektionen haben gezeigt, dass ihnen meist ein Endothelschaden vorausgeht. Dieser kann durch mechanischen Stress wie durch Unregelmäßigkeiten im Blutfluss, z. B. durch Herzklappenfehler, entstehen. Jede Freilegung des Endothels führt zu einem direkten Kontakt des Blutes mit Bestandteilen der subendothelialen Gewebes, Proteine der extrazellulären Matrix, Thromboplastin und Endothel-Gewebefaktor („tissue factor“) mit eingeschlossen. Der „tissue factor“ führt zu einer erhöhten koagulatorischen Aktivität und damit zu einer verstärkten Thrombozytenadhäsion und -aktivierung. Das Blutgerinnsel, das sich an dem geschädigten Endothel bildet, besteht aus Plättchen, Fibrinogen-Fibrin, Plasmaproteinen und Plättchenproteinen. Pathogene wie *S. aureus* binden bereitwillig an diese Strukturen und besiedeln sie während einer transienten Bakteriämie (Sullam *et al.*, 1985; Moreillon *et al.*, 2002). Schließlich besteht die am Endothel entstehende Vegetation aus Plättchen und Proteinen wie Fibrin, zwischen denen dichte Bakterienkolonien liegen, gut geschützt vor dem Immunsystem des Wirtes und fast unerreichbar für Antibiotika.



**Abb.1-9: Endovaskuläre Kolonisation nach Endothelzellschädigung.** Die Thrombozyten (Tz) lagern sich im Rahmen von Hämostasevorgängen an das geschädigte Endothel an, um einen Verschlusspfropf zu bilden. Die Plättchen werden dabei aktiviert und exprimieren aktivierte Rezeptorproteinen für adhäsive Thrombozytenmoleküle wie Fibrinogen, Fibronectin, TSP-1 oder vWF. *S. aureus* interagiert entweder mit den aktivierten Thrombozyten indirekt, über Brückenmoleküle wie Fibrin, oder direkt mit der subendothelialen Matrix.

### **1.4.1.1.2 Bindung von *S. aureus* an morphologisch intaktes Endothel**

Auch ohne morphologische Schädigung aber als Folge einer inflammatorischen Veränderung der Endothelzellen können diese durch *S. aureus* besiedelt werden.

Endothelzellen reagieren auf eine lokale Entzündung mit der Expressierung von unterschiedlichen Molekülen wie Integrinen der  $\beta$ 1-Familie. Diese binden Fibronectin an die Endotheloberfläche. Über Fibronectinbindeproteine auf der Zelloberfläche von *S. aureus* können die Bakterien an Endothelzellen indirekt anbinden. Wenn *S. aureus* an Endothelzellen angebunden hat, können die Bakterien auch in die Endothelzellen aufgenommen werden (Sinha *et al.*, 2000). Hier können sie geschützt persistieren oder sich vermehren und schließlich ausbreiten. Eine weitere Anbindung von *S. aureus* an Endothelzellen kann auch über TSP-1 erfolgen (Rennemeier *et al.*, 2007).

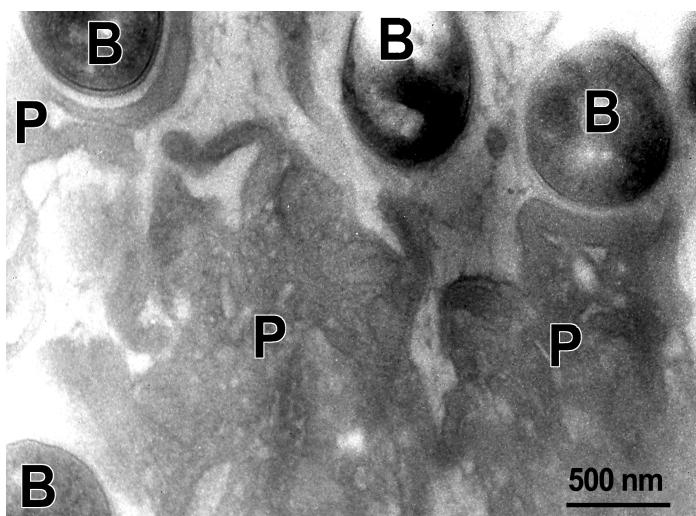
### **1.4.1.2 Bakterielle Persistenz**

Nach der endovaskulären Kolonisation müssen die infizierenden Mikroorganismen überleben und sich vor der Verteidigung des Wirtes schützen. Ein Schlüsselvorgang ist dabei die Reifung der Vegetation, in der sich die Bakterien entwickeln. Staphylokokken können diese positiv beeinflussen, da sie die „tissue-factor“-Produktion von Monozyten hervorrufen (Veltrop *et al.*, 1999) und die Plättchenaggregation induzieren (Bayer *et al.* 1995) können. Dabei ist die Aktivierung von Plättchen durch Bakterien nicht unbedingt von Vorteil für die Bakterien, da die Plättchen antimikrobielle Peptide („platelet microbicidal proteins“, PMP) freisetzen (Yeaman *et al.*, 1997), welche die Bakterien durch eine Permeabilisierung der zytoplasmatischen Membran (Yeaman *et al.*, 1998, Koo *et al.*, 1999) und eine Inhibierung der DNA und RNA-Synthese (Xiong *et al.*, 2002) abtöten können. Bakterien, die von Patienten mit infektiöser Endokarditis erlangt wurden, waren durchweg PMP resistent, dagegen waren die Bakterien, die von Patienten mit anderen Infektionstypen erlangt wurden, gegenüber PMP empfindlich (Fowler, 2000). Also müssen Pathogene, die mit einer infektiösen Endokarditis in Zusammenhang stehen, der Plättchenabwehr standhalten, um die Plättchen für sich zum Vorteil zu „nutzen“.



### 1.4.2 Staphylokokken-Adhäsine

Die Bindung von Bakterien an das Wirtsgewebe ist der erste wichtige Schritt in der Pathogenese von Staphylokokkeninfektionen. Diese Anbindung kann direkt erfolgen oder indirekt über extrazelluläre Matrixproteine wie Fibrinogen, TSP-1, vWF oder Fibronectin. Die Rezeptoren auf der *S. aureus* Oberfläche für eine direkte Anbindung an Thrombozyten sind weitgehend unbekannt. In In-vitro-Versuchen konnte eine Interaktion zwischen Plättchen gC1qR/p33, einem multifunktionellem Protein und *S. aureus* Protein A (s. Kap. 1.4.2.3) gezeigt werden (Nguyen *et al.*, 2000).



**Abb.1-10: Anbindung von *S. aureus* (B) an Plättchen (P).** Die Plättchen wurden vor Inkubation mit den Bakterien mit 1 U/ml Thrombin aktiviert. Transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme (Niemann *et al.*, 2004).

Die Adhäsion von *S. aureus* an Wirtsstrukturen wie Matrix- und Plasmaproteine wird durch verschiedene spezifische bakterielle Oberflächenproteine (Adhäsine) vermittelt. Bisher wurden drei Klassen beschrieben:

1) Kovalent Zellwand-gebundene Proteine, die eine Bindung an Matrixproteine vermitteln, werden zusammenfassend als MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“) bezeichnet (Patti *et al.*, 1994). MSCRAMMs sind auf der Bakterienzelloberfläche lokalisiert und erkennen Makromolekül-Liganden, die sich in der extrazellulären Matrix des Wirts befinden. Zu den Liganden gehören Moleküle wie Kollagen und Laminin, die ausschließlich in der extrazellulären Matrix sind, aber auch andere, wie Fibrinogen, Thrombospondin oder Fibronectin, die in der

extrazellulären Matrix zu finden sind, aber auch in einer löslichen Form im Blutplasma (Patti *et al.*, 1994). Viele Zellwand assoziierte Oberflächenproteinen von Gram-positiven Bakterien können durch die Analyse der primären Aminosäuresequenz identifiziert werden: am N-terminalen Ende werden etwa 40 Aminosäuren für die Proteinsekretion benötigt, das C-terminale Segment enthält die zellwandüberspannende Domäne, welche reich an prolin- und glycinreichen Resten ist oder aus Serin-Aspartat-Dipeptid-Wiederholungen besteht, einem Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin (LPXTG)-Motiv und einer hydrophoben membranüberspannenden Domäne, welcher eine Reihe positiv geladener Reste folgt (Schneewind *et al.*, 1995). Die Liganden-bindende Funktion befindet sich in der Regel in der N-terminalen Domäne. Das LPXTG-Motiv sorgt für eine Sortase-vermittelte Verankerung des zellwandgebundenen Proteins an der Peptidoglykanschicht (Mazmanian *et al.*, 2001). Zu den MSCRAMMs gehören „Staphylococcal Protein A“ (SpA, Kap. 1.4.2.3), „fibronectin-binding proteins“ (FnBPs, Kap. 1.4.2.2), „collagen adhesin“ (Cna), „Clumping factor A“ (ClfA, Kap. 1.4.2.1) und Clumping factor B“ (ClfB, Kap. 1.4.2.1).

2) Als weiteres besitzt *S. aureus* eine Reihe von löslichen Adhäsinen, welche nach der Sekretion nicht-kovalent an der Zellwand binden und eine Art Kitt bilden und an verschiedene Wirtsproteine binden. Sie können dann wie die zellwandverankerten Adhäsine als Adhäsionsrezeptoren wirken. Die löslichen Adhäsine wurden von Chavakis *et al.* (2005) zu den SERAM („Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules“) zusammengefasst. Im Gegensatz zu den MSCRAMMs haben die SERAM keinen homologen Aufbau. Zu ihnen gehören z. B. Koagulase (Coa, Kap. 1.4.2.5), das „extracellular fibrinogen binding protein“, das „extracellular matrix binding protein, und das „extracellular adhesive protein“ (Eap, Kap. 1.4.2.4).

3) Integrale Membranproteine, wie z. B. das „elastin-binding protein“, das zwei zentral gelegene Transmembrandomänen besitzt (Downer *et al.*, 2002).

*S. aureus* hat drei gut untersuchte Regulatoren: accessory gene regulator (*agr*, Recsei *et al.* 1986), staphylococcal accessory regulator (*sarA*, (Cheung *et al.*, 1992) und *S. aureus* exoprotein expression (*sae*, Giraud *et al.*, 1994). Sie regulieren die Expression von Oberflächenproteinen, Exoproteinen, und anderen Proteinen, die für das Wachstum wichtig sind. Untersuchungen haben gezeigt, dass der *agr*-locus negativ

die Zellwand assoziierten Proteine reguliert und die Inaktivierung des *agr*-locus zu einer erhöhten Expression der Proteine führt (Recsei *et al.*, 1986). Eine Deletion des *sarA*-locus bewirkt dagegen eine reduzierte Expression von Zellwand assoziierten Proteinen, wie Fibronectin-bindende Proteinen (Projan und Novick, 1997, Wolz *et al.*, 2000). Die Genprodukte des *sarA*-locus können zudem an den *agr*-Promotor anbinden und damit den *agr*-locus aktivieren und somit Einfluss auf die Proteinexpression nehmen (Chien und Cheung, 1998). Eine Deletion des *sae*-locus führt zu einer verringerten Produktion von u. a. Koagulase, Protein A (Giraud *et al.*, 1994) und Eap (Harraghy *et al.* 2005).

Im Folgenden sind die wichtigsten MSCRAMMs und SERAM vorgestellt:

#### **1.4.2.1 Fibrinogen-bindende Proteine (Clumping factor (Clf) A und ClfB)**

Schon seit nahezu 100 Jahren ist die Fähigkeit von *S. aureus* bekannt, in Gegenwart von Blutplasma zu verklumpen (Much, 1908). Hawiger *et al.* (1978, 1982) identifizierten Fibrinogen als das Hauptplasmaprotein, welches daran beteiligt ist. Zuerst wurde die Koagulase als Bindungspartner des Fibrinogens auf *S. aureus* angenommen (Bodén und Flock, 1989), aber 1992 wurde durch McDevitt *et al.* gezeigt, dass Clumping factor und Koagulase sich unterscheiden.

Durch ClfA kann *S. aureus* an immobilisiertes Fibrinogen, an plasmaproteinbehaftete Biomaterialien *ex vivo* und an geschädigte Herzklappen *in vivo* anbinden. Damit spielt er eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*-Infektionen (McDevitt *et al.*, 1994; Moreillon *et al.*, 1995; Vaudaux *et al.*, 1995).

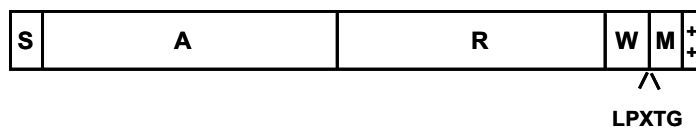
Auch ClfB fördert in der exponentiellen Wachstumsphase von *S. aureus* die Agglutination von *S. aureus* in Gegenwart von Fibrinogen, bindet an immobilisiertes Fibrinogen *in vitro*, und bindet an fibrinogenbeschichtete Polymerschläuche *ex vivo* (Ni Eidhin *et al.* 1998). Als weiteres fördert er die nasale Kolonisation mit *S. aureus* durch eine Bindung an humanes Typ I Cytokeratin 10 (O'Brien *et al.*, 2002)

Beide fibrinogenbindenden Proteine sind sich in ihrem Aufbau sehr ähnlich und haben die klassischen Eigenschaften, die mit MSCRAMMs assoziiert werden (Abb. 1.11). Sie haben N-terminal eine Signalsequenz zur Sekretion, C-terminal befinden sich ein LPXTG-Motiv, eine hydrophobe wand- und membrandurchspannende Domäne und ein positiv geladener Schwanz. ClfA und ClfB sind durch eine Region, als Region R

## 1. Einleitung

---

bezeichnet, charakterisiert. Diese enthält sich wiederholende Aspartat- und Serin-Dipeptide. Die Region R verbindet die zellwanddurchspannende Domäne mit der ligandenbindenden Domäne (Region A). Während sich ClfA und ClfB im allgemeinen Aufbau sehr ähnlich sind, so sind die A-Regionen nur zu 26 % identisch und binden an unterschiedliche Bereiche von Fibrinogen (Ni Eidhin *et al.*, 1998). ClfA bindet an den C-Terminus der  $\gamma$ -Kette (O'Connel *et al.*, 1998) und ClfB bindet an die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Ketten (Ni Eidhin *et al.*, 1998).



**Abb. 1-11: Strukturelle Organisation von ClfA von *S. aureus*.** S, Signal-Peptid; A, Fibrinogen-bindende Region; R, sich wiederholende Serin-Aspartat-Dipeptide; W, Zellwanddurchspannende Domäne; M, Membrandurchspannende Domäne, ++, positiv geladener Schwanz; das LPXTG-Motiv, das für die Verankerung des Proteins zum Zellwand-Peptidoglykan notwendig ist, ist angegeben. (nach Wann *et al.* 2000)

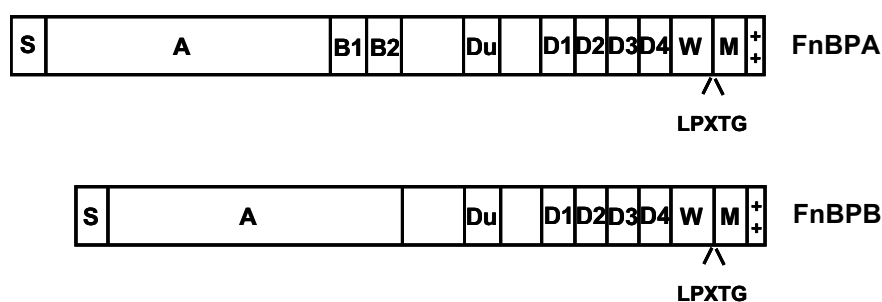
Während der ClfA in allen Wachstumsphasen von *S. aureus* auf den Bakterien zu finden ist, ist ClfB hauptsächlich nur in der frühen exponentiellen Phase präsent. Die Clf-abhängige Anbindung von *S. aureus* an immobilisiertes Fibrinogen kann durch  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  inhibiert werden, was darauf deutet, dass beide Fibrinogen-bindenden Proteine durch eine inhibitorische Kation-Bindungsstelle reguliert werden (Ni Eidhin *et al.*, 1998).

### 1.4.2.2 Fibronectin-bindende Proteine (Fibronectin binding proteins (FnBP))

In den späten 70er Jahren des letzten Jahrhunderts fand Kuusela, dass Fibronectin nicht nur mit eukaryotischen Zellen, sondern auch mit *S. aureus* interagiert (Kuusela, 1978). 1982 wurde ein Fibronectin bindendes Protein aus dem *S. aureus* Stamm Newman isoliert (Espersen und Clemmensen, 1982). Inzwischen sind zwei FnBPs, FnBPA und FnBPB, bekannt, die durch zwei eng verwandte Gene, *fnbA* und *fnbB*, codiert werden (Jönsson *et al.*, 1991). Auch die FnBPs zeigen den typischen MSCRAMM-Aufbau (Abb. 1-12); bestehend aus dem N-Terminus mit der A-Region, der

Zell- und der membrandurchspannenden Domäne und dem LPXTG-Motiv am C-Terminus. Die Fibronectin-bindende D-Region befindet sich am C-terminalen Ende und besteht aus drei tandem repetitiven Sequenzen von 38 Aminosäuren (D1, D2 und D3) und einer inkompletten Sequenz D4 (Jönsson *et al.*, 1991). Es wurde zusätzlich eine fünfte repetitive Sequenz, Du, gefunden, etwa 100 Aminosäurereste N-terminal zu D1 gelegen. Jede D-Einheit kann spezifisch an Fibronectin binden (Massey *et al.*, 2001). Die repetitiven Sequenzen von FnBPA und FnBPB sind zu 94 % in ihrer Aminosäuresequenz identisch, und homologe repetitive Sequenzen wurden auch in von Streptokokken-Arten exprimierten Fibronectin-bindenden MSCRAMMs gefunden (Joh *et al.*, 1994). Bei der A-Region von FnBPA und FnBPB sind nur etwa 40 % der Aminosäuren identisch. Sie ist eine Fibrinogen-bindende Region und bindet an die  $\gamma$ -Kette, genauso wie ClfA. Die Fibrinogenbindung ist aber im Gegensatz zu ClfA nicht durch zweiwertige Kationen reguliert (Wann *et al.*, 2000). Die A-Region von FnBPA und FnBPB fördert zusätzlich zur Fibrinogenbindung die Adhäsion von *S. aureus* an Elastin (Roche *et al.*, 2004). Am C-terminalen Ende der A-Region befinden sich bei FnBPA zwei weitere repetitive Sequenzen, die „B-repeats“. Auch diese Region kann Fibronectin binden (Massey *et al.*, 2001).

Untersuchungen mit Hilfe von Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie bei Hamstern haben *in vivo* gezeigt, dass FnBPA und FnBPB wichtig für die *S. aureus* Anbindung an die Gefäßwand sind (Kerdudou *et al.*, 2006).

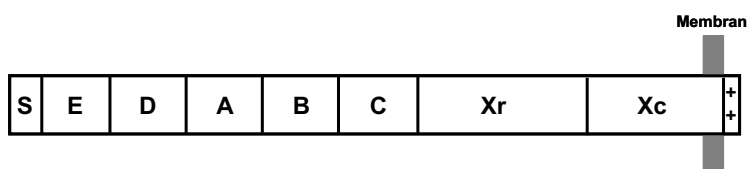


**Abb. 1-12: Strukturelle Organisation von FnBPA und FnBPB von *S. aureus*.** S, Signal-Peptid; A, Fibrinogen-bindende Region; B1 und B2, homologe repetitive Sequenzen mit Fibronectin-bindender Funktion, Du-D4, Fibronectin bindende D-Region aus repetitiven Sequenzen; W, Zellwanddurchspannende Domäne; M, Membrandurchspannende Domäne, ++, positiv geladener Schwanz; das LPXTG-Motiv, das für die Verankerung des Proteins zum Zellwand-Peptidoglykan notwendig ist, ist angegeben. (nach Wann *et al.* 2000)

Die Zellwand-gebundenen FnBPs vermitteln neben der Adhärenz auch die Invasion von *S. aureus* in eine Vielzahl von Säugetierzellen, wie Epithel-, Endothelzellen und Fibroblasten (Sinha *et al.*, 1999; Dziewanoska *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2000). Die FnBPs sind hierbei als Invasionsrezeptoren sowohl notwendig als auch hinreichend. FnBPA und FnBPB können einander ersetzen (Sinha *et al.*, 1999; Sinha *et al.*, 2000). Fibronektin dient als ein Brückenmolekül. Mit dem zentral gelegenen RGD-Motiv bindet das Fibronektin-Monomer an das Integrin  $\alpha_5\beta_1$  der Wirtszelle und andere  $\beta_1$ -Intergrine, die Fibronektin-Rezeptoren sind (Sinha *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2000). An die D-Domänen und auch an die B-Domäne der FnBPs bindet es mit der N-terminalen Heparin-Bindungsstelle (Sinha *et al.*, 1999; Massey *et al.*, 2001). Bei der Invasion ist das Bakterium vermutlich nicht aktiv beteiligt, sondern es erfolgt eine Signaltransduktion vom Wirtszellrezeptor aus zum Zytoskelett der Wirtszelle. Es erfolgt dann über F-Aktin eine Reorganisation der Wirtszelle (Sinha *et al.*, 1999). Innerhalb der Wirtszelle können die Bakterien der Phagozytose durch professionelle Phagozyten (Neutrophile Granulozyten, Makrophagen) entkommen, sie erhalten eine nährstoffreiche Umgebung und sie sind geschützt vor Antibiotika (Sinha *et al.* 1999).

### 1.4.2.3 Protein A (SpA)

Protein A besteht aus 5 repetitiven Sequenzen (E, D, A, B, C), den zellwanddurchspannenden Domänen Xr und Xc und einer 18-20 Aminosäurereste langen hydrophoben membrandurchspannenden Region, die sich distal von der LPXTG-Region befindet (Loefeldahl *et al.*, 1983; Uhlen *et al.*, 1984) (Abb. 1-13).



**Abb. 1-13: Strukturelle Organisation von Protein A von *S. aureus*.** S, Signal-Peptid; E, D, A, B, und C, IgG- und Fibrinogen-bindende Domänen; Xr und Xc, Zellwanddurchspannende Domänen, ++, positiv geladene Aminosäure; (nach Patel *et al.* 1992)

Jede extrazelluläre Domäne kann mit hoher Affinität an die Fc-Region von IgG binden (Moks *et al.*, 1986). Die Fc-bindende Fähigkeit von Protein A wurde lange Zeit als einer der Hauptgründe für die bakterielle Virulenz gesehen, da Protein A mit Phagozytosezellen um vorhandene IgG-Fc-Bindungsstellen konkurriert. Die Folge ist eine verminderte IgG vermittelte Opsonophagozytose (Peterson *et al.*, 1977). Zusätzlich wurde eine weitere Bindungsstelle für Fab-Fragmente von Immunglobulinen (unabhängig von dem Isotyp der schweren Kette) identifiziert (Inganas *et al.*, 1980). Dabei binden die Domänen D und E von Protein A die Fab-Fragmente über die variable (V) Region (Roben *et al.*, 1995). Diese Fv-Bindungsstellen versetzen Protein A in die Lage, membranständiges IgM auf B-Lymphozyten zu vernetzen und damit deren Aktivierung auszulösen (Forsgren *et al.*, 1976). Als weiteres ist Protein A zur Komplementaktivierung fähig (Espersen, 1985; Kozlowski *et al.*, 1996) und kann an den Tumornekrosefaktor- $\alpha$ -Rezeptor 1 (TNFR1) über die IgG-Bindungsdomänen anbinden und diesen aktivieren (Gómez *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2006).

Die direkte Bindung von *S. aureus* an Plättchen ist ein postulierter zentraler Mechanismus in der Pathogenese der infektiösen Endokarditis (Sullam 1994). Mit der Anbindung von Protein A an gC1qR/p33 (Nguyen *et al.*, 2000) wurde eine Bindungsstelle der Plättchen gefunden. Das Protein gC1qR/p33 wird nur gering auf der Oberfläche von ruhenden, wie auch aktivierten Plättchen expremiert, aber die Expremierung steigt stark nach Adhäsion der Plättchen an immobilisiertes Fibrinogen oder Fibronectin an. Auch auf inflammatorisch aktivierten Endothelzellen ist gC1qR/p33 zu finden (Peerschke *et al.*, 1994). Da Plättchen an einem veränderten Herzklappenendothel adhären und aktiviert werden, ist es möglich, dass die Interaktion von Protein A mit gC1qR/p33 zu der bakteriellen Zelladhäsion beiträgt.

VWF kann an *S. aureus* binden (Herrmann *et al.*, 1996). Hartleib *et al.* (2000) haben Protein A als ein vWF bindendes Adhäsins auf der *S. aureus* Oberfläche identifiziert. Dadurch kann es auch als MSCRAMM bezeichnet werden. Mutageneseuntersuchungen haben gezeigt, dass alle 5 Protein A-Domänen vWF binden können. Dabei ist jeweils die gleiche Bindungsregion betroffen wie bei der IgG-Bindung, aber die Bindungsstellen sind nicht identisch. Auf vWF wurden zwei Bindungsregionen identifiziert, D'-D3 und A1 (O'Seaghda *et al.*, 2006). Im Blutgefäßsystem sind die Zellen ständig als Folge des Blutstroms hämodynamischen Scherkräften ausgesetzt. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bindung von *S. aureus* an Plättchen bei hohen Scherkräften ( $>300 \text{ seconds}^{-1}$ ) Protein A vermittelt ist.

Die Interaktion kann dabei direkt über Protein A-gC1qR/p33 oder indirekt über vWF (Protein A-vWF-GPIb/IX oder Protein A-vWF- $\alpha_{11b}\beta_{III}$ ) erfolgen (Pawar *et al.*, 2004; George *et al.*, 2006).

### **1.4.2.4. Extrazelluläres Adhärenz Protein („Extracellular adherence protein“ (Eap))**

Das extrazelluläre Adhärenz Protein (auch als Map (MHC-Klasse-II-analoges Protein) bezeichnet) (McGavin *et al.*, 1993; Jönsson *et al.*, 1995) ist ein meist extrazelluläres Protein. Ihm fehlt das LPXTG-Motiv, das die Verankerung von Protein mit der bakteriellen Zellwand vermittelt, aber ein Teil des sezernierten Proteins kann an die Bakterienoberfläche zurückbinden. (Flock und Flock, 2001). Eap kann außerdem durch eine Eap-Eap Interaktion (Selbstassoziation) an die Bakterienoberfläche binden. Das Zurückbinden ist unabhängig von der endogenen Eap-Produktion. Durch die Zurückbindung an die Bakterienoberfläche und die Eap-Eap Bindung kann Eap *S. aureus* agglutinieren (Hussain *et al.*, 2002). Das sezernierte Eap bindet an vielen Makromolekülen des Wirtes, so z. B. an die  $\alpha$ -Kette von Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Thrombospondin und Prothrombin (McGavin *et al.* 1993; Palma *et al.*, 1999). Dabei ist die Bindung auf molekularer Ebene (monomere Matrixmoleküle) promiskuitiv, aber supramolekulare Strukturen werden gezielt erkannt (Hansen *et al.*, 2006).

Chavakis und Kollegen (2002) konnten zeigen, dass das Endothelzelladhäsionsmolekül ICAM-1 der Hauptwirts“rezeptor“ für Eap ist. Durch an die Bakterienoberfläche gebundenes Eap und die Bindung an ICAM-1 kann die Adhäsion von *S. aureus* an die Gefäßwand vermittelt werden. Außerdem blockiert Eap die akute inflammatorische Antwort gegen *S. aureus* durch Störung der ICAM-1-abhängigen Leukozyten-Endothel Interaktion. Dies könnte ein Grund für die beeinträchtigte Wundheilung bei mit *S. aureus* infizierten Wunden sein (Chavakis *et al.*, 2002; Athanasopoulos *et al.*, 2006). Als weiteres konnte gezeigt werden, dass Eap, neben den FnBPs (Kap. 1.4.2.2) auch eine Rolle bei der Internalisation von *S. aureus* in eukaryotische Zellen spielt (Hagggar *et al.*, 2003).

### **1.4.2.5 Koagulase (Coa)**

Die Koagulasen (auch Staphylokoagulasen genannt) sind extrazelluläre Proteine, die von den meisten *S. aureus* Stämmen produziert wird. Wie bei Eap (Kap. 1.4.2.4) wird



auch sezernierte Koagulase zum Teil wieder an die Bakterienoberfläche zurückgebunden (Boden und Flock, 1989; McDevitt *et al.*, 1992). Die sezernierten ausgereiften Formen der Koagulase Proteine bestehen aus drei unterschiedlichen Regionen: dem N-Terminus, einer zentralen konservierten Region und dem C-Terminus aus 5 bis 8 repetitiven Sequenzen aus 27 Aminosäuren (Phonimdaeng *et al.*, 1990). Der N-terminale Bereich enthält eine Prothrombinbindungsregion. Die Koagulasen binden Prothrombin in einem Verhältnis von 1:1 (Kawabata *et al.*, 1985). Der Koagulase-Prothrombinkomplex wandelt Fibrinogen in Fibrin um. Dabei wird das Prothrombin nicht zu Thrombin gespalten, sondern die Koagulase wirkt als Cofaktor, der eine konformationelle Veränderung im Prothrombin bewirkt, die in der Bildung eines aktiven Komplexes resultiert. Die Koagulasen gehören zu einer neu etablierten Protein-Familie, die „Zymogen-Aktivator und Adhäsions-Protein“ (ZAAP)-Familie (Friedrich *et al.*, 2003). Die Proteine dieser Familie sind bifunktional: durch die N-terminale Domäne wird die Koagulationsfunktion vermittelt, die C-terminale Domäne ist ein Adhäsion für Plasma- oder extrazelluläre Matrixproteine – im Falle der Koagulase für Fibrinogen (Boden und Flock, 1989). Durch die Bindung von Fibrinogen an die Koagulase, die an der *S. aureus* Oberfläche gebunden ist, kann eventuell auch eine Brücke zu Blutplättchen gebildet werden. Eine Bindung von Koagulase an Thrombozyten konnte nachgewiesen werden (Heilmann *et al.*, 2002). VWF wurde als weiterer Bindungspartner für eine Koagulase erkannt (Bjerketorp *et al.*, 2004).

Wegen der prokoagulanten und der Fibrinogen-bindenden Aktivität werden die Staphylokokkenkoagulasen als wichtige Virulenzfaktoren angesehen, aber ihre Bedeutung für Staphylokokkeninfektionen ist noch nicht geklärt. So zeigten Virulenzstudien mit *S. aureus* Koagulase negativen Mutanten im Maus- und im Rattenmodell keine verringerte Virulenz im Vergleich zum *S. aureus* Wildtypstamm (Phonimdaeng *et al.*, 1990; Moreillon *et al.*, 1995). In einem anderen Mausmodell wurde die mögliche Rolle von Koagulase in der Entwicklung einer hämatogenen pulmonalen Infektion gesucht. Hier gaben die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die Koagulasen die Bakterienproliferation in den späten Phasen der Infektion fördern (Sawai *et al.*, 1997.).

### **1.5 Fragestellung und Ziele der Arbeit**

*S. aureus* ist ein wichtiger Krankheitserreger bei intravaskulären Infektionen. Die Anbindung der Bakterien an das Wirtsgewebe ist dabei von großer Bedeutung. Die

Anbindung kann über Adhäsionsproteine des Wirtes, wie z. B. Fibrinogen, vWF, TSP-1 oder Fibronectin, erfolgen. Es wurde gezeigt, dass Adhäsine auf der Oberfläche von *S. aureus* Adhäsionsproteine binden können. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie soll in dieser Arbeit die spezifische Bindung von löslichen Adhäsionsproteinen an *S. aureus* geprüft und eventuelle Unterschiede bei der Bindung an verschiedene *S. aureus* Wildtypstämme mit unterschiedlicher Adhäsinszusammensetzung auf der Oberfläche aufgedeckt werden. Des Weiteren soll unter Verwendung von spezifischen Deletionsmutanten untersucht werden, inwieweit einzelne *S. aureus*-Adhäsine für die Bindung von löslichen Adhäsionsproteinen von Bedeutung sind.

Die Thrombozyten haben eine ambivalente Rolle bei der Entwicklung einer Endokarditis. Zum einen bieten sie den Bakterien eine Oberfläche zur Anbindung, zum anderen können Bakterien wie *S. aureus* aber auch durch die Freisetzung von mikrobizidalen Proteinen bekämpft werden. Um zu erkennen, welche Rolle der Thrombozyten von größerer Bedeutung ist, bzw. in welchen Fällen welche Rolle überwiegt, ist eine genaue Kenntnis der Mechanismen nötig, die der Adhäsion zu Grunde liegen. Deshalb ist es von besonderem Interesse in dieser Arbeit, Plättchen-abhängige Faktoren zu untersuchen, die bei der *S. aureus*-Plättchen-Assoziation von Bedeutung sein könnten. So soll geprüft werden, ob sich die Assoziationsrate nach unterschiedlicher Plättchenaktivierung (durch Thrombin, ADP oder TRAP) unterscheidet. Des Weiteren soll der Einfluss einiger Adhäsionsproteine auf die Bakterien-Plättchen-Assoziation untersucht werden. Außerdem ist es eine Aufgabe in dieser Arbeit, mit Hilfe von spezifischen MSCRAMM-Deletionsmutanten von *S. aureus* zu prüfen, ob bestimmten Adhäsine eine besondere Bedeutung in der *S. aureus*-Plättchen-Interaktion zukommt. Auch die Fähigkeit von *S. aureus*, die Plättchenaggregation auszulösen, soll untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Assoziation von Plättchen mit *S. aureus* mit der eines anderen gram-positiven Bakteriums, *Streptococcus pneumoniae*, zu vergleichen. Über die Interaktion von *S. pneumoniae* mit Plättchen ist bisher wenig bekannt, und es soll festgestellt werden, ob Mechanismen, die der *S. aureus*-Plättchen-Assoziation zu Grunde liegen, auch für die Bindung von *S. pneumoniae* an Plättchen gelten.

Syndecane sind Transmembranproteine, die unter anderem in der Plasmamembran von Plättchen vorkommen. Ihre Heparansulfat-Ketten erlauben Interaktionen mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen, so auch mit TSP-1 und Fibronectin. Um herauszufinden, ob Syndecane die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation vermitteln, soll die Anbindung von *S. aureus* an Plättchen von Syndecan-1- und Syndecan-4-knock-out Mäusen durchflusszytometrisch untersucht werden.

Staphylokokken können nicht nur an Thrombozyten binden, sondern diese auch aktivieren. Die Fragestellung ist, ob Staphylokinase mit Staphylokinase-Antikörpern einen Komplex bildet, der an den FcRIIa-Rezeptor der Plättchen bindet und diesen dadurch aktiviert. Falls dies der Fall ist, müssten sich Plättchen durch *S. aureus* aktivieren lassen, wenn Antikörper gegen Staphylokinase vorliegen. Darum sollen Kaninchen mit Staphylokinase immunisiert werden und die Aktivierbarkeit der Kaninchenplättchen durch *S. aureus* vor und nach Immunisierung getestet werden.

Schließlich ist in dieser Arbeit auch die *S. aureus*-Endothelinteraktion von besonderem Interesse. *S. aureus* kann besser endovaskuläres Gewebe besiedeln und in dieses einwandern als andere Bakterienarten. Innerhalb der Endothelzellen können die Bakterien geschützt vor dem Immunsystem des Wirtes und Antibiotika persistieren und sich vermehren. Für die Anbindung und die Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen *in vitro* wurden schon einige Mechanismen beschrieben. So kann *S. aureus* über eine Fibronectin-Brücke zwischen *S. aureus* FnBP und dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  anbinden. In dieser Arbeit soll mit einer durchflusszytometrischen Methode der Einfluss von Fibrinogen, Fibrin, TSP-1 und Plättchen auf die Anbindung bzw. die Invasion von *S. aureus* an bzw. in Endothelzellen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences, Freiburg, Bio-Rad (München), Calbiochem (Bad Soden), Fluka (Neu-Ulm), Life Technologies (Karlsruhe), ICN (Meckenheim), Loxo (Dossenheim), Merck (Darmstadt), PAA (Cölbe), Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

### 2.2 Geräte

#### Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer: FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Computer: Macintosh G4 (Apple Computer GmbH, München)
- Betriebssystem: MacOS 9 (Apple Computer GmbH, München)
- Steuer- und Auswerteprogramme: FACSCalibur und CellquestPro (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Drucker: Tektronix Phaser 750 (Xerox, Neuss)

#### Zentrifugen

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

#### Chromatographiegeräte

- Photometer und optische Einheit: UV1 (Pharmacia, Freiburg)
- Peristaltische Pumpe: P1 (Pharmacia, Freiburg)
- Fraktionssammler: FRAC-100 (Pharmacia, Freiburg)
- Fraktionssammler: Model 2110 (Bio-Rad, München)
- Zwei-Kanal-Schreiber: REC102 (Pharmacia, Freiburg)

#### Aggregometrie

- Lumi-Aggregometer/P.I.C.A. (Chrono-Log, Nobis, Endingen)

### **Elektrophoresegeräte**

- Vertikalelektrophoresekammer: SE250 (Hoefler, USA.)
- Vertikalelektrophoresekammer: SE600 (Hoefler, USA.)
- Kühlung: LKB2219 Multitemp II (Pharmacia LKB, Schweden)
- Netzgeräte: LKB197, LKB2103 (Pharmacia, LKB, Schweden)
- Gelrockner: 543 (Bio-Rad, München)

### **ELISA**

- Photometer: MRX (Dynatech, Denkendorf)

### **Zellkulturgeräte**

- CO<sub>2</sub>-Brutschrank: Biocenter 2001 (Tecnomara-Integra, Fernwald)
- Inverses Mikroskop: IM (Zeiss, Oberkochen)
- Sterilbank: Gelaire TC60 (Flow Laboratories, Meckenheim)

### **Sonstige Geräte**

- Analysenwaage: AE50 (Mettler-Toledo, Schweiz)
- Autoklav/SPA (Tecnomara-Integra, Fernwald)
- Waage: 2355 (Sartorius, Göttingen)
- Brutschrank: T6060 (Heraeus, Hanau)
- Eismaschine: Scotsman AF10 (Fisher Scientific, Nidderau)
- Fraktionssammler: Model 2110 (BioRad, München)
- MoFlo High-Performance Cell Sorter (Dako-Cytomation, Hamburg)
- Phasenkontrastmikroskop: Axioskop (Zeiss, Oberkochen)
- Fluoreszenzmikroskop: Axioskop (Zeiss, Oberkochen) mit einem Dreifachfiltersystem (TRITC-Filter (rot), Doppelfilter (rot-grün), FITC-Filter (grün))
- pH-Meter: pH523 (WTB, Weilheim)
- Photometer: Ultrospec 2000 (Amersham Biosciences, Freiburg)
- Ultraschallgerät: Model 250 Sonifier (Branson Inc., Danbury, U.S.A.)
- Wasseraufbereitungsanlage: Elix10 und Milli-Q-biocel (Millipore, Eschborn)
- Zellzählgerät: System 9000 (Serono Baker Diagnostics, U.S.A.)
- Schüttler: IKA-Schüttler MTS4 (IKA-Labortechnik, Staufen)

### 2.3. Verwendete Antikörper

Antigen	Spezifität	monoklonal/ polyklonal (Spezies)	Klon- Name	Konjugation	Bezugsquelle
GPIIb/IIIa- Komplex (CD41/CD61)	human	m. Maus	P2	FITC	Immunotech, Hamburg
GPIIIa (CD61)	Maus	m. Hamster	2C9.G2	PE	BD, PharMingen, Heidelberg
GPIX (CD42a)	human	m. Maus	ESS	PE	Exalpha, Natutec, Frankfurt a.M.
GP IX (CD42a)	human	m. Maus	ALMA.16	PE	BD, PharMingen, Heidelberg
P-Selektin (CD62P)	human	m. Maus	CLB- thromb/6	FITC	Immunotech, Hamburg
P-Selektin (CD62P)	human	m. Maus	CRC81	PE	Caltag Laboratories, Hamburg
IgG	Kaninchen	p. Ziege		Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Niederlande
IgG	Kaninchen	p. Ziege		Alexa Fluor 568	Molecular Probes, Niederlande

### 2.4 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften	Quelle oder Referenz
<i>S. aureus</i> Newman	Clumping factor und Koagulase reicher, FnBP negativer Laborstamm	ATCC 25904
<i>S. aureus</i> Cowan 1	Protein A reicher Laborstamm	ATCC 12598
<i>S. aureus</i> 8325-4	Laborstamm mit verminderter Clf A Exprimierung	Novick 1967
<i>S. aureus</i> Wood 46	Protein A negativ (arm)	ATCC 10832
<i>S. aureus</i> DU5873	Protein A negative Newman Mutante	Hartleib <i>et al.</i> , 2000
<i>S. aureus</i> DUNew/253	Protein A negative Newman Mutante, Protein A komplementiert	Hartleib <i>et al.</i> , 2000
<i>S. aureus</i> DU5875	Protein A negative 8325-4 Mutante	Hartleib <i>et al.</i> , 2000
<i>S. aureus</i> DU83/253	Protein A negative 8325-4 Mutant, Protein A komplementiert	Hartleib <i>et al.</i> , 2000

<i>S. aureus</i> DU5852	Clumping factor A1 negative Newman Mutante	McDevitt <i>et al.</i> , 1994
<i>S. aureus</i> DU5926	Clumping factor A2 negative 8325-4 Mutante	Dr. T. Foster, Dublin, Irland
<i>S. aureus</i> DU5943	Clumping factor B negative Newman Mutante	Eidhin <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i> DU5944	Clumping factor A and B negative Newman Mutante	Eidhin <i>et al.</i> , 1998
<i>S. aureus</i> DU5855	Koagulase negative Newman Mutante	Dickinson <i>et al.</i> , 1995
<i>S. aureus</i> ISP479C	Thrombin-induziertes „platelet microbicidal protein“ (tPMP) empfindliche ISP479 Mutante	Dhawan <i>et al.</i> , 1997
<i>S. aureus</i> ISP479R	tPMP resistente ISP479 Mutante	Dhawan <i>et al.</i> , 1997
<i>S. aureus</i> AH12	EAP negative Newman Mutante	Hussain <i>et al.</i> , 2002
<i>S. aureus</i> 4074	aus Endokarditis-Patient isolierter Stamm	Heilmann <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> TG1	keine Adhesin-Expression	ATCC 25922
<i>S. carnosus</i> TM300	keine Adhesin-Expression	Schleifer und Fischer, 1982
<i>S. carnosus</i> (pFNBA4)	<i>S. carnosus</i> TM300 mit FnBPA-Expression	Sinha <i>et al.</i> , 2000
<i>S. carnosus</i> (pFNBB4)	<i>S. carnosus</i> TM300 mit FnBPB-Expression	Sinha <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptococcus pneumoniae</i> P37	Serotyp 35 A, schwach bekapselter Stamm	NCTC 10319 Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptococcus pneumoniae</i> P51	Serotyp 2, schwach bekapselter Stamm	ATCC 11733 Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	bekapselter Wildtyp-Stamm	Avery <i>et al.</i> , 1944

## 2.5. Anzucht und Präparation der Bakterien

### 2.5.1 Anzucht der Bakterien

Alle verwendeten *S. aureus* Stämme wurden in Hirn-Herz-Bouillon (Brain-Heart-Infusion, BHI-Medium; Merck, Darmstadt), die 30% Glycerin enthielt, aufbewahrt. Zur Verwendung wurden die Stämme im Dreißenausstrich auf Blutagarplatten (Columbia Agar + 7% Schafsblut; Becton Dickinson, Heidelberg) überimpft und über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden die Stämme bei 4°C aufbewahrt. Um die in *S. aureus* Mutanten-Stämme eingeführten Plasmide zu erhalten, wurden diese auf TSA-Platten (Tryptic-Soy-Agar; Becton Dickinson, Heidelberg) kultiviert. Diese Platten waren

## 2. Material und Methoden

---

entsprechend der Antibiotikaresistenz der Mutanten mit 10 µg/ml Antibiotika versetzt. Alle drei bis vier Wochen wurden sämtliche Stämme überimpft. Für die meisten Experimente wurden frische Übernachtskulturen der Stämme verwendet. Dazu wurde jeweils eine Bakterien-Kolonie von einer Agar-Platte in 5 ml BHI-Medium über Nacht bei 37°C bebrütet. Für einige Experimente wurden Bakterien aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Hierfür wurden die Bakterien in BHI-Medium aufgenommen und die Suspension auf eine  $OD_{600}=0,1$  eingestellt. Das Wachstum bei 37°C und Schütteln wurde mittels OD-Messungen verfolgt.

### Lösung:

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

Die Anzucht der verwendeten *Streptococcus pneumoniae*-Stämme erfolgte bei 37°C im Schüttelinkubator in Todd-Hewitt-Broth (Oxoid, Basingstoke, England), welches mit 0,5 % Hefeextrakt angereichert wurde. Für die Versuche wurden nur Bakterien aus der mittleren log-Phase ( $OD_{600}=0,3-0,4$ ) verwendet.

### Lösung:

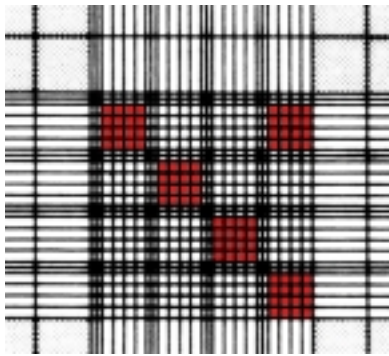
- THY-Medium	Todd Hewitt Broth	36,4 g/l
pH 7,8	Hefeextrakt	5 g/l
	gelöst in Aqua dest.	

### **2.5.2 Bestimmung der Bakterienzahl**

Die Bakterien im Kulturmedium (entweder aus Übernachtskultur oder aus der logarithmischen Wachstumsphase) wurden mit 2500xg bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit Puffer-Lösung resuspendiert und wieder auf das vorherige Volumen aufgefüllt. Um eine Vereinzelnung der Mikroorganismen zu erreichen, wurden diese in 5 Zyklen für je eine Sekunde bei 50 Watt im Ultraschallgerät behandelt. Bei *Streptococcus pneumoniae* wurde auf eine Ultraschallbehandlung verzichtet, um die Bakterien zu schonen. Die Bestimmung der



Bakterienzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer mittels Phasenkontrastmikroskopie. Hierzu wurden die zuvor behandelten Bakterien 1:100 verdünnt und im mittleren Quadrat der Neubauer-Kammer 5 Gruppenquadrate aus je 16 Kleinstquadraten ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:



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

**Abb. 2-1: Neubauer-Zählkammer;** rot unterlegte Flächen zeigen die 5 Gruppenquadrate aus je 16 Kleinstquadraten an, die ausgezählt wurden.

## 2.6 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden suspendierte Einzelzellen bzw. Partikel an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbeigeführt und ihre optischen Eigenschaften gemessen und analysiert. Durch die Anregung mittels des Lasers können Streulichteigenschaften von Zellen, wie Zellgröße und Zellgranularität sowie Fluoreszenzeigenschaften simultan detektiert werden. Es sind Partikel mit einem Durchmesser von weniger als 0,5  $\mu\text{m}$  unterscheidbar und es können mehr als zehntausend Zellen in weniger als einer Minute auf ihre Parameter hin erfasst werden.

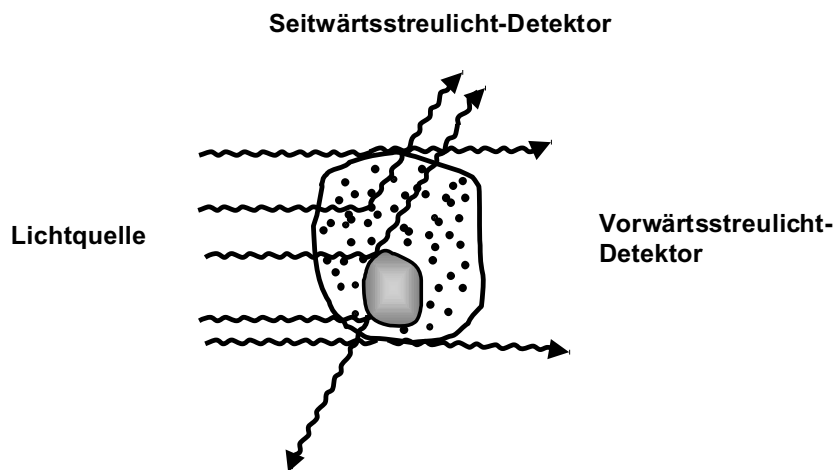
Zur Analyse wird die Probensuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messkammer transportiert. Dort werden die Zellen oder Partikel von einer Trägerflüssigkeit, durch die eine laminare Strömung erzeugt wird, erfasst, so dass der gemeinsame Focus von Anregungslicht und Nachweisoptik (Kreuzpunkt) passiert wird. Der Abstand zwischen dicht aufeinanderfolgenden Zellen in der Trägerflüssigkeit wird so vergrößert, dass immer nur eine Zelle den Kreuzpunkt passiert (hydrodynamische Fokussierung).

Der in dieser Arbeit verwendete FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) ist mit einem luftgekühlten Argonionenlaser ausgestattet, der blaues Licht mit einer

## 2. Material und Methoden

Wellenlänge von 488 nm entsendet und einem weiteren Laser (rote Diode, 633 nm). In dieser Arbeit wurde nur der Argonionenlaser genutzt. Mit ihm können Fluorochrome wie z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll (PerCP) und Propidium-Jodid (PI) angeregt werden. Für die Markierung der Bakterien wurde der Nukleinsäurefarbstoff Syto 13 (MoBiTec, Göttingen) verwendet, dessen Absorptions- und Emissionsspektrum dem des FITC entspricht. Die Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome sind so unterschiedlich (z.B. Emissionsmaximum FITC 530nm und Emissionsmaximum PE 570 nm), dass jedes Fluoreszenzsignal durch getrennte Detektoren erfasst werden kann. Dadurch ist eine simultane Messung verschiedener Fluorochrome möglich.

Passiert eine Zelle den Laserstrahl wird das auftreffende Licht je nach Größe der Zelle und zellinnerer Komplexität wie Zellmembranbeschaffenheit, Nukleus oder Granula gestreut. Die charakteristische Streuung des Lichtes wird dabei in Vorwärtsstreulicht (FCS) und Seitwärtsstreulicht (SSC) aufgetrennt. Beim Vorwärtsstreulicht ist die Lichtbeugung dabei proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße) und wird entlang der Achse des einfallenden Lichtes von einer Photodiode detektiert. Das Seitwärtsstreulicht ist proportional zur Zellgranularität oder inneren Komplexität der Zelle. Es wird in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen.

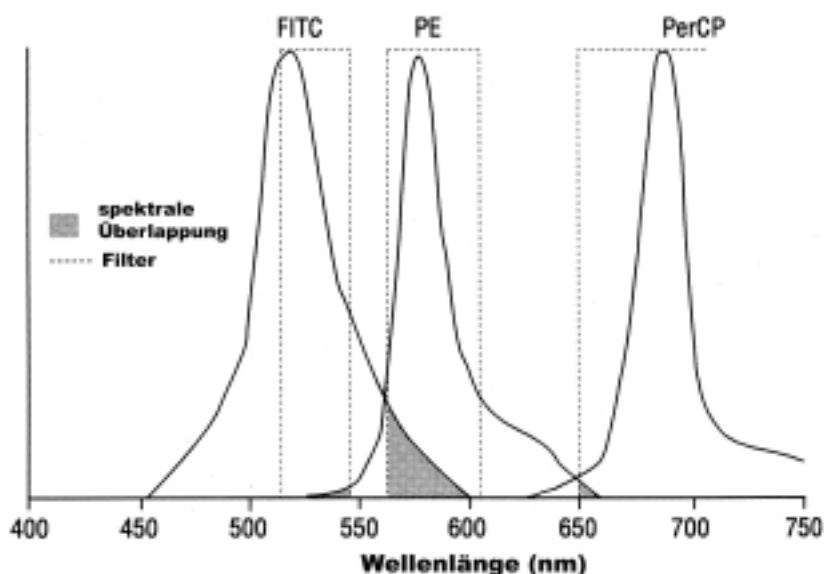


**Abb. 2-2:** Passiert ein Laserstrahl eine Zelle wird das auftreffende Licht in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht aufgetrennt und von dem jeweiligen Detektor detektiert. Um z. B. unterschiedliche Zelltypen in einer Probe zu detektieren, oder um Aktivierungszustände über Antigenpräsentation zu messen, werden Zellantigene mit geeigneten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Die Fluorochrome absorbieren das Anregungslicht und emittieren Fluoreszenzlicht mit einer charakteristischen Wellenlänge.

Das Seitwärtsstreulicht und das emittierte Fluoreszenzlicht werden zu Photomultiplier-Röhren gelenkt, in denen es in ein elektronisches Signal verwandelt und verstärkt wird.

Das Vorwärtsstreulicht wird von einer Photodiode detektiert. Alle Signale werden über ein System von Spiegeln und optischen Filtern zu ihren Detektoren geleitet. Die Spezifität eines Detektors für ein bestimmtes Fluoreszenzsignal wird durch Filter vor den Photomultiplier-Röhren optimiert. In einem Durchflusszytometer mit einem Argon-Laser existieren vier Filter: Für das Seitwärtsstreulicht ein 488/10-BP ("bandpass")-Filter, für FITC-Konjugate ein 530/30-BP-Filter, für PE-Konjugate ein 585/45-BP-Filter und für PerCP bzw. PI-Markierungen ein 620 LP ("longpass")-Filter. Durch diese Filter und die unterschiedlichen Detektoren können also gleichzeitig fünf Parameter einer Zelle bzw. eines Partikels bestimmt werden.

Obwohl die Filter nur relativ schmale Wellenlängenbereiche zu den Photomultiplier-Röhren durchlassen, überlappen sich die Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome. Um nicht falsche Ergebnisse zu erhalten, wenn die Zellen oder Partikel in der Probe mit mehreren Fluorochromen markiert sind, ist eine Signal-Kompensation notwendig, die elektronisch die überlappenden Fluoreszenzsignale voneinander subtrahiert.



**Abb. 2-3: Emissionsspektren von FITC, PE und PerCP** (Handbuch für FACSCComp-Software, Becton Dickinson, 1996)

## 2. Material und Methoden

---

Um elektronisches Grundrauschen und nicht für die Messung erwünschte Zellfragmente von den zu untersuchenden Zellen/Partikeln zu trennen, wurde ein Schwellenwert über den FSC gesetzt.

Die detektierten Signale können entweder im linearen oder logarithmischen Modus verstärkt werden. Kleine Zellen mit schwachen Signalen wie z. B. Thrombozyten oder Bakterien wurden sowohl im FSC als auch im SSC im logarithmischen Modus gemessen, da Signale mit geringer Intensität in diesem Modus gespreizt und Signale mit hoher Intensität gestaucht werden. Endothelzellen wurden auf Grund ihrer Zellgröße im linearen Modus gemessen. Die Verstärkung der Immunfluoreszenzen erfolgte logarithmisch, da sich hier die Populationen um mehrere Größenordnungen voneinander unterscheiden können, und der Messbereich im logarithmischen Modus größer als im Linearmodus ist.

Die analogen Signale werden digitalisiert. Dabei wird bei dem in dieser Arbeit benutzten Durchflusszytometer die registrierte Signalintensität für jeden gemessenen Parameter mit einem Analog-zu-Digitalumwandler auf 1024 (0-1023) Kanäle aufgeteilt. Die so erfassten Daten können dann mit Hilfe eines Datenverarbeitungsprogrammes (CellquestPro) analysiert werden.

Zur Darstellung und Auswertung der Daten existieren mehrere Möglichkeiten. So wurde z. B. zur Unterscheidung einzelner Zellpopulationen die Zweiparameterdarstellung in Form eines Punktehistogramms („Dot-plot“) herangezogen. Hierbei können z. B. SSC gegen den FSC, oder aber auch Fluoreszenzen unterschiedlicher Wellenlängen gegeneinander oder gegen den FSC oder SSC aufgetragen werden. Zur Auswertung einzelner Signale, wie z. B. der Intensität des FITC-Signals (z. B. die Bindung von FITC markiertem Fibrinogen oder vWF an Zellen) wurde die Einparameterdarstellung gewählt. Hierbei wird die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Zahl der Kanäle (Abszisse) in einem Histogramm aufgetragen.

Die Vorauswahl bezüglich bestimmter Eigenschaften wird als sogenanntes Gating bezeichnet. Dabei wird im Software-Fenster eine Grenze („Gate“) um bestimmte Zellpopulationen gelegt, welche dann von den anderen Zellen separiert betrachtet und ausgewertet werden können.

Bei der Einparameterdarstellung wurde für die statistische Auswertung der Median der Signalintensität bestimmt. Er entspricht der Verteilungsklasse, bei der 50 % der

Werteverteilung darüber und 50 % darunter liegen. Er gibt eine gute Abschätzung des Signalwertes der Hauptpopulation von Zellen, da er von den Signalen von „Ausreißern“ (fragmentierte Zellen oder Zellaggregate) am wenigsten beeinflusst wird. Bei z. B. der Bestimmung von Bakterien-positiven Plättchen in der Zweiparameterdarstellung wurde eine prozentuale Auswertung der unterschiedlichen Zellpopulationen vorgenommen.

### **2.7 Bindung von plasmatischen Adhäsionsproteinen an *S. aureus***

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Bindung von Fibrinogen, TSP-1, vWF oder Fibronectin an *S. aureus* wurden die Adhäsionsproteine wie in Kap. 2.22 beschrieben mit Fluoresceinisothiocyanat markiert.

*S. aureus* aus der Übernachtskultur wurden auf eine Keimzahl von 120.000/µl mit TBS-Puffer (+2mM CaCl<sub>2</sub> bei Untersuchung der Bindung von TSP-1 an *S. aureus*) eingestellt und für 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln mit einer aufsteigenden Konzentration des zu untersuchenden FITC-gekoppelten Proteins (10-200 µg/ml Fibrinogen-FITC, 5-125 µg/ml TSP-1-FITC, 10-200 µg/ml vWF-FITC, 10-150 µg/ml Fibronectin) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Puffer versetzt, bei 2500xg und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Bakterien wieder in 1 ml TBS-Puffer (z. T. mit CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und zur Vereinzellung mit Ultraschall behandelt. Die Veränderung der Bindung der Adhäsionsproteine mit aufsteigender Konzentration des zugesetzten Proteins konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie detektiert werden. Die Bakterienpopulation wurde dazu in der Zweiparameterdarstellung, in der der SSC gegen den FSC aufgetragen wurde, identifiziert und ein Gate um die Hauptpopulation gelegt. Durch das „Gating“ wurden nur heile, vereinzelte Bakterien (5000/Messung) untersucht. In der Einparameterdarstellung wurde der Median der Signalintensität des FITC-Signals (1. Fluoreszenz) bestimmt. Um die Eigenfluoreszenz der Bakterien unberücksichtigt zu lassen, wurde die Verstärkung so eingestellt, dass der Median der unmarkierten Keime zwischen einem Wert von 20-30 Channelvalues in der logarithmischen Darstellung lag.

## 2. Material und Methoden

---

### Lösung:

TBS-Puffer:	TRIS	10 mM
pH 7.4	NaCl	150 mM
Zusatz:	CaCl <sub>2</sub>	2 mM

Zur Untersuchung, ob die Adhäsine auf der Oberfläche von *S. aureus* notwendig für die volle Bindung von Adhäsionsproteinen an *S. aureus* sind, wurden die Adhäsine durch Proteinase K-Behandlung entfernt. Proteinase K ist eine Protease mit endo- und exoproteolytische Aktivität.

Für den Versuch wurde *S. aureus* Cowan 1 auf eine Keimzahl von 1.000.000 K/μl eingestellt und diese Bakterien anschließend pelletiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml TBS aufgenommen, das 500 μg Proteinase K enthielt. Die Bakterien wurden darin für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 30 μl Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (0,1 M) gestoppt und die Protease durch zweimaliges Waschen der Bakterien mit TBS + 2 mM CaCl<sub>2</sub> entfernt (2500xg, 4°C). Anschließend wurde die Keimzahl mit Kalzium-haltigen TBS auf 120.000 K/μl eingestellt und die Bindung von Fibrinogen-FITC und TSP-FITC (jeweils 50 und 100 μg/ml) an *S. aureus*, wie schon zuvor beschrieben, untersucht.

Um zu untersuchen, ob Fibrinogen mit TSP-1 und vWF um die Bindung an die selben Adhäsine konkurriert, wurde *S. aureus* 8325-4 mit 150 μg/ml FITC-markierten Fibrinogen, 150 μg/ml FITC-markierten TSP-1 bzw. 100 μg/ml FITC-markierten vWF zusammen mit einem Überschuss an unmarkierten Fibrinogen (bis zu 10.000 μg/ml) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min und einem Waschschrift wurde die Bindung der FITC-markierten Protein an *S. aureus* wie oben beschrieben durchflusszytometrisch untersucht.

### Lösungen:

- Phenylmethylsulfonyl-Fluorid: Stammlösung 0,25 mM
- TBS-Puffer: s. Kap. 2.7

## 2.8 Präparation der Thrombozyten

### 2.8.1 Plättchenisolierung durch Zentrifugation

Die verwendeten Thrombozyten wurden aus frischem Vollblut gewonnen, welches freiwilligen Spendern abgenommen wurde. Die Blutspender hatten mindestens 14 Tage lang vor der Blutspende keine Medikamente eingenommen, welche die Plättchenfunktion beeinflussen. Das Blut wurde mittels eines „Butterfly“-21G-Venenpunktionsbesteckes (Venofix/Braun, Melsungen) venös entnommen, und für die meisten Experimente mit Natriumcitratlösung (110mM im Verhältnis 1:10) antikoaguliert. Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurde durch 10 minütige Zentrifugation mit 190xg bei Raumtemperatur von den anderen Blutbestandteilen wie Erythrozyten und Leukozyten getrennt und konnte „abpipettiert“ werden.

Bei Kaninchen wurde das Blut mittels eine „Butterfly“-23G-Venenpunktionsbesteckes (Venofix/Braun, Melsungen) aus einer marginalen Ohrvene entnommen. Das Vollblut wurde mit Natriumcitratlösung (110mM im Verhältnis 1:10) antikoaguliert. Zur Gewinnung von PRP wurde das Vollblut mit 200xg 10min bei RT zentrifugiert.

Zur Gewinnung muriner Thrombozyten wurden folgende Mäusestämme von Martin Götte, Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster, verwendet: Syndecan-knockout Mäuse vom Stamm Black 6 und Wildtyp Black 6 Mäuse. Die Gewinnung des Vollblutes aus Mäusen erfolgte durch Abnahme von ca. 300 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenkomplex mittels einer Glaspipette. Um ein Anheften von Blutplättchen an die Glasoberfläche zu verhindern, wurde diese zuvor silanisiert. Zur Gewinnung hoher Konzentrationen an murinen Thrombozyten wurde das Blut zunächst mit PBS im Verhältnis 2:1 oder 1:1 verdünnt. Aufgrund der geringeren Größe muriner im Vergleich zu humanen Thrombozyten erfolgte die Zentrifugation für 8 min bei 150xg. Das PRP konnte „abpipettiert“ werden.

#### Lösungen:

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

### 2.8.2 Erstellung von Plättchen-armen Plasma

Zur Erstellung von Plättchen-armen Plasma (platelet poor plasma, PPP) wurde das wie unter Kap. 2.8.1 beschrieben gewonnene Vollblut für 10 min bei 2500xg zentrifugiert. Der klare Überstand ist das Plättchen-arme Plasma.

### 2.8.3 Abtrennung der Thrombozyten von Plasmaproteinen mittels Gelfiltration

Um die Thrombozyten möglichst schonend von den Plasmaproteinen zu trennen, wurde das aus 20 ml Vollblut gewonnene PRP (Kap. 2.8.1) gelfiltriert. Als Säulenmaterial wurde Sepharose 2B (Pharmacia, Freiburg) verwendet, welche mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und luftblasenfrei in eine silanisierte Glassäule (V = 50 ml) gefüllt wurde. Die Säule wurde vor dem Auftragen des PRPs mit Hepes-Tyrode Puffer pH 7,4 äquilibriert. Dem Hepes-Tyrode-Puffer wurde zusätzlich 0,5 % BSA zugesetzt und Apyrase (Grad VIII, Sigma, Taufkirchen). Das Enzym Apyrase verhindert eine ADP-induzierte Plättchenaktivierung. Bei der Gelfiltration werden die Bestandteile des PRPs nach ihrer Größe aufgetrennt; die Thrombozyten können als trübe Suspension vor den löslichen Plasmabestandteilen aufgefangen werden.

#### Lösung:

-Hepes-Tyrode-Puffer:	NaCl	140 mM
pH 7,4	KCl	2,7 mM
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42 mM
	NaHCO <sub>3</sub>	12 mM
	D(+)-Glukose	5,5 mM
	Hepes	5 mM
Zusatz:	BSA	0,5 % (w/v)
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	Apyrase (Grad VII)	0,1 U/ml

### 2.8.4 Bestimmung der Thrombozytenkonzentration

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte mittels des Zellzählgerätes System 9000 (Serono, USA). Hierzu wurden 40 µl der zu zählenden Probe in 10 ml „Rinse“-Puffer (Mallinckrodt Baker, Griesheim) verdünnt und die Zellzahl nach Angaben des



Herstellers im Gerät ermittelt. Die Thrombozytenkonzentration wurde dabei in Zellen pro  $\mu\text{l}$  angegeben.

### **2.9 Bakterien-Plättchen-Assoziation**

#### **2.9.1 Markierung der Bakterien mit Syto 13**

Für Versuche zur Bakterien-Plättchen-Assoziation wurden die Bakterien auf eine Keimzahl von 250.000 Keime/ $\mu\text{l}$  mit TBS eingestellt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Dazu wurde der Bakteriennukleinsäurefarbstoff Syto 13 (MoBiTec, Göttingen) in einer Konzentration von 2  $\mu\text{M}$  verwendet. Die Bakterien wurden 10 min lang bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln mit dem Farbstoff inkubiert. Wurde *Streptococcus pneumoniae* verwendet, wurde die Keimzahl auf 350.000 Keime/ $\mu\text{l}$  eingestellt und die Inkubation mit Syto13 erfolgte über 30 min. Anschließend wurden die Proben zur Entfernung des überschüssigen Farbstoffes durch Zugabe von Puffer im Verhältnis 1:1 gewaschen und bei 2500xg für 10 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Bakterien auf das Anfangsvolumen mit TBS aufgefüllt und resuspendiert. Um bei der Zentrifugation entstandene Aggregate zu lösen, erfolgte eine erneute Ultraschallbehandlung der Zellen (5 Zyklen, 1 sec, 50 Watt). Auch hier wurde *Streptococcus pneumoniae* nur leicht geschüttelt und nicht beschallt.

#### **2.9.2 Markierung der Thrombozyten zur Bestimmung der Bakterien-Plättchen-Assoziation**

Das wie in Kap. 2.8.1 beschrieben hergestellte PRP wurde auf eine Zellzahl von 25.000 Tz/ $\mu\text{l}$  mit PBS pH 7,4 eingestellt. Die Plättchen wurden mit 5  $\mu\text{l}$ /100  $\mu\text{l}$  Probe PE gekoppelten Antikörper gegen GPIX (CD42a) (Klon Alma.16, BD), einem Plättchen spezifischem Glykoprotein, markiert. Bei murinen Plättchen wurde ein gegen das Integrin  $\beta_3$  gerichteter Antikörper (CD61-PE, Klon 2C9.G2) in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet. Die Inkubation mit dem Antikörper erfolgte 30 min lang bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln.

#### **2.9.3 Koinkubation der Thrombozyten mit Bakterien**

Die zuvor markierten Thrombozyten wurden mit den mit Syto 13 markierten Bakterien in einem Volumenverhältnis von 1 zu 1 (Thrombozytenzahl zu Keimzahl = 1 zu 10) für 10 min koinkubiert. Nach der Koinkubation wurde den Proben PBS-Puffer zugesetzt, damit

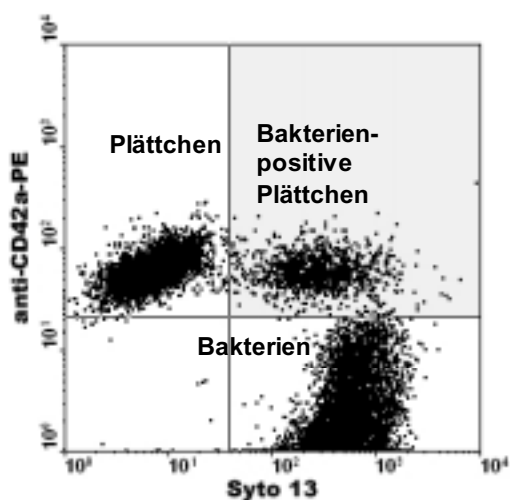
## 2. Material und Methoden

---

das für die Durchflusszytometrie mindest notwendige Probenvolumen von 300 µl erreicht wurde.

### 2.9.4 Durchflusszytometrische Ermittlung der Bakterien-Plättchen-Assoziat

Da die Thrombozyten und die Bakterien mit Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Emissionsmaxima markiert waren, konnten die beiden Zellpopulation im Durchflusszytometer klar unterschieden werden. Die Identifizierung der Bakterien mit dem Syto 13 Fluorochrom erfolgte über die Fluoreszenz 1, die Identifizierung der PE-markierten Thrombozyten über die Fluoreszenz 2. Durch „gaten“ in der Zweiparameterdarstellung konnte die Plättchenpopulation von der Bakterienpopulation getrennt werden. Durch Korrelation der beiden Fluoreszenzen zueinander konnten die Bakterien-tragenden Thrombozyten detektiert werden. Gemessen wurden 5000 Ereignisse/Messung im „Plättchengate“ und es wurde der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven Thrombozyten im Verhältnis zur Thrombozytengesamtzahl berechnet.



**Abb. 2-4: Bestimmung der Bakterien-positiven Plättchen** durch Auftragung der 2. Fluoreszenz (Signals des Plättchenmarkers anti-CD42a-PE) gegen die 1. Fluoreszenz (Syto 13, Signal der Bakterien)

### 2.10 Zellensortierung

Um zu überprüfen, wie viele Bakterien an einem Thrombozyten gebunden sind, wenn er als bakterienpositives Plättchen mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst wird, wurde eine Bakterien-Plättchensuspension (wie in Kapitel 2.9.3 vorbereitet und mit 0,5 % Formaldehydlösung fixiert) mit einem High-Performance Cell Sorter (Dako-Cytomation, Hamburg) gemessen und nach ansteigendem Syto 13-Signal sortiert. Die Zellassoziat



### 2.11.2 ADP

ADP ist der bedeutendste Agonist für die Verstärkung einer beginnenden Plättchenaktivierung (Gachet, 2001). Etwa 50 % des Plättchen-ADPs ist in den „dense bodies“ gespeichert und wird nach Plättchenaktivierung entlassen.

ADP (Grad IX; Sigma, Taufkirchen) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Konzentrationsbereich von 0,5  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  in Probenröhrchen vorgelegt. Aliquots der jeweiligen Thrombozytensuspension wurden auf das gelöste ADP pipettiert und die Thrombozyten bei Raumtemperatur je nach Versuch 3-5 min erschütterungsfrei aktiviert.

#### Lösung:

- ADP-Stammlösung:                   ADP            250  $\mu\text{M}$   
  in 0,9 % NaCl-Lösung

### 2.11.3 Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid (TRAP)

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin geschieht über mehrere Rezeptoren (GP Ib, PAR-1-Rezeptor, PAR-4-Rezeptor). Der wichtigste ist der PAR-1-Rezeptor. Nach Bindung von Thrombin an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors wird ein Teil davon abgespalten. Es entsteht ein neuer N-Terminus mit der Aminosäuresequenz SFLLRN. Dieser kann nun an eine Schleife der transmembranen Domäne anbinden und damit den Thrombin-Rezeptor aktivieren. Synthetische Peptide mit der Aminosäuresequenz SFLLRN können direkt den Plättchen-Thrombinrezeptor aktivieren. Sie heißen „thrombin-receptor activating peptide“ (TRAP).

TRAP-6 (Bachem, Heidelberg) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Konzentrationsbereich von 10  $\mu\text{M}$  bis 125  $\mu\text{M}$  in den Probenröhrchen vorgelegt. Die Aktivierung verlief wie für Thrombin oder ADP beschrieben (Kap. 2.11.1 bzw. Kap. 2.11.2).

#### Lösung:

- TRAP-Stammlösung:                   TRAP            40 mM  
  in DMSO

### 2.11.4 Hemmung von Thrombin durch Hirudin

Das Enzym Hirudin aus dem Blutegel ist ein selektiver Thrombininhibitor. Die Gerinnungshemmung wird dadurch bewirkt, dass sich ein Molekül Hirudin mit einem Molekül Thrombin zum Hirudin-Thrombin-Komplex verbindet, der inaktiv ist.

Hirudin (10 U/ml) wurde in verschiedenen Versuchen mit dem eingestellten PRP oder den gefiltrierten Plättchen inkubiert, um eine Thrombinwirkung auf die Plättchen vor Versuchsbeginn und während des Versuches auszuschließen. So konnten Agonisten wie ADP und TRAP unabhängig von Thrombineinfluss in ihrer Wirkung untersucht werden.

#### Lösung:

- Hirudin-Stammlösung	Hirudin	250 U/ml
	in 0,9 % NaCl -Lösung	

### 2.12 Spaltung von Fibrinogen durch Ancrod

Ancrod ist ein Enzym, welches aus dem Schlangengift der Malayischen Mokassinschlange (*Calloselasma rhodostoma*) gewonnen wird. Ancrod spaltet, genauso wie Thrombin, Fibrinogen zu Fibrin, aktiviert die Thrombozyten aber selber nicht. Dadurch kann die Rolle des Fibrins bei der Bakterien-Plättchen-Assoziation unabhängig von der Plättchenaktivierung untersucht werden. Ancrod wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Konzentrationsbereich von 0,05 U/ml bis 0,9 U/ml  $\mu$ M zum Teil gleichzeitig mit den Agonisten in Probenröhrchen vorgelegt. Aliquots der jeweiligen Thrombozytensuspension wurden auf das gelöste Ancrod pipettiert und bei Raumtemperatur je nach Versuch 3-5 min inkubiert. Bei dem Einsatz von Ancrod wurden wie bei der Aktivierung mit Thrombin (Kap. 2.11.1) die Plättchen zuvor mit 1,25 mM GPRP inkubiert, um eine Fibrinpolymerisation zu verhindern.

#### Lösungen:

- Ancrod-Stammlösung:	Ancrod	50 U/ml
	in 0,9 % NaCl-Lösung	
- GPRP-Stammlösung:	s. Kap. 2.11.1	

### 2.13 Aggregometrie

Die Aggregation der Thrombozyten wurde nach der Methode nach Born (1962) in einem Aggregometer (P.I.C.A., Chronolog, Endingen) durchgeführt. Dazu wurde in einer silanisierten Glasküvette eine Plättchensuspension bei konstanter Geschwindigkeit und Temperatur (1000 rpm/min; 37°C) gerührt. Durch die Zugabe eines Agonisten oder Bakterienzusatz wurde die Aggregation der Thrombozyten ausgelöst und die Lichttransmission nahm zu. Der zeitliche Verlauf der Transmissionszunahme wurde photometrisch erfasst und mit einem Schreiber aufgezeichnet. Die Plättchensuspension wurde für diese Versuche auf 200.000 Plättchen/ $\mu$ l eingestellt; im Falle von PRP mit plättchenarmen Plasma und bei gefilterten Plättchen mit HEPES-Tyrode-Puffer. Den gefilterten Plättchen wurde außerdem 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen zugesetzt. Wurde der Einfluss von Bakterien auf die Plättchenaggregation geprüft, wurde die Plättchensuspension mit Hirudin (10 U/ml) vorinkubiert. Bei dem Einsatz von Ancrod (Kap. 2.12) wurde außerdem 1,25 mM GPRP zugesetzt.

Es wurde ein Nullabgleich mit HEPES-Tyrode-Puffer bzw. PPP durchgeführt. Danach wurden 500  $\mu$ l der Suspension in die silanierte Glasküvette einpipettiert und im Photometer unter Rühren bei 37°C vortemperiert. Nach etwa 5 min wurde der Agonist hinzugefügt und der Aggregationsverlauf verfolgt.

Wurde der Einfluss von Bakterien untersucht, wurden nur 450  $\mu$ l der Plättchensuspension in die Glasküvette pipettiert. Die Bakterien aus Übernachtskultur wurden zur Entfernung des Kulturmediums gewaschen und anschließend mit HEPES-Tyrode-Puffer zu einer  $OD_{600}$  von 1,6 resuspendiert. Nach Vortemperierung der Plättchensuspension wurden 50  $\mu$ l der Bakteriensuspension hinzu pipettiert und der Aggregationsverlauf verfolgt. Wurde Ancrod (0,05 U/ml) im Versuch verwendet, wurde dieses Enzym entweder vor oder nach Zusatz der Bakterien hinzugefügt.

#### Lösungen:

- HEPES-Tyrode-Puffer: s. Kap. 2.8.3
- Hirudin-Stammlösung: s. Kap. 2.11.4
- Ancrod-Stammlösung: s. Kap. 2.12
- GPRP-Stammlösung: s. Kap. 2.11.1

### 2.14 Detektion der Plättchenaktivierung

Die Aktivierung der Thrombozyten kann mittels Durchflusszytometrie *ex vivo* und *in vitro* qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Bei der Aktivierung von Thrombozyten kommt es zu einer Veränderung der Membranglykoproteine. Diese Veränderung kann durch die Zunahme oder Abnahme der Bindung von spezifischen Antikörpern oder Adhäsionsmolekülen auf der Plättchenoberfläche detektiert und als Median der mittleren Fluoreszenzintensität angegeben werden (Michelson und Shattli, 1996, Kehrel *et al.*, 1998, Lahav *et al.*, 2002). Die Plättchenpopulation wurde zuvor in der Zweiparameterdarstellung, in der der SSC gegen den FSC aufgetragen wurde, identifiziert.

#### 2.14.1 Fibrinogenbindung

Der GPIIb/IIIa Komplex (CD41/61) ist das am häufigsten auf Blutplättchen vorkommende Membranglykoprotein (1-2 % des Gesamtproteingehalts). Es ist ein Rezeptor für Fibrinogen, vWF, Fibronectin, Thrombospondin-1 und Vitronectin. Im „ruhenden“ Zustand der Plättchen ist auch der GPIIb/IIIa Komplex nicht aktiv und nur immobilisierte Adhäsionsproteine können anbinden. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer raschen Konformationsänderung des Komplexes und die Bindung von löslichen Adhäsionsproteinen, wie Fibrinogen, an die Thrombozytenoberfläche wird ermöglicht. Diese Anbindung, welche essentiell für die Plättchenaggregation ist, kann über Antikörper gegen gebundenes Fibrinogen nachgewiesen werden, oder es wird die Bindung von zugesetztem humanen, Fluorochrom-gekoppelten Fibrinogen an aktivierte Thrombozyten bestimmt. Da Fibrinogen mit mehreren Fluorochrom-Molekülen markiert werden kann und dieses zu einer Signalverstärkung führt, ist die letztere Methode sehr sensitiv.

Für den Nachweis der Bindung von zugesetztem humanen, Fluorochrom-gekoppelten Fibrinogen wurde Fibrinogen mit FITC konjugiert (s. Kap. 2.22). Vor der Aktivierung *in vitro* wurde die Fibrinogen-FITC-Lösung in einer Endkonzentration von 150 µg/ml zu dem eingestellten PRP gegeben und für etwa 10 min mit den Plättchen bei RT vorinkubiert. Nach Aktivierung (s. Kap. 2.11) und Fixierung der Plättchen mit 1 % Formaldehyd-Lösung im Verhältnis 1:1 (v:v) für 30 min bei RT wurde das nichtgebundene Fibrinogen entfernt, indem die Proben einmalig mit PBS gewaschen und anschließend bei 1000xg für 10 min zentrifugiert wurden. Nach Absaugen des

## 2. Material und Methoden

---

Überstandes und wieder Auffüllen der Proben mit PBS auf mindestens 300 µl wurden die Proben nach gründlichem „vortexen“ durchflusszytometrisch gemessen.

### Lösungen:

-PBS-Puffer:	s. Kap. 2.8.1	
-Formaldehyd-Lösung	Formaldehyd in PBS, pH 7,4	1%

### **2.14.2 α-Granula Sekretion (CD62P-Expression)**

P-Selektin ist ein α-Granulamembranprotein. Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer raschen Oberflächenexpression von CD62-P. Die aktivierungsabhängige Exposition von P-Selektin auf die Plättchenoberfläche wurde mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen CD62-P durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde im humanen System der FITC-konjugierte Klon CLB/thromb/6 in sättigender Konzentration (5 µg/ml) zu den mit Formaldehyd fixierten Proben (s. Kap. 2.14.1) gegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach Herunterwaschen des nicht gebundenen Antikörpers wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen.

### Lösung:

-Formaldehyd-Lösung	s. Kap. 2.14.1	
---------------------	----------------	--

### **2.15. Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus***

Um zu prüfen, ob und wie weit sich Thrombozyten durch *S. aureus* aktivieren lassen, wurden humane Thrombozyten oder Kaninchen-Thrombozyten mit Bakterien koinkubiert und die Expression von CD62 (s. Kap. 2.14.2) bestimmt. Die Bakterien (Stämme Newman und Cowan 1) wurden dazu auf 120.000 Keime/µl mit PBS eingestellt, die Thrombozyten auf 25.000 Tz/µl. Die Bakterien und die Plättchen wurden in einem Volumenverhältnis von 1:1 zusammengegeben und für 20 min unter leichtem Schütteln bei RT miteinander koinkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz mit humanen Thrombozyten PE-markierter anti-CD42a, Klon ESS (0,75 µg/ml) und FITC-markierter anti-P-Selektin, Klon CLB-Thromb/6 (5 µg/ml) zugesetzt. Bei dem Ansatz mit



Kaninchen-Plättchen wurde zum Markieren der Thrombozyten FITC-markierter anti CD41/CD61, Klon P2 (5 µl/100 µl Probe) verwandt und zur Detektierung der Plättchenaktivierung PE-markierter anti-CD62P, Klon CRC81 (4 µl/100 µl Probe). Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte über weitere 10 min. Danach wurden die Proben mit PBS verdünnt und sofort durchflusszytometrisch gemessen. Es wurden pro Ansatz 5000 Thrombozyten gemessen und die Zunahme der Bindung des Anti-P-Selektin Antikörpers als Zunahme der Fluoreszenzintensität bestimmt.

### Lösung:

-PBS-Puffer: s. Kap. 2.8.1

### **2.16 Immunisierung von Kaninchen mit Staphylokinase**

Zur Überprüfung, ob Antikörper gegen Staphylokinase Einfluss auf die Aktivierbarkeit von Thrombozyten durch *S. aureus* haben, wurden 2 Kaninchen mit Staphylokinase immunisiert. Zur Primärinjektion wurde 100 µg/ml Staphylokinase in „Inkompletten Freund's Adjuvans“ den Tieren subkutan injiziert. Für die Booster-Injektion wurde 100 µg/ml Staphylokinase in ein 1:1-Gemisch aus PBS und AluGelS aufgenommen und intramuskulär injiziert. Vor der Immunisierung, vor und 6 Tage nach jeder Booster-Injektion wurde den Kaninchen Blut abgenommen (siehe Kap. 2.8.1). Es wurde geprüft, ob sich die Thrombozyten durch *S. aureus* Newman aktivieren lassen (Kap. 2.15). Zusätzlich wurden die Thrombozyten zur Positivkontrolle in einem weiteren Versuchsansatz mit ADP aktiviert (Kap. 2.11.2).

### Lösung:

- PBS s. Kap. 2.8.1

### 2.17 *S. aureus* und Endothelzellen

#### 2.17.1 Kultivierung von HMEC-1 und HBMEC

Kultivierte mikrovaskuläre humane Endothelzellen (HMEC-1, Dr. F. Candal, USA) wurden maximal bis zur 12. Passage in supplementiertem Endothelzell-Medium (PAA, Cölbe) bei 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre unter Begasung mit 3 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Humanen Hirnendothelzellen (HBMEC, „human brain-derived microvascular endothelial cells“) wurden maximal bis zur 10. Passage in supplementiertem RPMI 1640-Medium (PAA, Cölbe) kultiviert. Zum Ablösen wurden die adhärenenten Zellen 3 min mit einer Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in PBS aufgenommen und bei 190xg für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Pro „Cellwell“ wurden 1,1x10<sup>5</sup> resuspendierte Endothelzellen in 500 µl supplementierten Endothelzell-Medium für 48 h bei 37°C und 98 % relativer Luftfeuchtigkeit in 3 % CO<sub>2</sub> bis zum Konfluenzwachstum inkubiert.

#### Lösungen:

- PBS: s. Kap. 2.8.1

- Endothelzell-Medium (serumfrei)

supplementiert mit:	Penicillin/Streptomycin	100 U/ml
	Glutamin	2 mM
	Endothelial Growth factor	0,01 µg/ml
	Hydrocortison	1 µg/ml

-RPMI 1640-Medium

supplementiert mit:	FCS	10 % (v/v)
	NU-Serum IV	10 % (v/v)
	Glutamin	2 mM
	Nicht-essentielle Aminosäuren	0,1 mM
	MEM-Vitamine	1 % (w/v)
	Natriumpyruvat	1 mM
	Streptomycin	0,1 mg/ml
	Penicillin	100 U/ml

- Trypsin-EDTA-Lösung:	Trypsin	0,02 % (v/v)
	EDTA	0,05 % (w/v)

### 2.17.2 Vorbereitung der Bakterien für die Inkubation mit Endothelzellen

Eine Bakterienanfärbung mit Syto 13 für Versuche mit Endothelzellen stellte sich als nicht sinnvoll heraus, da Syto 13 Nukleinsäuren anfärbt, und aus den Bakterien heraus diffundierender Farbstoff auch die Nukleinsäuren der Endothelzellen anfärbt. Aus dem Grunde wurden die Bakterien für diese Versuche mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) angefärbt.

FITC an Celite 10 % (Calbiochem, Bad Soden) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Natriumcarbonatpuffer gelöst. Nach einer augenscheinlich vollständigen Lösung wurde die Suspension mit 13.000xg für 10 min bei RT zentrifugiert, um nicht gelöste Bestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde zum Anfärben der Bakterien verwendet und das Pellet verworfen. Bakterien aus der Übernachtskultur wurden mit PBS oder Hepes-Tyrode-Puffer gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Puffer in einem Volumen von 4 ml auf eine  $OD_{600}=1$  eingestellt. Nach Zentrifugation bei 2500xg 10 min bei RT wurde der Puffer entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml FITC enthaltenen Natriumcarbonatpuffer resuspendiert und die Bakterien für eine halbe Stunde inkubiert. Diese Prozedur schadet den Bakterien nicht (Herrmann *et al.*, 1990). Die Bakterien wurden mehrfach mit PBS oder Hepes-Tyrode-Puffer gewaschen, bis der Überstand keine Färbung mehr aufwies. Die Bakteriensuspension wurde kurz beschallt, um die Keime zu vereinzeln, und wieder mit Puffer auf eine  $OD_{600}=1$  eingestellt.

#### Lösungen:

- Natriumcarbonatpuffer	NaHCO <sub>3</sub> (4,2% (w/v))	5,8 ml
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (5,3% (w/v))	10 ml
- PBS	s. Kap. 2.8.1	
- Hepes-Tyrode-Puffer	s. Kap. 2.8.3	

### 2.17.3. Inkubation der Endothelzellen mit *S. aureus*

Die Endothelzellen wurden einmal mit Hapes/Tyrode-Puffer gewaschen und anschließend mit den Bakterien in Hapes/Tyrode-Puffer in unterschiedlichen Konzentrationen (10 µl Bakteriensuspension auf 240 µl Puffer (entspricht einen Verhältnis von Endothelzellen zu Bakterien von 1:50 im „Cellwell“), 25 µl Bakteriensuspension auf 225 µl Puffer (HMEC-1:Bakterien=1:125) und 50 µl Bakteriensuspension auf 200 µl Puffer (HMEC-1:Bakterien=1:250)) für einen festgelegten Zeitraum (15-150 min) bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenierten Bakterien mit dem Puffer entfernt und die Endothelzellen 3 mal mit Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der Endothelzellen vom „Cellwell“-Boden mit 150 µl Accutase (PAA, Cölbe). Dazu wurden die Endothelzellen für 10 min mit dem Enzymgemisch Accutase bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in PBS oder Hapes-Tyrode-Puffer aufgenommen und anschließend die Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde ein „Gate“ um die Endothelzellpopulation gesetzt und bei 5000 Ereignissen in diesem „Gate“ die Zunahme bzw. die Verteilung des 1. Fluoreszenzsignals geprüft.

#### Lösungen:

- PBS s. Kap. 2.8.1
- Hapes/Tyrode-Puffer s. Kap. 2.8.3

### 2.17.4. Bestimmung der in die Endothelzellen invadierten *S. aureus*

Um die in die Endothelzellen invadierten *S. aureus* zu bestimmen, wurden die extrazellulären Bakterien mit Lysostaphin (Sigma) lysiert (Sinha *et al.* 1999). Hierfür wurde, 20 min vor Ende der Inkubationszeit der Bakterien mit den Endothelzellen, zu den Versuchsansätzen Lysostaphin (20 µg/ml) hinzupipettiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde wie unter Kapitel 2.18.3. beschrieben weiter vorgegangen.



### Lösungen:

- Infektionsmedium: DMEM mit HEPES-Pufferlösung (25mM)  
mit 1 % FCS
- PBS-Puffer: s. Kap. 2.8.1
- Blockierlösung FCS 10 %  
in PBS, pH 7,4
- Triton X-100 0,1 %
- Paraformaldehyd-Stammlösung: Paraformaldehyd 37 %  
in PBS

### **2.17.6. Einfluss von Fibrinogen, Fibrin und TSP-1 auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen**

Um zu testen, ob die Adhäsionsproteine Fibrinogen, Fibrin oder TSP-1 einen Einfluss auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen haben, wurden die Endothelzellen vor Inkubation mit den Bakterien mit diesen Proteinen in unterschiedlichen Konzentrationen (5-200 µg/ml TSP-1; 25-200 µg/ml Fibrinogen; Fibrin aus 200 µg/ml Fibrinogen durch 0,4 U/ml Ancrod gebildet (s. Kap. 2.12)) für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Endothelzellen mit den Bakterien inkubiert (siehe Kap. 2.17.3). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde alle nichtgebundenen Bakterien durch dreimaliges Waschen mit HEPES-Tyrode-Puffer entfernt und die Endothelzellen mit Accutase (siehe Kap. 2.17.3) abgelöst. Im FACSCalibur wurde, wie unter Kap. 2.17.3 beschrieben, die Zunahme des ersten Fluoreszenzsignals bestimmt.

### Lösungen:

- Ancrod-Stammlösung: s. Kap. 2.12
- HEPES/Tyrode-Puffer: s. Kap. 2.8.3

### **2.17.7. Einfluss von Thrombozyten auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen**

Um den Einfluss von Plättchen auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen zu prüfen, wurden die Endothelzellen mit 250 µl gefilterten Thrombozyten in Hepes/Tyrode-Puffer (auf 50.000 Tz/µl eingestellt) bei 37°C und unter Begasung mit 3% CO<sub>2</sub> für 30 min vorinkubiert. Zum Teil wurden die Thrombozyten während der Inkubationszeit mit 2 µM ADP aktiviert. Außerdem wurde in unterschiedlichen Versuchsansätzen zusätzlich Fibrinogen (200 µg/ml), Fibrin (aus 200 µg/ml Fibrinogen und 0,4 U/ml Ancrod unter Zusatz von 1,25 mM GPRP), TSP-1 (50 und 200 µg/ml), Fibrinogen plus TSP-1 (200 µg/ml Fibrinogen, 50 µg/ml TSP-1) und Fibrin (aus 200 µg/ml Fibrinogen) plus TSP-1 (50 µg/ml) hinzugefügt. Anschließend wurden die Bakterien in Hepes-Tyrode-Puffer (eingestellt auf eine OD<sub>600</sub>=1) in unterschiedlichen Mengen (10, 25, 50 µl) zu den Thrombozyten und den Endothelzellen hinzu pipettiert und für weitere 60 min bei 37°C koinkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden alle nichtgebundenen Zellen durch dreimaliges Waschen mit Hepes-Tyrode-Puffer entfernt, die Endothelzellen mit Accutase (siehe Kap. 2.17.3) abgelöst und anschließend im FACSCalibur gemessen. Auch hier wurde wie unter Kap. 2.17.3 beschrieben die Zunahme des ersten Fluoreszenzsignals bestimmt.

#### Lösung:

- Hepes-Tyrode-Puffer: s. Kap. 2.8.3

### **2.18 Aufreinigung von TSP-1**

Thrombospondin-1 wurde nach dem leicht abgewandelten Protokoll von Kehrel *et al.* (1991), aus humanen Thrombozyten aufgereinigt. Die Plättchen wurden aus Buffy-Coats isoliert. Die Buffy-Coats stammten vom Deutschen Roten Kreuz und waren nicht älter als 12 h. PRP und das Plättchen-Pellet wurden durch sukzessive Zentrifugationsschritte erhalten. Dazu wurden die Buffy-Coats zunächst mit einem Waschpuffer vermischt (10 Buffy-Coats in 300 ml Puffer) und dieses Gemisch mit 190xg 10 min lang bei Raumtemperatur zentrifugiert, um PRP zu erhalten. Dieses wurde abgenommen und mit 1000xg (RT, 10 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig in CGSE-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

## 2. Material und Methoden

---

Diese Suspension wurde ein weiteres Mal mit 190xg (RT, 5 min) zentrifugiert um noch restliche Leukozyten und Erythrozyten zu entfernen. Der Überstand wurde noch einmal mit 1000xg (10 min, RT) zentrifugiert und das Pellet schließlich in Aggregationspuffer resuspendiert. Die Thrombozyten dürfen bei diesen Waschschrritten nicht aktiviert werden, da sich sonst die Konformation und der Reinheitsgrad des zu gewinnenden TSP-1 verändert. Die Thrombozytensuspension wurde auf einen pH Wert von 7,6 eingestellt. Bei diesem pH Wert hat Thrombin, das danach zur Aktivierung der Thrombozyten verwendet wurde, seine optimale Wirkung. Die Wirkung von 2 U/ml Thrombin wurde nach deutlicher Aggregation der Plättchen mit 11 U/ml Hirudin abgestoppt. Die Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 2500xg (20 min, RT) vom Thrombozytenaktivierungsüberstand getrennt und verworfen. Nach Zusetzen der Proteaseinhibitoren Leupeptin-Hemisulfat (Sigma, Deisenhofen; 48 µM) und Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF; Sigma, Deisenhofen; 250 µM) wurde der Thrombozytenaktivierungsüberstand bei -80° über Nacht eingefroren. Nach langsamen Auftauen wurde ein Fibringerinnsel sichtbar. An diesem vorbei wurde die Lösung abpipettiert und in der Ultrazentrifuge mit 80000xg bei 4-8°C für eine Stunde zentrifugiert. Das sich in dieser Lösung befindliche TSP-1, welches von den aktivierten Thrombozyten freigesetzt wurde, wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie von den anderen freigesetzten Proteinen getrennt. Dabei machte man sich zur Nutze, dass TSP-1 eine Heparin bindende Domäne hat. Die benutzte Heparin-Sepharose CL-6B (Amersham Biosciences, Freiburg) Säule wurde mit einem 150 mM NaCl-Hepes Puffer äquilibriert. Zur Elution des Peptids wurde das gleiche Puffersystem mit ansteigender NaCl-Konzentration (250, 350, 600 mM NaCl) verwandt. Die Elution wurde mit Hilfe einer optischen Einheit verfolgt. Bei Verwendung des 600 mM NaCl-Hepes-Puffer wurde das Eluat fraktioniert gesammelt.

Die aufgefangen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung auf die Reinheit des TSP-1 geprüft (Kap. 2.21). Für die SDS-PAGE wurde ein 4,5 % Sammelgel und ein 7,5 % Trenngel verwendet. Die „sauberen“ Fraktionen wurden vereinigt. Zur Verminderung der NaCl-Konzentration wurde das TSP-1 in Puffer mit Hilfe von „VIVASPIN-Konzentratoren“ (VIVASCIENCE, Sartorius AG, Göttingen, Germany) mit TBS-Puffer (+ 2mM CaCl<sub>2</sub>) umgepuffert. Dazu wurde die Konzentratoren mit der TSP-1-Puffer-Lösung gefüllt und bei 3200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Probenlösung wurde dabei durch eine Polyethersulfonmembran ultrafiltriert, wobei das



TSP-1 im Probenreservoir verblieb und so aufkonzentriert werden konnte. In regelmäßigen Abständen wurde die Flüssigkeit im Filtratcontainer ausgeleert und der Konzentrator mit TBS-Puffer (+ 2mM CaCl<sub>2</sub>) aufgefüllt. Die Konzentration des aufgereinigten und umgepufferten TSP-1 wurde mit einem BCA-Test (s. Kap. 2.20) bestimmt.

### Lösungen:

- Waschpuffer: pH 6,5	Na <sub>3</sub> -Citrat	30 mM
	NaCl	100 mM
	KCl	3 mM
	D(+)-Glukose	9,6 mM
	EDTA	2 mM
- CGSE-Puffer: pH 6,5	Na <sub>3</sub> -Citrat	29 mM
	NaCl	120 mM
	D(+)-Glukose	30 mM
	EDTA	5 mM
- Aggregationspuffer: pH 7,8	NaCl	150 mM
	Tris	20 mM
	D(+)-Glukose	5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
- NaCl-Hepes-Puffer: pH 7,4	Hepes	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	2 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM
	NaCl	150 mM
	PMSF	0,1 mM
	Leupeptin	2 µM

## 2. Material und Methoden

---

anstelle von 150 mM NaCl wurden zur Elution von TSP-1 in aufsteigender Reihenfolge verwandt:

NaCl	250 mM
NaCl	350 mM
NaCl	600 mM

- TBS-Puffer: Kap. 2.7  
pH 7,4

### 2.19 vWF-Aufreinigung aus Haemate® HS 500

Zur Gewinnung der für die Thrombozytenadhäsion und -aggregation am wirksamsten großen Multimere des vWF (Meyer *et al.*, 1993), wurde eine Reinigung nach der in Herrmann *et al.* (1997) beschriebenen Methode durchgeführt. 500 Einheiten des Medikamentes Haemate® HS 500 (Centeon Pharma GmbH, Marburg; Wirkstoffe: humaner Blutgerinnungsfaktor VIII und humaner vWF) wurden in 6 ml Aqua dest. aufgelöst. Die Gesamtproteinmenge betrug 100-220 mg mit einem Albuminanteil von 80-120 mg. Das gelöste Haemate® HS 500 wurde auf eine Gelfiltrations-Chromatographie-Säule (BioGel A-15-m-Medium Gelsäule (BioRad, München), Säulenvolumen: 177 ml) aufgetragen. Als Äquilibriumspuffer diente ein Tris-HCl Puffer (pH 7,35), dem zum Schutz der vWF-Multimere vor Proteolyse die Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF; Sigma, Deisenhofen; 0,1 mM) und Leupeptin-Hemisulfat (Sigma, Deisenhofen; 2 µM) zugesetzt wurden. Die Elution wurde mit Hilfe einer optischen Einheit verfolgt. Die ersten gesammelten Fraktionen wurden verwendet, nachdem die Reinheit des vWF mit einer silbergefärbten SDS-PAGE (Kap.2.21) überprüft wurde. Für die SDS-PAGE wurde ein 3,5 % Sammelgel und ein 5 % Trenngel verwendet. Die Proteinkonzentration wurden mit Hilfe eine BCA-Testes (Kap.2.20) bestimmt.

- Tris-Puffer:	Tris	50 mM
(pH 7,35)	NaCl	150 mM
	Natrium-Citrat	5 mM
	PMSF	0,1 mM
	Leupeptin	2 µM

### 2.20 Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Lösungen

Um die Proteinkonzentration von Lösungen zu bestimmen, wurde ein kommerzieller BCA-Test (Pierce, Niederlande) verwendet. Dieser Test basiert auf der von Smith *et al.* (1985) und Wiechermann *et al.* (1988) beschriebenen Bicinchoninicsäure (BCA)-Methode. Dabei wird Bicinchoninicsäure als Detektionsreagenz für einwertige Kupferionen ( $\text{Cu}^+$ ) verwandt. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen entstehen in alkalischem Milieu, wenn zweiwertige Kupferionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) durch Proteine reduziert werden. Die  $\text{Cu}^+$ -Ionen reagieren mit der Bicinchoninicsäure und es bildet sich ein violetter Farbkomplex, dessen Intensität bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Über die Erstellung einer Standardreihe kann dann die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

Die Standardreihe wurde mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellt. Dabei wurde ein Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{g/ml}$  bis 1200  $\mu\text{g/ml}$  verwandt. Als Verdünnungslösung und für den Leerwert wurde der jeweilige Puffer verwandt, in dem sich auch das Protein befand, dessen Konzentration bestimmt werden sollte. Es wurden bei dem Test jeweils 25  $\mu\text{l}$  Probenlösung bzw. Standardlösung mit 200  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenzlösung vermischt. Die Bestimmung erfolgte in 96-Well Platten in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 nm (aus technischen Gründen) nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C.

### 2.21 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Silberfärbung

Die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) ist ein gebräuchliches Verfahren zur Reinheitskontrolle von Proteinen. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) wird dabei eingesetzt, um die Tertiärstruktur der Proteine zu zerstören und um Eigenladung der Proteine zu überdecken, da die SDS-Moleküle an die entfaltenen Peptid-Ketten binden. So werden einzelne Proteinkomponenten nicht nach ihrer Ladung oder Größe getrennt, sondern nur nach ihrem Molekulargewicht. Die mit negativer Ladung versehenen und auf einem Polyacrylamidgeld aufgetragenen Proteine wandern in einem angelegten Spannungsfeld in Richtung Anode. Relativ kleine Moleküle

wandern infolge des Molekularsiebeffekts dabei schneller durch die Gelporen des Acrylamidgels als Größere.

### 2.21.1 Elektrophoreseablauf

Für das Trenngel wurde ein 7,5 %iges oder 5 % iges Acrylamidgel (Acrylamid: ICN, Meckenheim) gegossen. Der Zusatz von 0,8 % Bisacrylamid ermöglicht hierbei die Quervernetzung des Gels. Vor Beginn der Polymerisation durch Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators Tetramethylendiamin (TEMED) wurde die Lösung entgast, um molekularen Sauerstoff zu entfernen, der die Polymerisation behindern würde. Die Lösung wurde zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen und, um eine glatte auspolymerisierte Oberkante zu erhalten, mit Aqua bidest. überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurden das Aqua bidest. wieder abgeschüttet und auf das Trenngel ein 4,5 % oder 3,5 % Sammelgel gegossen, in welches der Probenkamm gesetzt wurde. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels konnte der Probenkamm entfernt und in die entstandenen Taschen die zuvor behandelten Proteinproben eingefüllt werden.

Zur Auftrennung von Proteinen unter reduzierenden Bedingungen durch Spaltung der Disulfidbrücken, z. B. bei Proben aus der TSP-1 Aufreinigung oder vWF-Aufreinigung, wurden die Proteinproben mit Dithioerythritol (DTE) in SDS-haltigem Auftragspuffer behandelt. Dazu wurden 100 µl Proteinprobe für 4 min bei 100°C mit 5 µl einer DTE-Lösung gekocht und anschließend 10 min mit weiteren 5 µl DTE-Lösung bei RT inkubiert. Überschüssiges DTE wurde durch Zugabe von 10 µl Iodacetamid (IAA)-Lösung (15 min, RT) beseitigt. In der IAA-Lösung befand sich Bromphenolblau (BPB) welches zur Detektierung der Wanderung kleinster Bestandteile der Proteinprobe während des Gel-Laufes genutzt wird.

Zur Auftrennung von Proteinproben im nichtreduzierten Zustand (z. B. zur Überprüfung der vWF-Aufreinigung) wurden die Proben mit N-Ethylmaleinimid (NEM) behandelt. Dazu wurden 100 µl Proteinproben jeweils mit 10 µl einer 0,04 M NEM-Lösung für 4 min bei 100°C gekocht und anschließend mit 5 µl einer 0,014 M BPB-Lösung für 5 min inkubiert.

Als Molekulargewichtsmarker dienten nicht konjugierte "high range" (45 kDa-200 kDa) Markerproteine (Bio-Rad, München).

Nach Einfüllen der Proben in die Taschen des Sammelgels wurde eine Spannung von 15 mA pro Gel angelegt. Nach Erreichen des Trenngels durch die BPB-Bande, wurde die Spannung auf 30-35 mA pro Gel erhöht. Kurz bevor die BPB-Bande die untere Kante des Trenngels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet. Für die anschließende Silberfärbung wurde das Trenngel wenigstens 1h oder über Nacht in einer Methanol-Essig-Lösung fixiert.

Lösungen:

- Trenngel-Puffer: pH 8,8	SDS Tris/ HCl	7,0 mM 750 mM
- Sammelgel-Puffer: pH 6,8	SDS Tris/ HCl	7,0 mM 250 mM
- APS-Lösung:	APS in A. bidest.	92 mM
- Trenngel (7,5%):	Acrylamid (30% (w/v)) - Bisacrylamid (0,8% (w/v)) Trenngel-Puffer A. bidest TEMED APS-Lösung	15 ml 30 ml 13 ml 30 µl 2 ml
- Trenngel (5%):	Acrylamid (30% (w/v)) - Bisacrylamid (0,8% (w/v)) Trenngel-Puffer A. bidest TEMED APS-Lösung	10 ml 30 ml 18 ml 30 µl 2 ml
- Sammelgel (4,5%):	Acrylamid (30% (w/v)) - Bisacrylamid (0,8% (w/v)) Sammelgel-Puffer Aqua bidest	1,9 ml 6,25 ml 3,95 ml

## 2. Material und Methoden

---

	TEMED	15 $\mu$ l
	APS	412,5 $\mu$ l
- Sammelgel (3,5%):	Acrylamid (30% (w/v)) -	
	Bisacrylamid (0,8% (w/v))	1,45 ml
	Sammelgel-Puffer	6,25 ml
	Aqua bidest	4,4 ml
	TEMED	15 $\mu$ l
	APS	412,5 $\mu$ l
- Auftragspuffer:	Harnstoff	8 M
	Tris	100 mM
	SDS	70 mM
	gelöst bei 37°C	
- DTE-Lösung:	DTE	200 mM
	in Auftragspuffer	
- IAA-Lösung:	IAA	778 mM
	in 0,5 ml Auftragspuffer und 0,5 ml BPB-Lösung	
- BPB-Lösung	BPB	14 mM
	in Auftragspuffer	
- NEM-Lösung:	NEM	40 mM
	in Auftragspuffer	
- Gelfixierlösung	Methanol	12,5 M
	Eisessig	1,7 M
	in A. dest.	

**2.21.2. Silberfärbung**

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

Um die überschüssige Fixierlösung zu entfernen, wurde das fixierte Gel zunächst dreimal für 20 min in Ethanol-Waschlösung gewaschen. Um eine Hintergrundfärbung zu verhindern wurde das Trenngel für eine Minute mit Thiosulfatlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 20 sec in Aqua dest. erfolgte die Färbung des Gels mittels Silbernitratlösung für 20 min. Überschüssige Färbelösung wurde durch zweimaliges Waschen für 20 sec mit A. dest. entfernt. Die Entwicklung erfolgte nach Augenschein durch zweimalige Inkubation mit Entwicklerflüssigkeit und wurde durch Zugabe der Stopplösung für 2 mal 1 min abgestoppt. Anschließend wurde das Gel für 10 min mit Fotofixierlösung fixiert und danach mindestens 30 min in Aqua dest. gewaschen.

Lösungen:

- Ethanol-Waschlösung:	Ethanol in A. dest.	6,522 M
- Thiosulfatlösung:	Thiosulfat	0,8 mM
- Silbernitratlösung:	AgNO <sub>3</sub> Formaldehyd in A. bidest.	12 mM 2 mM
- Entwicklerlösung:	NaCO <sub>3</sub> Thiosulfat Formaldehyd	566 mM 16 µM 5 mM
- Stopplösung:	EDTA	13 mM
- Foto-Fixierlösung:	Tetenal (Tetenal Photowerke, Norderstedt)	10% (v/v)

### **2.22 Markierung von Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronektin mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)**

Um die Bindung von zugefügtem Fibrinogen an Bakterien und Thrombozyten durchflusszytometrisch bestimmen zu können, wurde das Protein nach einer leicht modifizierten Methode von Xia *et al.* (1996) mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert. Dazu wurden 10 mg humanes Fibrinogen (Kordia, Niederlande) und 5 mg FITC an Celite 10% (Calbiochem, Bad Soden) zusammen in 4,5 ml PBS (pH 7,4) gelöst. Dem PBS wurden außerdem 24 µl Natriumhydrogencarbonat (5 %) und 0,5 ml Natrium-Citratlösung (3,13 %) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln entweder für 24 h bei RT oder für 48 h bei 4°C. Anschließend wurde nicht gelöstes Material bei 13.000xg, 10 min, RT abzentrifugiert und das nicht konjugierte FITC mittels Gelfiltration vom gekoppelten Fibrinogen-FITC getrennt. Als Säulenmaterial diente hierbei eine mit PBS-Puffer äquilibrierte Sephadex-G25-Säule (Pharmacia, Freiburg). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über einen BCA-Test (s. Kap.2.20)

TSP-1, vWF und Fibronektin wurden mit FITC gekoppelt, indem FITC an Celite 10 % zu dem jeweiligen Protein in TBS + CaCl<sub>2</sub>-Puffer in einem molekularem Verhältnis von 600:1 (FITC:TSP-1), 700:1 (FITC:vWF) bzw. 1000:1 (FITC:Fn) zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 4°C. Nicht gelöstes FITC wurde abzentrifugiert (13.000xg, 10 min, RT) und überschüssiges FITC-Celite wurde mittels Gelfiltration von dem konjugiertem Protein-FITC separiert. Hierzu wurden PD-10 Säulen (Amersham Biosciences, Freiburg), die als Säulenmaterial Sephadex-G25 enthielten, verwendet. Als Äquilibrierungspuffer diente TBS + 2mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über einen BCA-Test.

#### Lösungen:

- PBS s. Kap. 2.8.1
- TBS s. Kap. 2.7



Die Bestimmung des FITC/Protein-Verhältnisses (F/P-ratio) erfolgte nach photometrischer Messung der Proteinlösung bei 280 nm und 495 nm über folgende Formeln:

$$\text{molare F/P ratio} = \frac{A_{495} * C}{A_{280} - (A_{495} * 0.35)}$$

$$C = \frac{\text{Molekülgewicht Protein} * \text{Extinktionskoeffizient Protein}}{\text{Molekülgewicht FITC} * \text{Extinktionskoeffizient FITC}}$$

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

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

$$\text{Molekulargewicht Fibrinogen} = 333.000 \text{ Da}$$

$$\text{Molekulargewicht TSP-1} = 450.000 \text{ Da}$$

$$\text{Molekulargewicht vWF} = 250.000 \text{ Da}$$

$$\text{Molekulargewicht Fibronectin} = 450.000 \text{ Da}$$

$$\text{Molekulargewicht FITC} = 390 \text{ Da}$$

Durchschnittlich wurde ein Fibrinogen-Molekül mit fünf bis sieben FITC-Molekülen konjugiert. Bei TSP, vWF und Fibronectin lag die durchschnittliche Kopplungsrate zwischen 1,3 und 2,5.

### 2.23 Statistische Auswertung der experimentellen Daten

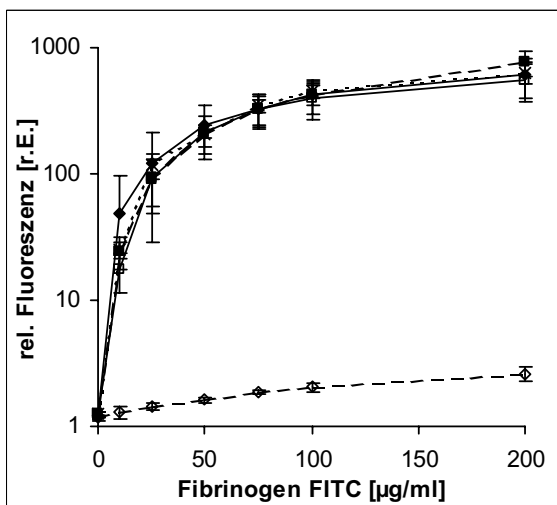
Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde der Student'sche t-Test für ungepaarte Stichproben verwandt. Als signifikant wurde ein Wert von  $p < 0,05$  angesehen. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SigmaStat (Jandel Corporation), Version 2.0.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Die Bindung von plasmatischen Adhäsionsproteinen an *S. aureus*

##### 3.1.1 Bindung von Fibrinogen an *S. aureus*

Zur Überprüfung, ob Fibrinogen an *S. aureus* anbinden kann, wurden verschiedene *S. aureus* Stämme mit FITC gekoppelten Fibrinogen in aufsteigender Konzentration für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Bindung des Fibrinogens durchflusszytometrisch bestimmt. Das eingesetzte Fibrinogen war hochrein und insbesondere frei von Fibronektin, vWF und TSP-1. Alle untersuchten Wildtypstämme banden konzentrationsabhängig das lösliche Fibrinogen (Abb. 3-1) im Gegensatz zu *E. coli*, welcher Fibrinogen nur in geringem Maße band. In der Bindungsfähigkeit für Fibrinogen der vier untersuchten *S. aureus*-Stämme gab es nur geringe, nicht signifikante Unterschiede.



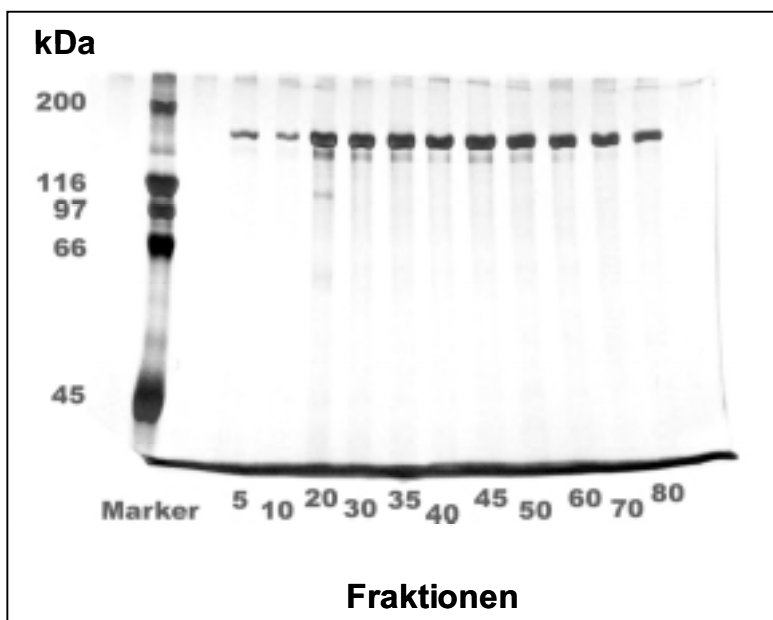
**Abb. 3-1: Bindung von Fibrinogen an *S. aureus* Wildtypstämme und als Kontrolle *E. coli*.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
 Kreuz: *S. aureus* 4074  
 Quadrat: *S. aureus* Cowan 1  
 offenes Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
 offene Raute, gestrichelte Linie: *E. coli* TG1

##### 3.1.2 Bindung von TSP-1 an *S. aureus*

Zur Untersuchung der Bindung von TSP-1 an *S. aureus* wurde TSP-1 verwendet, welches in unserem Labor aus Thrombozyten aufgereinigt wurde. Dabei wurde die Eigenschaft des TSP-1 ausgenutzt, an Heparin zu binden. Durch Heparin-Affinitätschromatographie konnte das TSP-1 aus dem Aktivierungsüberstand von anderen, nach Thrombozytenaktivierung freigesetzten Proteinen getrennt und angereichert werden. Zur Überprüfung der Reinheit des TSP-1 wurde eine SDS-PAGE

mit anschließender Silberfärbung der Proteine durchgeführt. Es war bei einer molekularen Masse von 180 kDa deutlich eine TSP-1 Bande zu sehen (Abb. 3-2). Zudem zeigte die SDS-PAGE nur eine geringfügige Beimengung an Fremdproteinen. Bei der unter der TSP-1 Hauptbande sichtbaren zweiten Bande handelt es sich um ein Spaltprodukt von TSP-1 infolge der Thrombinaktivierung. Dieses konnte in unserer Arbeitsgruppe durch einen „Western Blot“ mit einem polyklonalen Antikörper gezeigt werden. Für die weiteren Versuche wurden die reinsten und am höchsten konzentrierten Fraktionen vereinigt und eine Proteinbestimmung vorgenommen. Das eingesetzte TSP-1 war insbesondere frei von Fibrinogen, Fibronektin und vWF, wie in Western Blots gezeigt wurde.

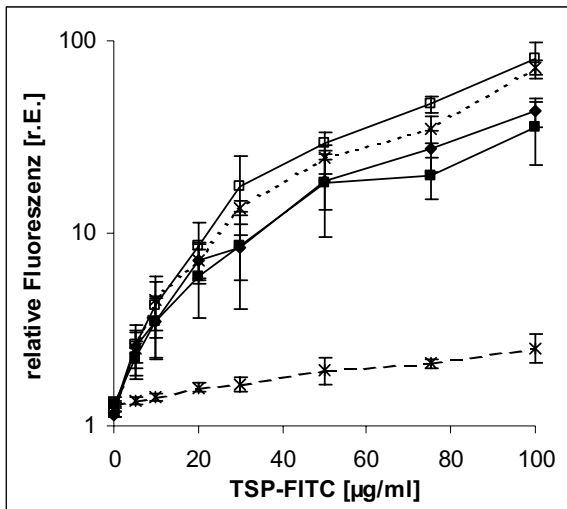


**Abb. 3-2:** Nachweis der Reinheit des aufgereinigten TSP-1 mit Silberfärbung einer SDS-PAGE. Auf Höhe von etwa 180 kDa ist die TSP-1-Bande zu sehen. Bei der Bande darunter handelt es sich um ein Spaltprodukt von TSP-1 infolge der Thrombinaktivierung der Thrombozyten. Die reinsten und am höchsten konzentrierten Fraktionen wurden vereinigt.

Mit FITC-konjugiertem TSP-1 wurde geprüft, ob das Protein an *S. aureus* binden kann. Nach 15 min Inkubation mit TSP-FITC in aufsteigender Konzentration wurde die Bindung von TSP-1 an *S. aureus* durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass alle untersuchten Wildtyp-Stämme das TSP-1 konzentrationsabhängig binden konnten im Gegensatz zu der Negativkontrolle *E. coli* TG1, welche TSP-1 nur in einem geringen Maße gebunden hat (Abb. 3-3). Die *S. aureus* Stämme 4074 und 8325-4 wiesen bei der höchsten eingesetzten Konzentration

### 3. Ergebnisse

von TSP-1 eine signifikant höhere Bindung von TSP-FITC auf als die Stämme Newman und Cowan 1.

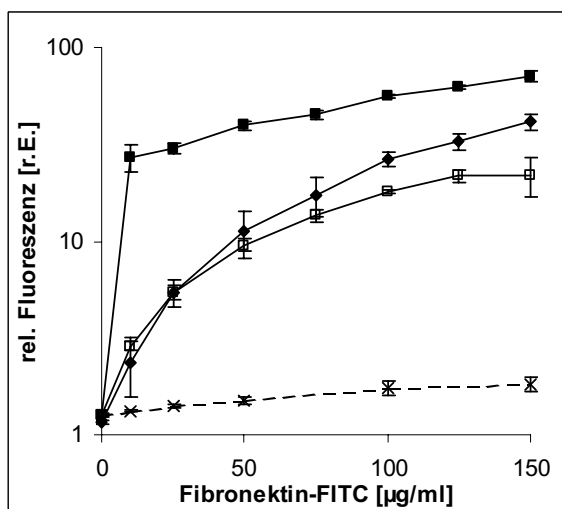


**Abb. 3-3: Bindung von TSP-1 an *S. aureus* Wildtypstämme und *E. coli*.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
Quadrat: *S. aureus* Cowan 1  
Kreuz: *S. aureus* 4074  
offenes Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
Kreuz: *E. coli* TG1

#### 3.1.3 Bindung von Fibronektin an *S. aureus*

Mit FITC-konjugiertem Fibronektin in aufsteigender Konzentration wurde die Bindung von Fibronektin an *S. aureus* untersucht (Abb. 3-4). Das eingesetzte Fibronektin war hochrein und insbesondere frei von Fibrinogen, TSP-1 und vWF. Bei allen drei *S. aureus* Wildtypstämmen war eine konzentrationsabhängige Bindung von Fibronektin zu beobachten, im Gegensatz zu der Negativkontrolle *S. carnosus*, die nur in sehr geringem Maße Fibronektin gebunden hat.



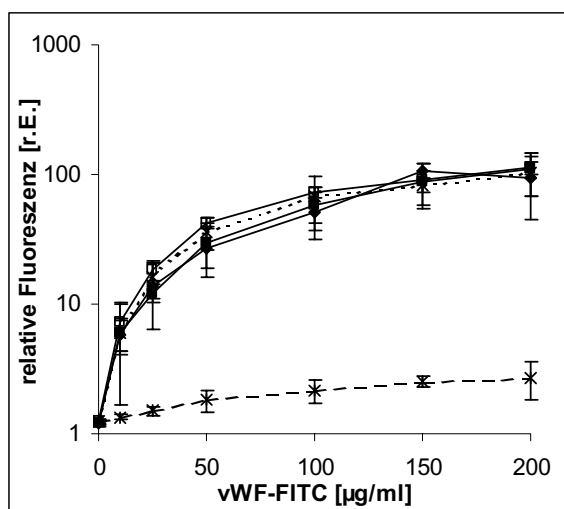
**Abb. 3-4: Bindung von Fibronektin an *S. aureus* Wildtypstämme und *S. carnosus*.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fn-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
Quadrat: *S. aureus* Cowan 1  
offenes Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
Kreuz: *S. carnosus* TM300

Fibronectin band sehr unterschiedlich stark an die getesteten *S. aureus* Wildtypen. Bei *S. aureus* Cowan 1 reichten schon 10 µg/ml Fibronectin, um eine fast vollständige Bindung zu erreichen, während bei *S. aureus* Newman und *S. aureus* 8325-4 erst bei 150 µg/ml nahezu eine Sättigung erreicht wurde. Der Stamm Cowan 1 wies bei 150 µg/ml Fibronectin eine höhere Fibronectinbindung auf als der Stamm 8325-4. Auch der Stamm Newman zeigte eine höhere Fibronectinbindung als der Stamm 8325-4.

### 3.1.4 Bindung von vWF an *S. aureus*

Auch die konzentrationsabhängige Bindung von vWF-FITC an *S. aureus* Wildtyp Stämme und *E. coli* TG1 wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* vWF konzentrationsabhängig gebunden hat, im Gegensatz zu *E. coli*, welches vWF nur in geringem Maße band (Abb. 3-5). Alle vier untersuchten *S. aureus* Wildtyp-Stämme banden vWF-FITC im gleichen Maße.



**Abb. 3-5: Bindung von vWF an *S. aureus* Wildtypstämme und *E. coli*.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen vWF-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

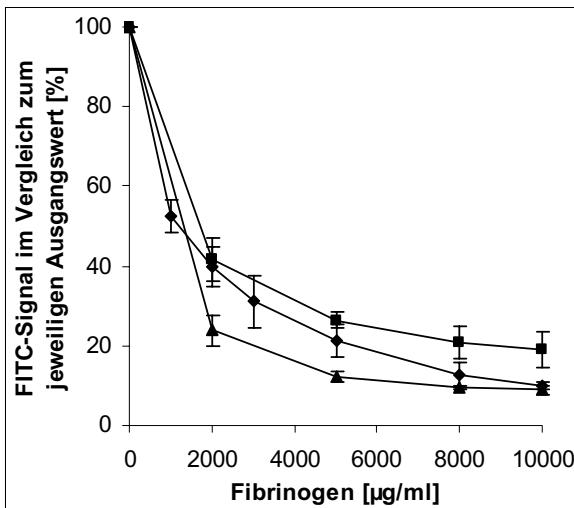
Raute: *S. aureus* Newman  
 Quadrat: *S. aureus* Cowan 1  
 Kreuz: *S. aureus* 4074  
 offenes Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
 Kreuz, gestrichelte Linie: *E. coli* TG1

### 3.1.5 Konkurrenz von Fibrinogen, TSP-1 und vWF um die Bindung an *S. aureus*

Um zu untersuchen, ob Fibrinogen mit TSP-1 und vWF um die Bindung an die gleichen Adhäsine konkurriert, wurde *S. aureus* 8325-4 mit 150 µg/ml FITC-markiertem Fibrinogen, 150 µg/ml FITC-markiertem TSP-1 bzw. 100 µg/ml FITC-markiertem vWF zusammen mit einem Überschuss an unmarkiertem Fibrinogen (bis zu 10.000 µg/ml) inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min und einem Waschschrift wurde die Bindung der FITC-markierten Proteine an *S. aureus* durchflusszytometrisch untersucht.

### 3. Ergebnisse

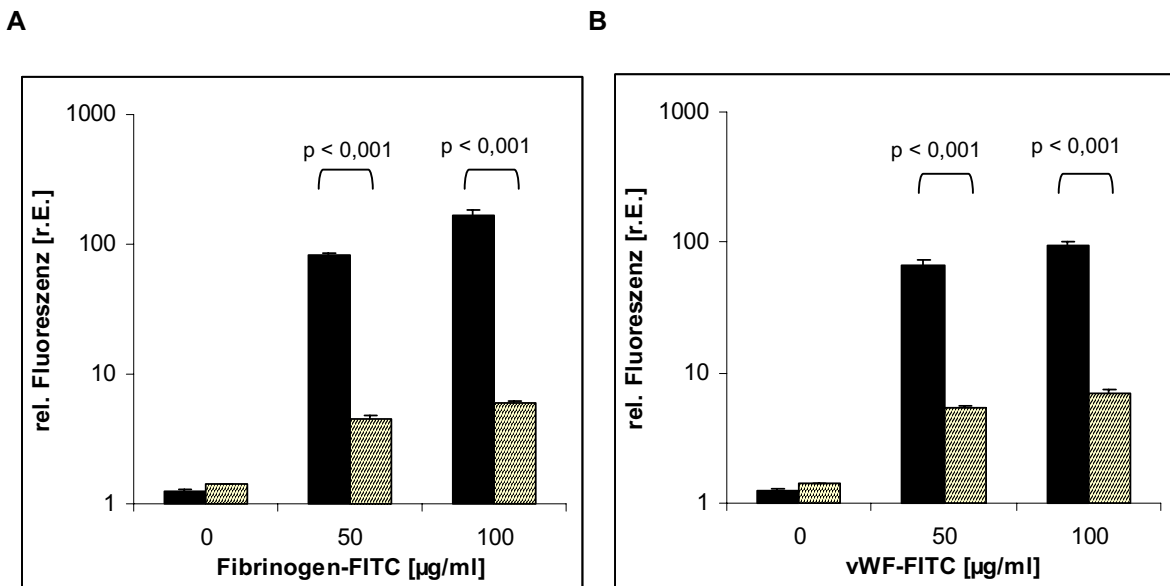
Wie in Abb. 3-6 zu sehen ist, nahm die Bindung aller FITC-markierten Proteine konzentrationsabhängig durch unmarkiertes Fibrinogen im Überschuss ab. Bei 10.000 µg/ml unmarkierten Fibrinogens war das Fibrinogen-FITC-Signal auf nur noch 10 % im Vergleich zum Ausgangswert (0 µg/ml unmarkiertes Fibrinogen) gesunken, das TSP-1-FITC-Signal auf 19 % und das vWF-FITC-Signal auf 9 %.



**Abb. 3-6: Die Bindung von löslichem markiertem Fibrinogen, vWF und TSP-1 an *S. aureus* wird durch einen Überschuss an unmarkiertem Fibrinogen inhibiert.** *S. aureus* 8325-4 wurde zeitgleich mit unmarkiertem Fibrinogen und 150 µg/ml Fg-FITC (Raute), 150 µg/ml TSP-1-FITC (Quadrat) bzw. 150 µg/ml vWF-FITC (Dreieck) inkubiert. Die Bindung wurde durchflusszytometrisch erfasst. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

#### 3.1.6 Bindung von Fibrinogen und vWF an mit Proteinase K behandelte *S. aureus*

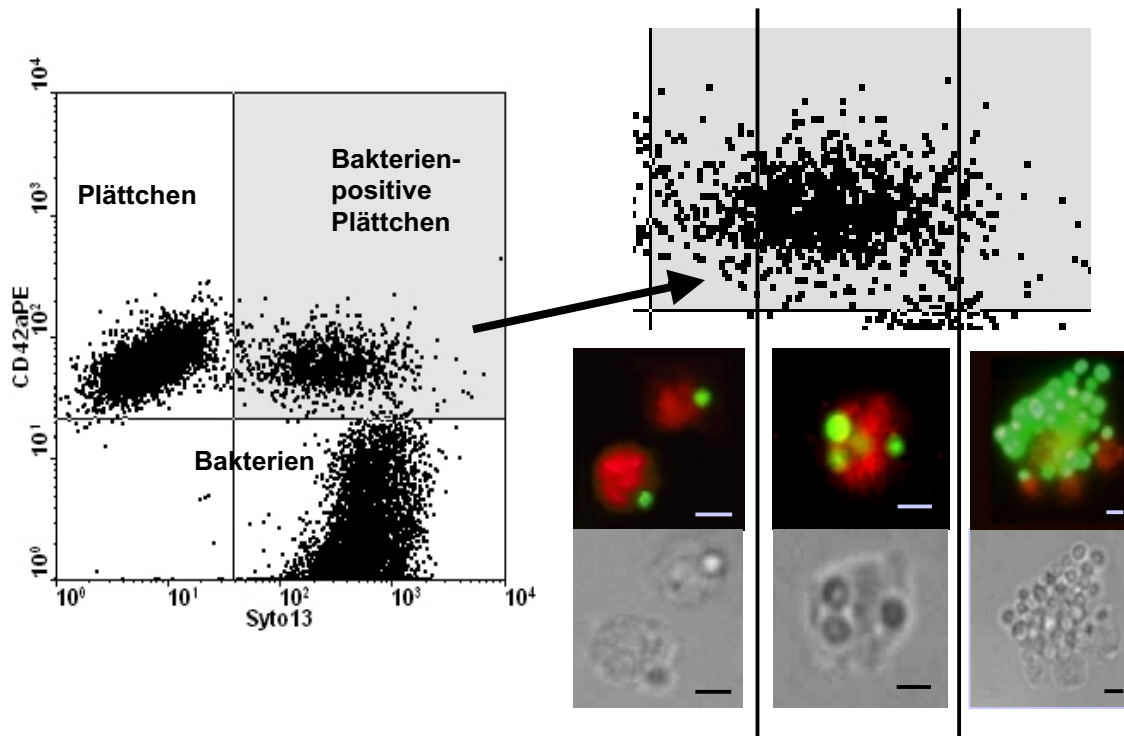
Proteinase K ist eine Protease mit endo- und exoproteolytische Aktivität. Es wurde in folgendem Versuch dazu eingesetzt, die Adhäsine auf *S. aureus* abzubauen, um zu prüfen, ob Proteine auf der Oberfläche von *S. aureus* für die volle Bindung von Glykoproteinen an *S. aureus* notwendig sind. Dazu wurde *S. aureus* Cowan 1 mit Proteinase K inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Phenylmethylsulfonyl-Fluorid gestoppt und die Proben mit TBS + 2 mM CaCl<sub>2</sub> gewaschen. Dann wurde die Bindung von Fibrinogen-FITC und vWF-FITC an *S. aureus* untersucht. Wie in Abb. 3-7 zu sehen ist, war die Bindungsfähigkeit von Fibrinogen (Abb. 3-7/A) als auch vWF (Abb. 3-7/B) nach Proteinase K-Behandlung der Bakterien signifikant verringert.



**Abb. 3-7: Die Bindung von Glykoproteinen wie Fibrinogen und TSP-1 erfolgt über Proteine auf der Oberfläche von *S. aureus*.** Nach Entfernung der Oberflächenproteine von *S. aureus* Cowan-1 durch Proteinase K wurden die Bakterien mit 50 bzw. 100 µg/ml A) Fibrinogen-FITC oder B) vWF-FITC inkubiert. Die Bindung wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die schwarze Säule zeigt die Bindung an nicht mit Proteinase K behandelte Bakterien, die gestreifte Säule die Bindung an *S. aureus* nach Entfernung der Oberflächenproteine. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

### 3.2 Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten

Zur Untersuchung der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten wurden die Thrombozyten mit anti-CD42a-PE Antikörper markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation erfolgte für 15 min. Die Untersuchung der Thrombozyten-Bakterien-Assoziate erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Es wurden dabei der prozentuale Anteil der Bakterien-tragenden Plättchen an der Gesamtzahl der gemessenen Plättchen (5000 Ereignisse/Messung) ermittelt (Abb. 3-8/A). Wie eine Zellsortierung und anschließende Fluoreszenz- und Lichtmikroskopische Auswertung der sortierten *S. aureus*-Plättchen-Assoziate ergab, wurde mit der Durchflusszytometrie schon ein Bakterium an einem Thrombozyt als Bakterien-positiv erfasst (Abb3-8/B). Die meisten Plättchen trugen mehr als ein Bakterium.



**Abb. 3-8: Bakterien-positive Plättchen können mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt werden.** Zur Untersuchung der Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten wurden die Thrombozyten mit anti-CD42a-PE Antikörper markiert und die Bakterien mit Syto 13. Zellsortierung und anschließende Fluoreszenz- und Lichtmikroskopische Auswertung der sortierten *S. aureus*-Plättchen-Assoziante ergab, dass mit der Durchflusszytometrie schon ein Bakterium an einem Thrombozyt als Bakterien-positiv erfasst wurde. Die meisten Plättchen trugen 3-4 Bakterien.

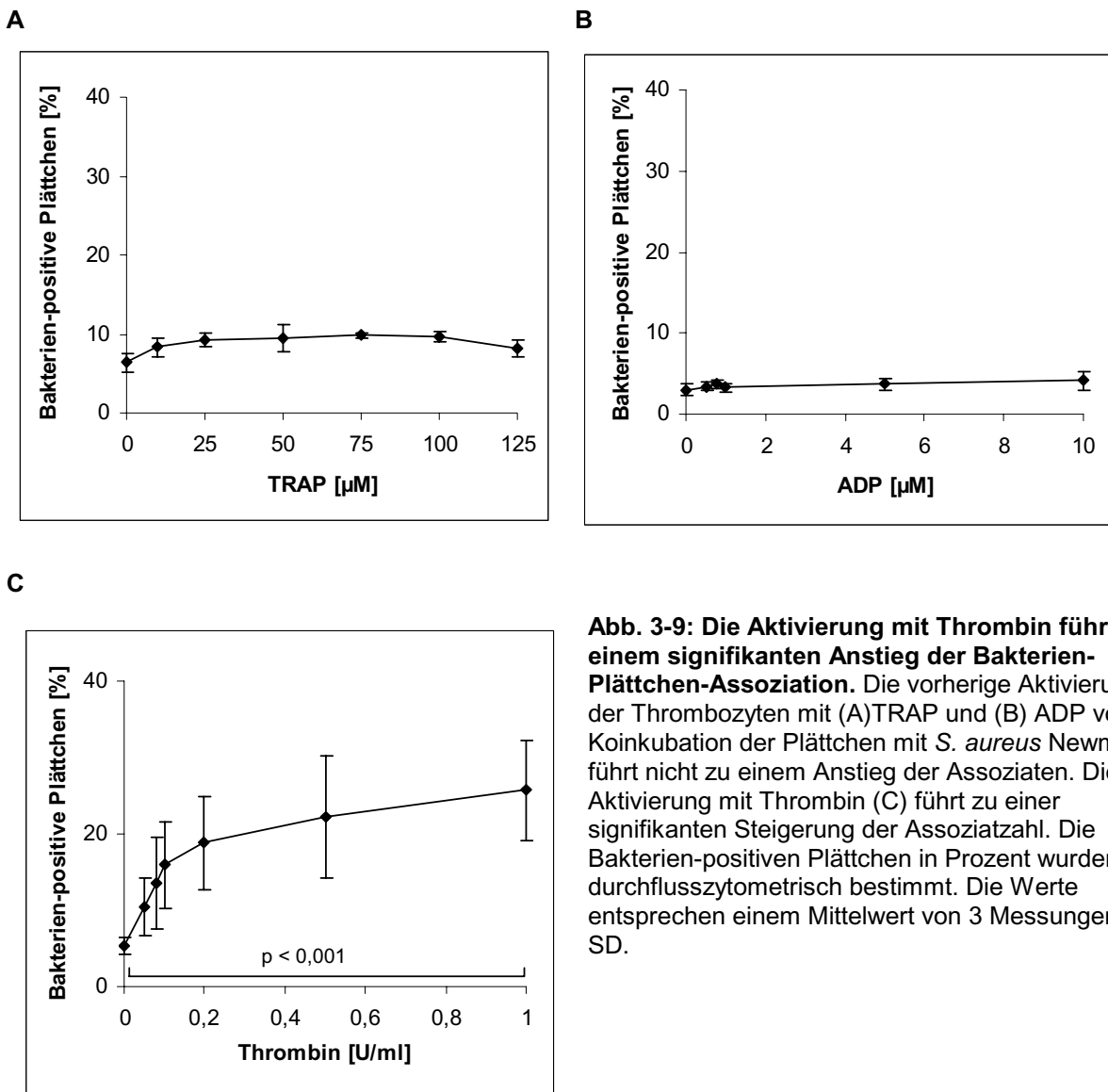
### 3.2.1 Einfluss des Aktivierungszustands der Plättchen auf die Assoziation mit *S. aureus*

Die Aktivierung der Thrombozyten durch unterschiedliche Agonisten bewirkt eine weitgehende Veränderung der Plättchen. In folgenden Versuchen sollte ermittelt werden, inwieweit diese Veränderung für die Assoziation von *S. aureus* mit Thrombozyten von Bedeutung ist. Thrombozyten im PRP wurden durch TRAP (in den Konzentrationen 10-125  $\mu$ M), ADP (0,5-10  $\mu$ M) und Thrombin (0,05-1 U/ml) aktiviert und anschließend mit *S. aureus* Newman für 10 min kokubiert. Bei der Aktivierung mit ADP und TRAP wurden 10  $\mu$ M Hirudin zugesetzt, um eine eventuelle Verfälschung der Ergebnisse durch eine sekundäre Thrombinaktivierung zu verhindern. Im Falle von Thrombin wurde das Peptid GPRP zugesetzt, um eine Fibrinpolymerisierung zu unterbinden.

Eine Aktivierung durch TRAP (Abb. 3-9/A) als auch ADP (Abb. 3-9/B) führte nur zu einem geringen, nicht signifikanten Anstieg der Thrombozyten-Bakterien-Assoziante im



Gegensatz zur Thrombinaktivierung, bei der es zu einem deutlichen Anstieg der Assoziatzahl kam (Abb. 3-9/C).



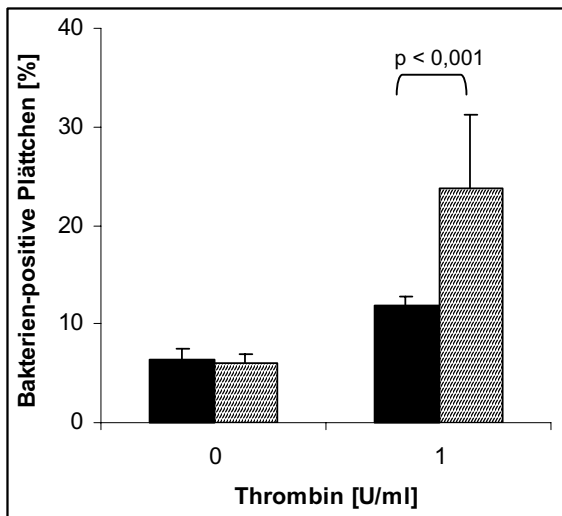
### 3.2.2 Einfluss von Plasmaproteinen auf die Assoziation von *S. aureus* und Plättchen

#### 3.2.2.1 Bindung von *S. aureus* an gefilterte Plättchen

Um zu prüfen, ob Plasmaproteinen einen Einfluss auf die Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen haben, wurde die Bindung von *S. aureus* an gefilterte, also von Plasmaproteinen befreite Thrombozyten untersucht. Die Bindung von *S. aureus* nach

### 3. Ergebnisse

Thrombinaktivierung an gefilterte Plättchen war im Vergleich zu Plättchen aus PRP signifikant erniedrigt (Abb. 3-10).

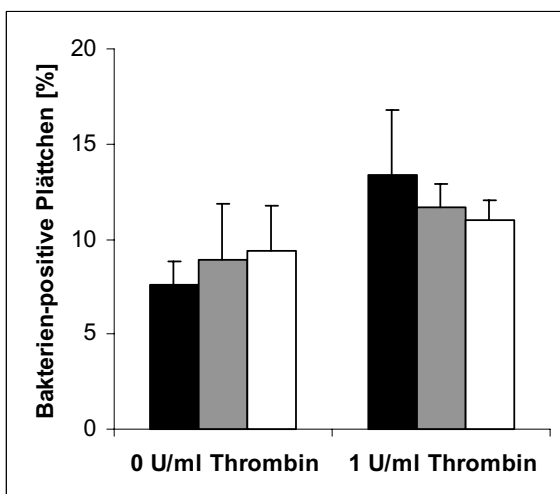


**Abb. 3.10: Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten wird nach Aktivierung der Plättchen über Plasmaproteine vermittelt.** Die Assoziation von *S. aureus* Newman mit gefilterten Plättchen (schwarze Säulen) und Plättchen in PRP (gestreifte Säulen) wurde ohne und mit Aktivierung durch 1 U/ml Thrombin durchflusszytometrisch gemessen. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

Mit den nachfolgenden Versuchen sollte die Rolle einiger Plasmaproteine (humanes Albumin, Fibrinogen, Fibrin, TSP-1, Fibronectin und vWF) bei der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation untersucht werden.

#### 3.2.2.2 Einfluss von humanem Albumin auf die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation

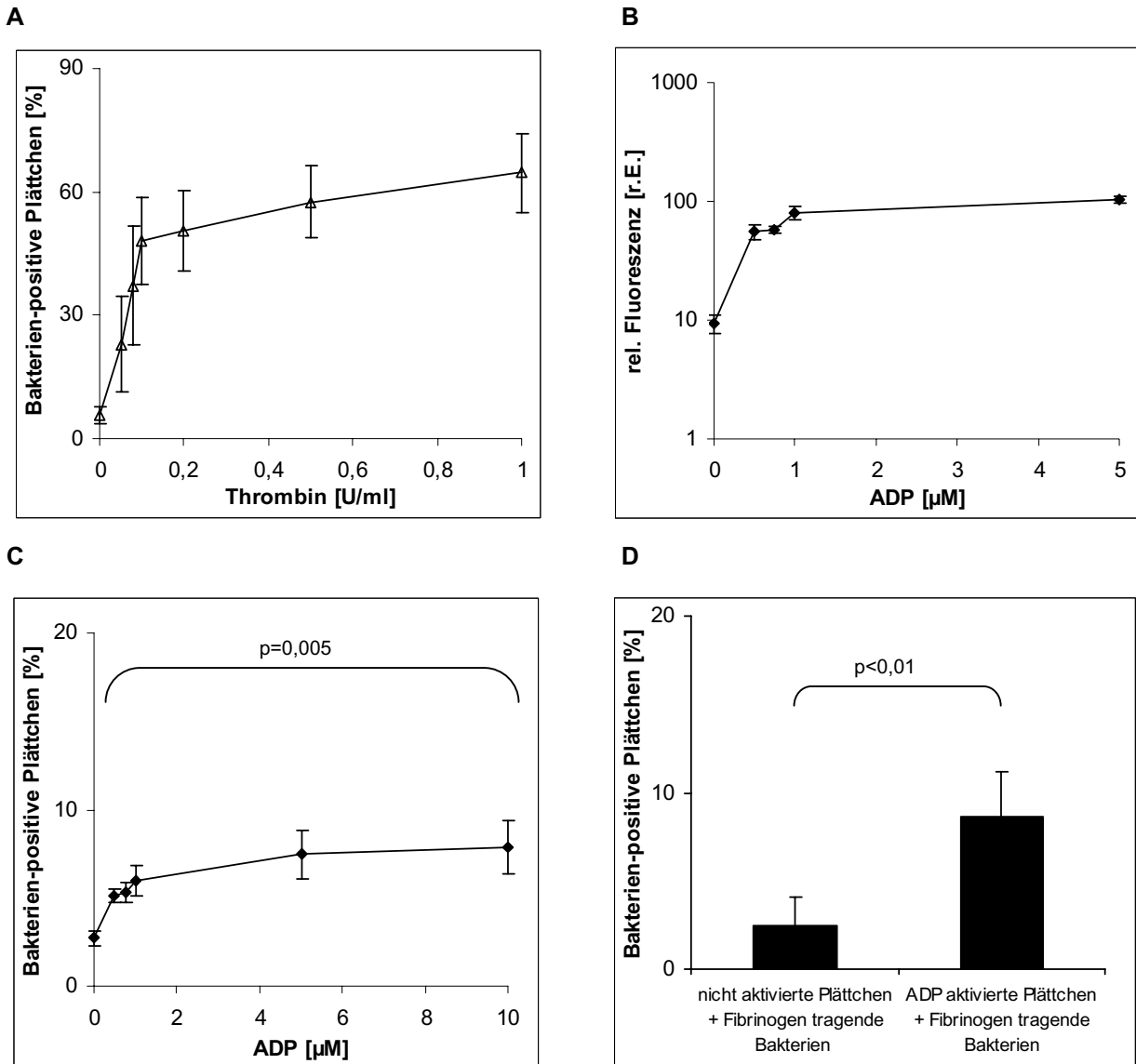
Um zu testen, ob humanes Albumin die Assoziation steigert, wurde gefilterten Plättchen vor der Aktivierung mit 1 U/ml Thrombin 0,05 bzw. 1% humanes Albumin zugesetzt. Nach 5 min Aktivierung wurde die Plättchen mit *S. aureus* Cowan 1 für 10 min koinkubiert. Durch Zusatz von humanem Albumin konnte die Bindung von *S. aureus* an Plättchen nicht gesteigert werden (Abb. 3-11).



**Abb. 3-11: Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten wird nach Aktivierung nicht durch humanes Albumin vermittelt.** Die Assoziation von *S. aureus* Cowan 1 mit gefilterten Plättchen wurde ohne und mit Aktivierung durch 1 U/ml Thrombin durchflusszytometrisch bestimmt. Vor Aktivierung wurden den Plättchen in Hapes-Tyrode-Puffer nichts (schwarze Säulen), 0,05 % humanes Albumin (graue Säulen) oder 0,1 % humanes Albumin (weiße Säulen) zugesetzt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

### 3.2.2.3 Bedeutung von Fibrinogen für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation

Um die Bedeutung von Fibrinogen für die Assoziation von *S. aureus* und Plättchen zu untersuchen, wurde dem PRP vor der Aktivierung mit Thrombin bzw. ADP 200 µg/ml Fibrinogen zugesetzt. Nach 3 min Aktivierung wurden die Plättchen für 10 min mit *S. aureus* koinkubiert.

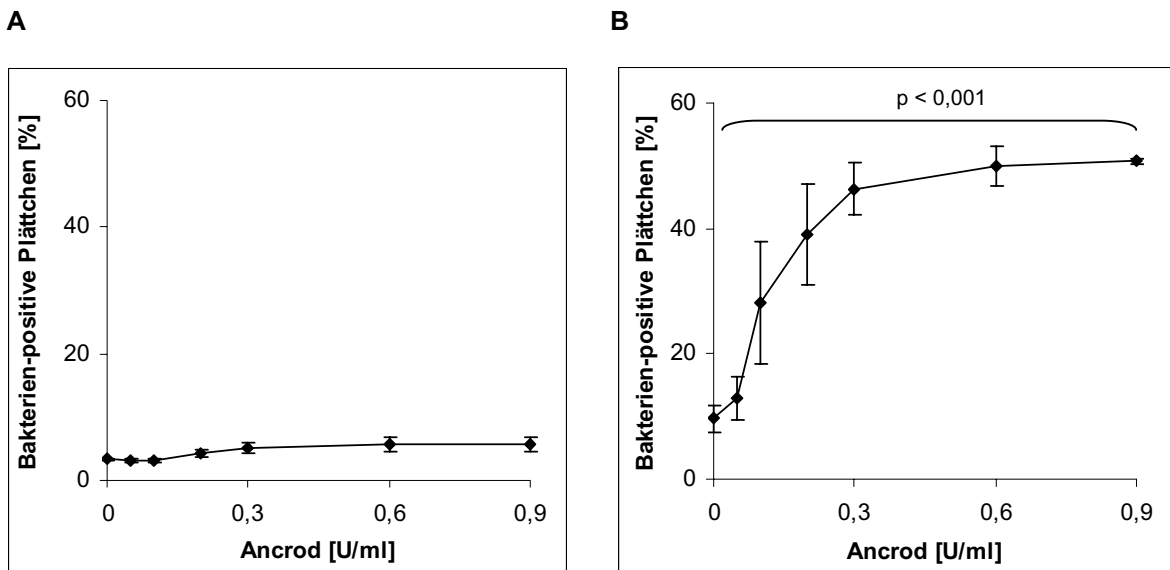


**Abb. 3-12: Fibrinogen vermittelt die Assoziation von *S. aureus* an Thrombozyten nur nach Thrombin- und nur sehr geringfügig nach ADP-Aktivierung.** (A) Der Zusatz von 200 µg/ml zu PRP führte nach Thrombinaktivierung zu einem starken Anstieg der Assoziatbildung der Plättchen mit *S. aureus* Cowan 1. (B) ADP-Aktivierung führte zu einer Fibrinogenbindung. 1 µM ADP reichte aus, um eine vollständige Bindung von Fibrinogen-FITC an Plättchen zu erhalten. (C) Der Zusatz von 200 µg/ml Fibrinogen führte nach ADP-Aktivierung der Plättchen nur zu einem geringen Anstieg der Thrombozyten-Bakterien-Assoziatzahlen. (D) Nichtaktivierte Plättchen banden nicht *S. aureus* Cowan 1, welche zuvor mit 300 µg/ml Fibrinogen beladen worden waren. Auch ADP-Aktivierung führte nur zu einem geringen Anstieg der Bakterien-positiven Plättchen. Bei Versuchen mit ADP wurden 10 U/ml Hirudin zugesetzt, um einen Thrombineinfluss zu unterbinden. Bei Versuchen mit Thrombin wurde eine Fibrinpolymerisierung durch 1,25 mM GPRP verhindert. Sowohl die Anzahl der Bakterien-positiven Plättchen als auch die Bindung von Fibrinogen an Thrombozyten wurde durchflusszytometrisch erfasst. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen ± SD.

Bei der Aktivierung mit Thrombin wurde die Assoziation von voll aktivierten Thrombozyten mit *S. aureus* durch zusätzliche 200 µg/ml Fibrinogen um das dreifache gesteigert (Abb. 3-12/A). Obwohl die Aktivierung mit ADP ausreichend war, um eine vollständige Bindung von Fibrinogen-FITC an die Thrombozyten zu bewirken (Abb. 3-12/B) und auch der Bakterienstamm *S. aureus* Cowan 1 Fibrinogen binden kann (Abb. 3-1), führte eine ADP-Aktivierung zu einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) aber nur geringen Steigerung der Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen (Abb. 3-12/C). Auch wenn statt der Thrombozyten *S. aureus* vor der Koinkubation mit den Thrombozyten für 30 min mit Fibrinogen inkubiert wurde, gab es nur eine geringe Steigerung in der Assoziation nach ADP-Aktivierung der Thrombozyten (Abb. 3-12/D).

#### **3.2.2.4 Bedeutung von löslichem Fibrin für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation**

Die vorangegangenen Versuche (s. Kap. 3.2.1 und Kap. 3.2.2.3) zeigten, dass Fibrinogen (entweder aus PRP oder aus PRP und zusätzlichem Fibrinogen) nur bei thrombinaktivierten Plättchen zu einem Anstieg der Bindung von *S. aureus* an Plättchen führte. Da Thrombin nicht nur die Plättchen aktiviert, sondern auch Fibrinogen zu Fibrin spaltet, wurde in weiteren Versuchen die Rolle von löslichem Fibrin bei der *S. aureus*-Plättchen-Assoziation untersucht. Dazu wurden Ancrod verwendet, welches die Plättchen nicht selber aktiviert. Ancrod wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (0,05-0,9 U/ml) in die Probenröhrchen vorgelegt und PRP dazu pipettiert. Bei dem vorangegangenen Einstellen des PRPs auf 25000 Tz/µl mit PBS wurde das Plasma verdünnt, der Fibrinogengehalt sank ab. Damit das Enzym Ancrod genug Substrat zum Umsetzen hat, wurde dem eingestellten PRP 200 µg/ml Fibrinogen zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 3 min mit Ancrod wurden die Plättchen für 10 min mit *S. aureus* koinkubiert und anschließend die Bindung von *S. aureus* an Plättchen im Durchflusszytometer bestimmt (Abb. 3-13/A).



**Abb. 3-13: Aktivierte Plättchen und Fibrin sind für die Assoziatbildung notwendig.** (A) Während Fibrinbildung durch Ancrod alleine nicht zu einem Anstieg der *S. aureus* Cowan 1-Plättchen-Assoziatbildung führte, (B) bildeten sich nach Fibrinbildung durch Ancrod und ADP-Aktivierung ( $2 \mu\text{M}$ ) der Plättchen viele Assoziatbildung. Der Versuch wurde im PRP, dem zusätzlich  $200 \mu\text{g/ml}$  Fibrinogen zugesetzt wurde, durchgeführt. Eine Fibrinpolymerisierung wurde mit  $1,25 \text{ mM}$  GPRP verhindert, der Einfluss von Thrombin durch den Zusatz von  $10 \text{ U/ml}$  Hirudin. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

Bei nichtaktivierten Thrombozyten wurde die Assoziatbildung von *S. aureus* Cowan 1 mit Plättchen durch die Bildung von löslichem Fibrin nur geringfügig gesteigert.

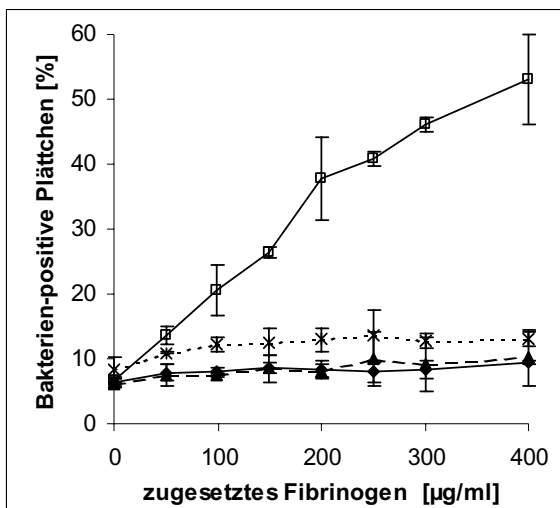
In einem weiteren Versuchansatz wurden die Thrombozyten vor der Koinkubation mit *S. aureus* Cowan 1 mit ADP ( $2 \mu\text{M}$ ) aktiviert. Das ADP wurde zusammen mit Ancrod vorgelegt (Abb. 3-13/B). Es zeigte sich bei diesem Versuchsansatz, dass die Assoziatbildung von *S. aureus* mit aktivierten Plättchen durch die Bildung von löslichem Fibrin um das fünffache gesteigert wurde ( $p < 0,001$ ). Die vermehrte Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten war dabei abhängig von der Konzentration des gebildeten löslichen Fibrins. Der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen lag bei den Versuchsbedingungen  $0,9 \text{ U/ml}$  Ancrod und  $2 \mu\text{M}$  ADP mit  $200 \mu\text{g/ml}$  Fibrinogenzusatz genauso wie bei Thrombinanregung mit  $200 \mu\text{g/ml}$  Fibrinogenzusatz über  $50 \%$ .

### 3.2.2.5 Einfluss der Konzentration des zugesetzten Fibrinogens

Nicht nur die Ancrod- sondern auch die Fibrinogenkonzentration im Versuchsansatz bestimmt die Menge an löslichem Fibrin, welches durch Ancrod gebildet wird. Deshalb wurde PRP unterschiedliche Mengen an Fibrinogen ( $50\text{-}400 \mu\text{g/ml}$  Fibrinogen, Endkonzentration) zugesetzt und der Einfluss des Fibrinogens auf nicht aktivierte

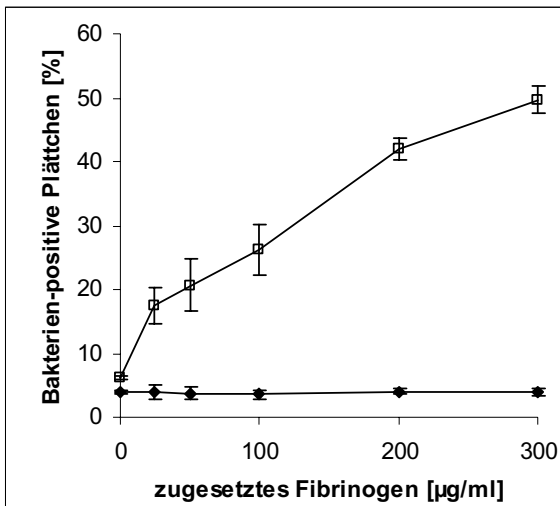
### 3. Ergebnisse

Thrombozyten, mit ADP aktivierte Thrombozyten (2  $\mu\text{M}$  ADP), und mit Fibrinogenspaltung durch Ancrod (0,4 U/ml) untersucht (Abb. 3-14). Es stellte sich heraus, dass die Fibrinogenkonzentration auf die Assoziatbildung von *S. aureus* mit nicht aktivierten Thrombozyten keinen Einfluss hat. Auch wenn das Fibrinogen durch Ancrod zu Fibrin gespalten wurde, gab es keinen Anstieg in der Assoziationsrate. Mit ADP aktivierten Thrombozyten bildeten sich leicht mehr Assoziat, aber es konnte kein deutlicher Einfluss von Fibrinogen festgestellt werden. Bei ADP-Aktivierung und Fibrinbildung durch Ancrod konnte dagegen eine deutliche Fibrinogenkonzentrationsabhängige Steigerung der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation festgestellt werden. Durch den Zusatz von 400  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen konnte eine beinahe Verneunfachung der Assoziat im Vergleich zu 0  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen erreicht werden.



**Abb. 3-14: Steigende Fibrinkonzentration führt zu einer steigenden Anzahl Bakterien-positiver Plättchen.** Wurden Plättchen in PRP unter Zusatz von Fibrinogen in steigender Konzentration inkubiert und mit *S. aureus* Newman koinkubiert, so stieg die Anzahl an Bakterien-positiven Plättchen nicht an (Raute). Auch nicht die alleinige Fibrinbildung durch 0,4 U/ml Ancrod (Dreieck) oder die alleinige Aktivierung mit 2  $\mu\text{M}$  ADP (Kreuz) führte zu einem Anstieg der Bakterien-Plättchen-Assoziat. Nur nach Fibrinbildung durch 0,4 U/ml Ancrod und Aktivierung der Thrombozyten durch 2  $\mu\text{M}$  ADP (offenes Quadrat) stieg die Anzahl der Bakterien-positiven Plättchen mit steigender Fibrinogenkonzentration, und damit steigender Fibrinkonzentration, stark an. Alle Versuche wurden unter Zusatz von 1,25 mM GPRP und 10 U/ml Hirudin durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

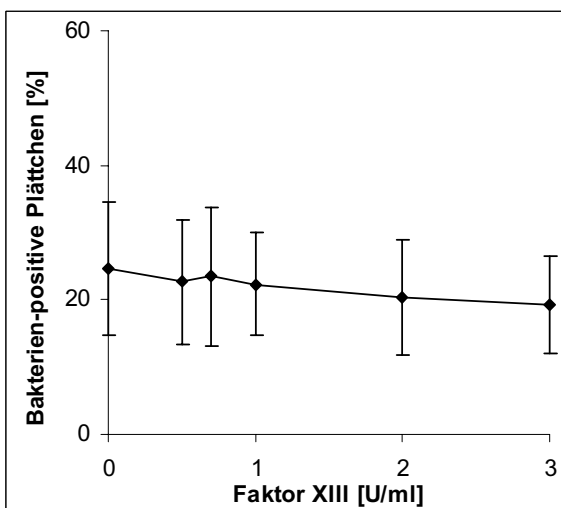
Wurde gefilterten Plättchen in Hapes-Tyrode-Puffer Fibrinogen in unterschiedlichen Konzentrationen (25 bis 300  $\mu\text{g/ml}$ ) zugesetzt und nach Aktivierung und Fibrinbildung durch Thrombin (1 U/ml, 3 min Aktivierung) mit *S. aureus* Cowan 1 koinkubiert, konnte hier bei 300  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogenzusatz eine Verachtfachung der Assoziat im Vergleich zu 0  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen beobachtet werden. Ohne Thrombinaktivierung dagegen wurde keine Steigerung der Assoziatbildung durch Fibrinogen festgestellt (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15: Die Aktivierung von gefilterten Plättchen und Fibrinbildung durch Thrombin führen mit ansteigender Fibrinogenkonzentration zu einem Anstieg der Bakterien-Plättchen-Assoziate.** Wurden gefilterte Plättchen nicht mit Thrombin aktiviert, bildeten sich keine Assoziate mit *S. aureus* Newman (Raute). Die Versuche wurden unter Zusatz von 1,25 mM GPRP durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

### 3.2.2.6 Vernetzung des durch Ancrod gebildeten Fibrins durch Faktor XIII

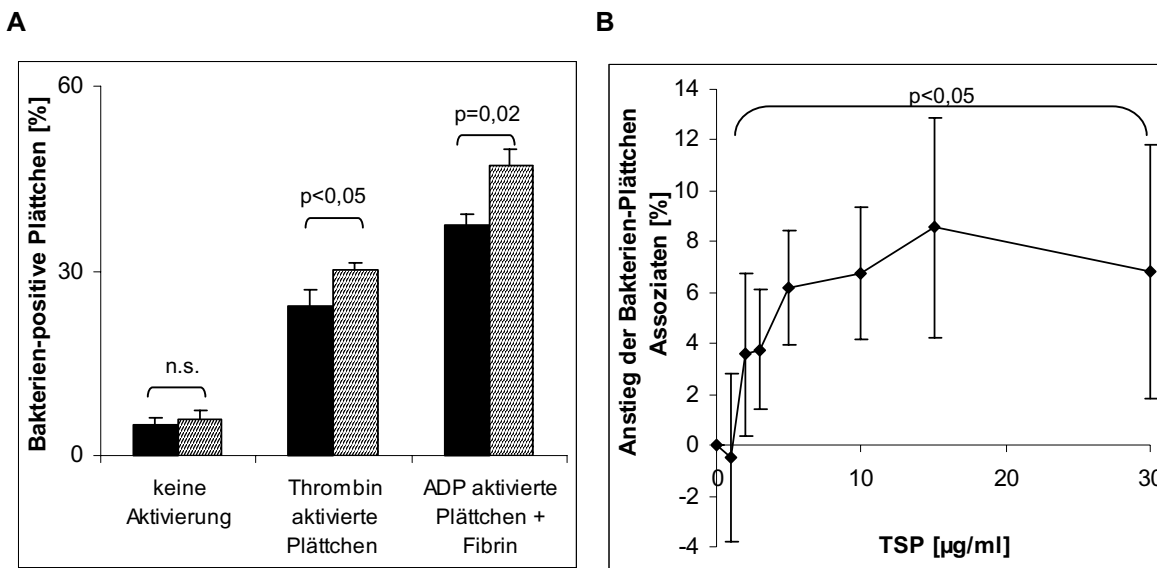
Faktor XIII hat bei der Blutgerinnung die Aufgabe, bereits gebildetes Fibrin zu vernetzen und damit das Gerinnsel zu stabilisieren. Um zu prüfen, ob eine stabile Vernetzung notwendig für die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten ist, wurde Faktor XIII in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5-3 U/ml) zusammen mit 0,4 U/ml Ancrod und 2  $\mu$ M ADP vorgelegt und anschließend das mit 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen angereicherte PRP dazu pipettiert. Nach 3 min Inkubationszeit wurden die Plättchen für 10 min mit *S. aureus* Newman kokubiert und anschließend der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass Faktor XIII keinen Einfluss auf die Bakterien-Plättchen-Assoziation hatte (Abb. 3-16).



**Abb. 3-16: Eine stabile Vernetzung des Fibrins durch Faktor XIII ist nicht notwendig für die Bindung von *S. aureus* an Plättchen.** Die Plättchen in PRP (angereichert mit 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen) wurden mit ansteigender Konzentration Faktor XIII zusammen mit 0,4 U/ml Ancrod und 2  $\mu$ M ADP inkubiert und anschließend mit *S. aureus* Newman kokubiert. Der Versuch wurde unter Zusatz von 1,25 mM GPRP und 10 U/ml Hirudin durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

### 3.2.2.7 Bedeutung von Thrombospondin-1 für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation

In einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten vorangegangenen Patientenuntersuchung wurde festgestellt, dass Thrombozyten, denen die  $\alpha$ -Granula fehlen, wie es bei dem „Gray-platelet-Syndrom“ der Fall ist, eine stark verringerte Assoziation mit *S. aureus* haben (Spehr, 2001, Niemann, 2004). Ein Großteil des in den  $\alpha$ -Granula gespeicherten Proteins ist das TSP-1. Nach Freisetzung aus den  $\alpha$ -Granula nach Aktivierung der Thrombozyten wird es auf der Thrombozytenoberfläche zurückgebunden (Wolf *et al.*, 1986). In folgendem Versuch wurde die Bedeutung von TSP-1 für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation untersucht. Da die Patienten mit „Gray-platelet-Syndrom“ als Folge ihrer Krankheit nicht ein weiteres Mal unser Labor besuchen konnten, wurde dem PRP von gesunden Probanden zusätzlich 15  $\mu\text{g/ml}$  TSP-1 zugesetzt.



**Abb. 3-17: TSP-1 Zusatz erhöht die Anzahl der Plättchen *S. aureus* Cowan 1 Assoziat.**

(A) Gereinigtes TSP-1 (15  $\mu\text{g/ml}$ ) wurde dem Plasma von gesunden Blutspendern zugesetzt (gestreifte Säulen) und mit der Bindung von *S. aureus* Newman an Plättchen in PRP ohne TSP-1-Zusatz (schwarze Säulen) verglichen. Zur Thrombinaktivierung wurden 1 U/ml Thrombin verwendet. Die ADP-Aktivierung geschah mit 2  $\mu\text{M}$  ADP und Fibrin wurde aus Fibrinogen (PRP+200  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen) durch 0,4 U/ml Ancrod gebildet. Die Abbildung (B) zeigt den TSP-1-konzentrationsabhängigen Anstieg der Bakterien-Plättchen-Assoziaten. Die Plättchen in PRP (+ 200  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen) wurden, vor der Koinkubation mit *S. aureus* Cowan 1, mit 2  $\mu\text{M}$  ADP aktiviert und Fibrin aus Fibrinogen wurde durch 0,4 U/ml Ancrod gebildet. Die Versuche wurde unter Zusatz von 1,25 mM GPRP und im Falle von ADP-Aktivierung unter Zusatz von 10 U/ml Hirudin durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

Nach Aktivierung der Thrombozyten mit 1 U/ml Thrombin bzw. mit 2  $\mu\text{M}$  ADP (nach 200  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen und 0,4 U/ml Ancrod Zusatz) wurden die Plättchen mit *S. aureus* Cowan 1 inkubiert. Es konnten gezeigt werden, dass TSP-1 die Assoziation von *S.*



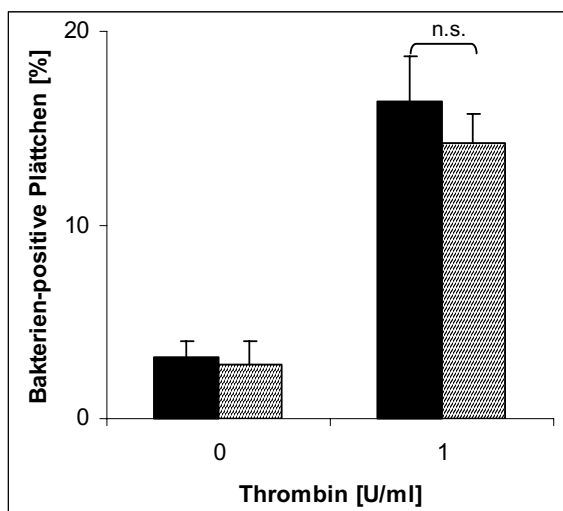
*aureus* mit Plättchen signifikant steigern kann (Abb. 3-17/A). Die Abb. 3-17/B zeigt, dass die Zunahme der Bakterien-Plättchen-Assoziate von der Konzentration des zugesetzten TSP-1 abhängig war.

### 3.2.2.8 Einfluss von Fibronektin auf die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation

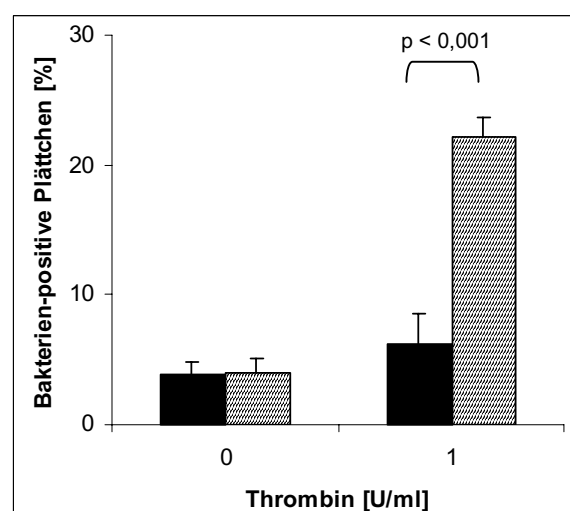
Fibronektin ist ein weiteres adhäsives Protein, welches von den Thrombozyten in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und bei Plättchenaktivierung abgegeben wird. Auf Seite der Thrombozyten kann es an den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa anbinden und an den Fibronektinrezeptor  $\alpha_5\beta_1$ .

PRP wurde 50  $\mu\text{g/ml}$  Fibronektin zugesetzt und nach Thrombinaktivierung und Koinkubation mit *S. aureus* Cowan 1 die Assoziatbildung gemessen. Im Gegensatz zum TSP-1-Zusatz konnte bei Fibronektinzusatz zu PRP keine Steigerung der Assoziatbildung nach Thrombinaktivierung im Vergleich zu PRP ohne Fibronektinzusatz festgestellt werden (Abb. 3-18/A). Um die „Maskierung“ des Fibronektineinflusses durch den Einfluss anderer Plasmaproteine zu verhindern, wurde der Versuch auch mit gelfiltrierten Thrombozyten durchgeführt. Hier zeigte sich nach Thrombinaktivierung eine starke Zunahme an *S. aureus*-Plättchen-Assoziaten bei Zusatz von Fibronektin zu den gelfiltrierten Thrombozyten (Abb. 3-18/B). Ohne Aktivierung der Thrombozyten war keine Steigerung der Assoziatbildung zu beobachten. Der Einfluss des Fibronektins auf die Assoziatbildung war von der Konzentration des Fibronektins abhängig. Bei einem Zusatz von 25  $\mu\text{g/ml}$  Fibronektin zu gelfiltrierten Plättchen und nach Thrombinaktivierung der Plättchen war die maximale Steigerung der Assoziation durch das Protein erreicht (Abb. 3-18/C).

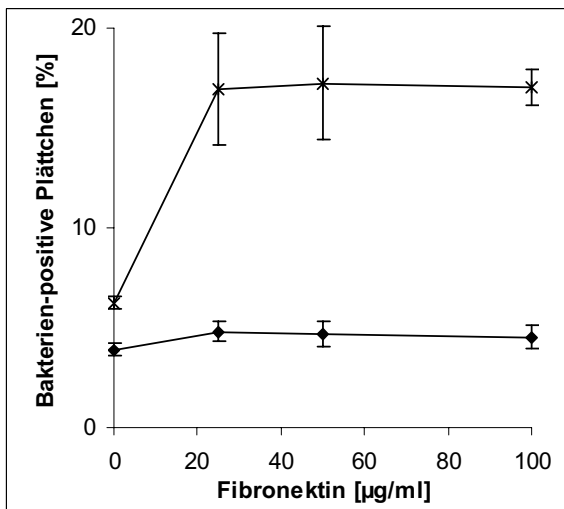
**A**



**B**



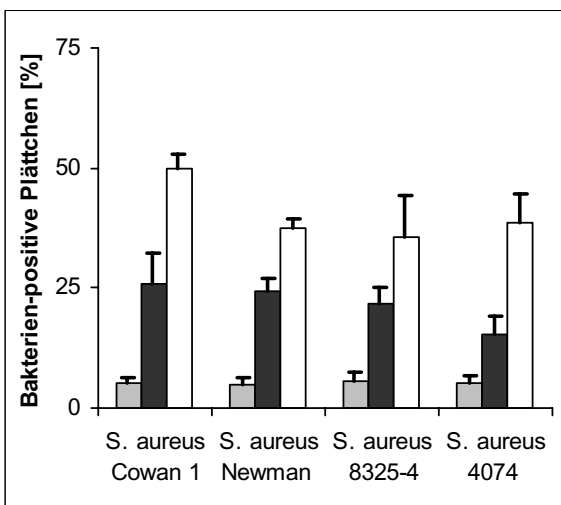
C



**Abb. 3-18: Fibronektin vermittelt die Bindung von S. aureus Cowan 1 an aktivierte Plättchen.** (A) Während der Zusatz von 50 µg/ml Fibronektin zu PRP die Bindung von S aureus an Plättchen (gestreifte Säulen) im Vergleich zu PRP ohne Zusatz (schwarze Säulen) nicht veränderte, wurde bei gefilterten Plättchen die S. aureus-Plättchenassoziation durch 50 µg/ml Fibronektin (gestreifte Säule) im Vergleich zu der Assoziation mit gefilterten Plättchen ohne Zusatz (schwarze Säulen) nach Aktivierung der Thrombozyten mit 1 U/ml Thrombin stark erhöht (B). Der Anstieg war von der Konzentration des Fibronektins abhängig und vom Aktivierungszustand der Plättchen (C), Raute: nicht aktivierte Plättchen, Kreuz: Aktivierung der Plättchen mit 1 U/ml Thrombin. Die Versuche wurde unter Zusatz von 1,25 mM GPRP durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

### 3.2.3 Assoziatbildung von unterschiedlichen S. aureus Wildtyp-Stämmen mit Thrombozyten

Die S. aureus Wildtyp-Stämme unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Adhäsine auf ihrer Oberfläche. Da die Adhäsine für die Interaktion mit anderen Zellen als wichtig angesehen werden, wurde überprüft, ob auch die Wildtypstämme S. aureus Newman, 8325-4 und der aus einem Endokarditis-Patienten isolierte Stamm 4074 wie der Stamm Cowan 1 nach Thrombinanregung bzw. ADP-Anregung und Fibrinbildung mit vermehrter Assoziatbildung reagieren.

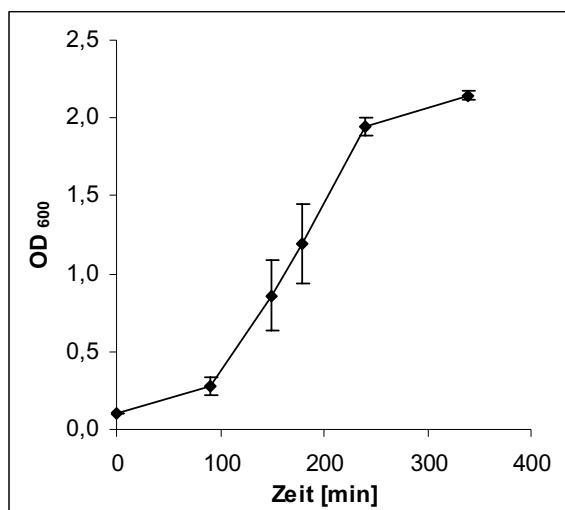


**Abb. 3-19: Alle untersuchten S. aureus Stämme sind in der Lage, nach Fibrinbildung an aktivierte Plättchen zu binden.** Die untersuchten S. aureus Laborstämme und auch der aus einem Endokarditis-Patienten isolierte Stamm 4074 zeigten das gleiche Verhalten: kaum Bindung an nichtaktivierte Plättchen (graue Säulen), Bindung an durch 1 U/ml Thrombin aktivierte Plättchen (schwarze Säulen), und hohe Assoziatanzahlen nach Aktivierung der Plättchen durch 2 µM ADP und Fibrinbildung durch Ancrod (Fibrin aus PRP + 200 µg/ml Fibrinogen) (weisse Säulen). Die Versuche wurde unter Zusatz von 1,25 mM GPRP und im Falle von ADP-Aktivierung unter Zusatz von 10 U/ml Hirudin durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

Es konnte gezeigt werden, dass alle überprüften Stämmen nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin mehr Assoziante bildeten als ohne Aktivierung der Plättchen, und dass ADP-Aktivierung der Thrombozyten und Fibrinbildung, nach Zusatz von 200 µg/ml Fibrinogen, zu noch mehr Assoziaten führte (Abb. 3-19).

### 3.2.4 Einfluss der Bakterienwachstumsphase auf die Assoziation

*S. aureus* Adhäsine werden während der Bakterienwachstumsphasen in unterschiedlichen Mengen auf der Bakterienoberfläche exprimiert. Deshalb wurde untersucht, ob es bei dem exemplarisch ausgewählten Wildtypstamm Newman Unterschiede in der Bindung an Thrombozyten gibt, wenn Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase für die Versuche verwendet wurden im Vergleich zu Bakterien aus einer Übernachtskultur. Zur Feststellung der Wachstumsphase wurde *S. aureus* Newman aus einer Übernachtskultur in BHI-Medium pH 7,4 auf eine  $OD_{600}=0,1$  eingestellt und dann unter Schütteln bei 37°C bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurde die  $OD_{600}$  bestimmt und daraus eine Wachstumskurve erstellt (Abb. 3-20).

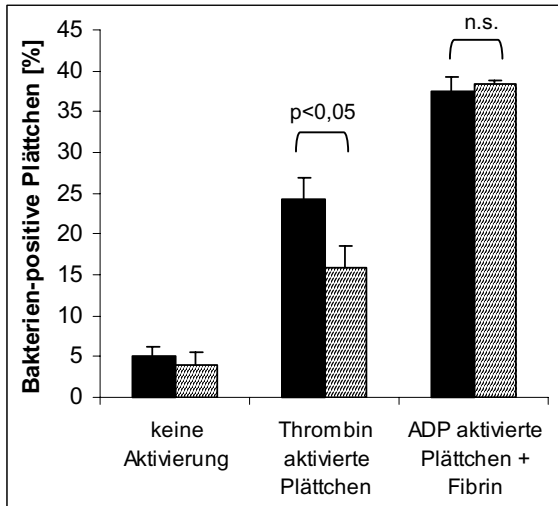


**Abb. 3-20: Wachstumskurve von *S. aureus*.** *S. aureus* Newman aus einer Übernachtskultur wurde in BHI-Medium auf eine  $OD_{600}=0,1$  eingestellt und dann unter Schütteln bei 37°C bebrütet. In regelmäßigen Abständen wurde die  $OD_{600}$  bestimmt und eine Wachstumskurve erstellt

Für den weiteren Versuch wurden Bakterien verwendet, die in ihrem Wachstum eine  $OD_{600} = 0,8$  erreicht hatten, im Gegensatz zu Übernachtskulturen mit einer  $OD_{600}$  von etwa 2. Nur nach Thrombinaktivierung der Thrombozyten zeigten die Bakterien aus der Wachstumsphase eine verringerte Anzahl an Assoziaten ( $p = 0,019$ ) im Vergleich zu Bakterien aus der Übernachtskultur. Ohne Aktivierung oder nach ADP-Aktivierung und

### 3. Ergebnisse

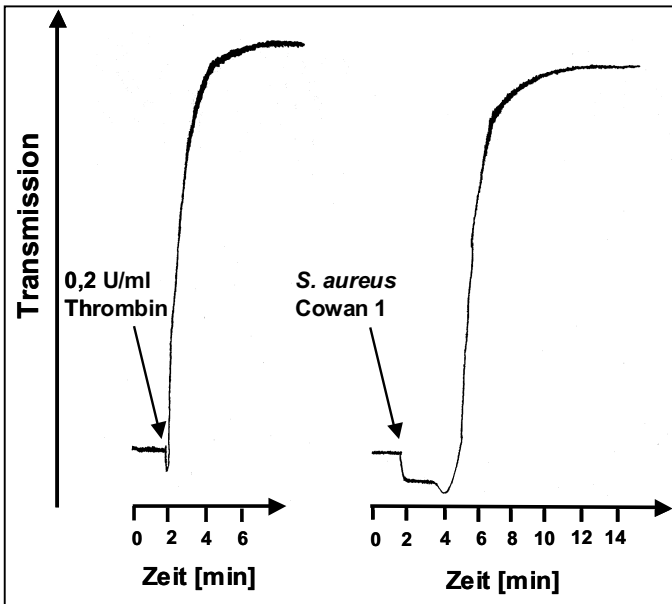
Fibrinbildung (nach Zusatz von 200 µg/ml Fibrinogen) war der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen dagegen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 3-21).



**Abb. 3-21: Bakterien aus der Übernachtskultur zeigen ein ähnliches Verhalten wie Bakterien aus der logarithmischen Phase des Wachstums.** Sowohl *S. aureus* Newman aus der Übernachtskultur (schwarze Säulen) als auch Bakterien aus der Wachstumsphase ( $OD_{600}=0,8$ ; gestreifte Säulen) binden kaum an nichtaktivierte Thrombozyten, stärker binden sie an durch 1 U/ml aktivierte Thrombozyten und am höchsten sind die Assoziationszahlen nach Aktivierung der Plättchen durch 2 µM ADP und Fibrinbildung durch Ancrod (Fibrin aus PRP + 200 µg/ml Fibrinogen). Die Versuche wurden unter Zusatz von 1,25 mM GPRP und im Falle von ADP-Aktivierung unter Zusatz von 10 U/ml Hirudin durchgeführt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

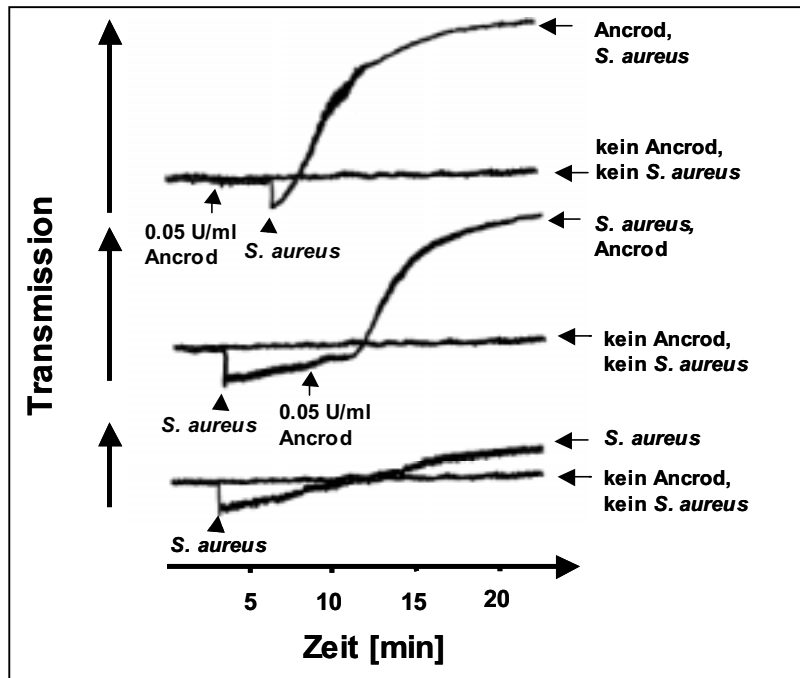
### 3.3 Aggregation von Thrombozyten nach Fibrinbildung und *S. aureus* Zusatz

Um den Einfluss von *S. aureus* auf die Plättchenaggregation zu prüfen, wurden Plättchen aus PRP (auf 200.000 Tz/µl mit PPP eingestellt) in einer silanisierten Glasküvette mit *S. aureus* Cowan 1 inkubiert und der Verlauf der Aggregation der Plättchen mit einem Aggregometer verfolgt. In Abb. 3-22 ist exemplarisch ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt. Zuvor war die Fähigkeit der Plättchen zur Aggregation in einem anderen Versuchsansatz durch das Hinzufügen von 0,2 U/ml Thrombin zu dem eingestellten PRP getestet worden. Wie auch bei Thrombinaktivierung erfolgte die Aggregation, die durch *S. aureus* ausgelöst wurde, monophasisch. Im Gegensatz zu der Aktivierung durch Thrombin trat die Aggregation nicht sofort nach Zugabe der Bakterien ein, sondern nach einer „lag-time“ von 3+/-1 min.



**Abb. 3-22: *S. aureus* Cowan 1 löst die Plättchenaggregation aus**  
 Plättchen in PRP (auf 200.000 Tz/ $\mu$ l mit PPP eingestellt) wurden in einer silanisierten Glasküvette mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert oder mit *S. aureus* Cowan 1 inkubiert und der Verlauf der Aggregation der Plättchen mit einem Aggregometer verfolgt. Exemplarisch wurde ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt.

In einem weiteren Versuch wurde die Bedeutung von Fibrinogen und Fibrin für die von *S. aureus* ausgelöste Aggregation untersucht. Dazu wurden gelfiltrierte Thrombozyten mit HEPES-Tyrode-Puffer, pH 7,4, auf 200.000 Tz/ $\mu$ l eingestellt. Außerdem wurde den gelfiltrierten Thrombozyten 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen und GPRP in einer Endkonzentration von 1,25 mM zugesetzt. 10 U/ml Hirudin verhinderten eine sekundäre Thrombinaktivierung. Es wurde die Aggregation nach *S. aureus* Zusatz geprüft und der Aggregationsverlauf verfolgt, wenn dem Ansatz Ancrod in einer Endkonzentration von 0,05 U/ml vor oder nach *S. aureus* Zugabe hinzupipettiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Fibrinbildung nur kleine Aggregate gebildet wurden. Mit Fibrinbildung durch Ancrod dagegen wurde die volle Plättchenaggregation induziert. Dabei war es nicht wichtig, ob Ancrod vor oder nach den Bakterien dem Ansatz zugesetzt wurde (exemplarisch wurde in Abb. 3-23 ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt). Eine zusätzliche Anregung der Thrombozyten z. B. durch ADP war bei diesem Versuchsansatz nicht notwendig



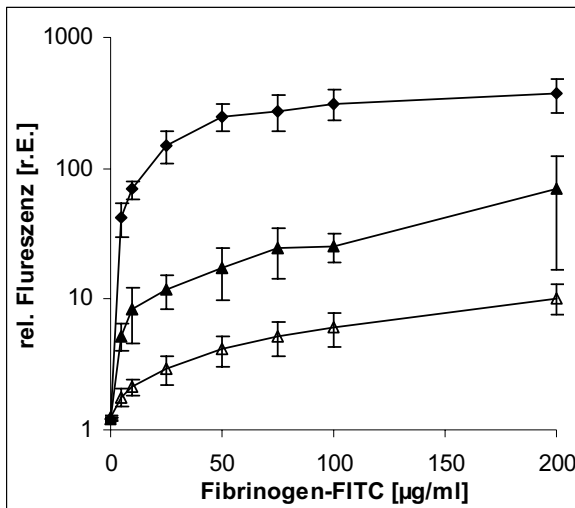
**Abb. 3-23: *S. aureus* Cowan 1 induziert die Aggregation von gefilterten Plättchen nach Fibrinbildung.** *S. aureus* ohne Ancrod löste nur die Bildung von kleinen Plättchenaggregaten aus, *S. aureus* Zusatz und Fibrinbildung durch Ancrod (0,05 U/ml) dagegen induzierte die vollständige Plättchenaggregation, unabhängig davon, ob Ancrod vor oder nach *S. aureus* hinzugefügt wurde. 10 U/ml Hirudin verhinderten die sekundäre Thrombinaktivierung. Exemplarisch wurde ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt.

### 3.4 Bindung von Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin an genetisch veränderte *S. aureus* Stämme

#### 3.4.1 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von Fibrinogen

##### 3.4.1.1 Bindung von Fibrinogen an Clumping factor (Clf) B und ClfA/ClfB defiziente *S. aureus* Stämme

Es wurden durchflusszytometrische Messungen zur Fibrinogen-Bindung mit ClfB und ClfA/B negativen Mutanten von *S. aureus* Newman durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Clf Mutanten weniger lösliches Fibrinogen-FITC banden, als der isogene Wildtyp-Stamm Newman. Dabei band der ClfB negative Stamm DU5943 5,4 mal weniger Fibrinogen bei 200 µg/ml Fibrinogen-FITC. Bei dem ClfA/B negativem Stamm DU5944 kam es sogar im Vergleich zum Wildtypstamm Newman zu einer Reduktion um den Faktor 37 (Abb. 3-24).



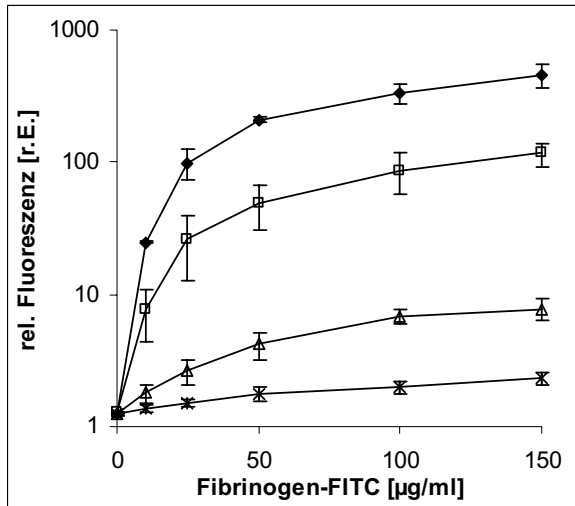
**Abb. 3-24: Bindung von Fibrinogen an ClfB und ClfA/ClfB defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
 Dreieck: *S. aureus* DU5943 (*cflB*)  
 offenes Dreieck: *S. aureus* DU5944 (*cflA/cflB*)

### 3.4.1.2 Bindung von Fibrinogen an *S. carnosus* Stämme, welche das Fibronectinbindeprotein A (FnBPA) bzw. das Fibronectinbindeprotein B (FnBPB) produzieren

Zur Untersuchung der Bindung von Fibrinogen an FnBPA und FnBPB wurden *S. carnosus* Stämme genommen, in welchen die Gene, die FnBPA und FnBPB (*fnbA* wird durch das Plasmid pFNBA4 codiert und *fnbB* durch das Plasmid pFNBB4) codieren, heterolog exprimiert werden. Die Wildtypstämme *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* Cowan 1 dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle (Abb. 3-25). Beide FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme zeigten eine deutlich höhere Bindung von Fibrinogen als der Wildtyp *S. carnosus* TM300, wobei die gebundene Fibrinogenmenge abhängig von der zugegebenen Fibrinogenkonzentration war. Dabei gab es aber signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen: während *S. carnosus* (pFNBB4) bei der höchst eingesetzten Fibrinogenkonzentration (150 µg/ml Fibrinogen-FITC) nur das 3,4-fache der Menge an Fibrinogenmolekülen im Vergleich zum Wildtypstamm *S. carnosus* TM300 band, war bei *S. carnosus* (pFNBA4) die anbindende Fibrinogenmenge um das 50-fache gesteigert und band damit  $\frac{1}{4}$  der Fibrinogenmolekülanzahl, die an *S. aureus* Cowan 1 gebunden war.

### 3. Ergebnisse

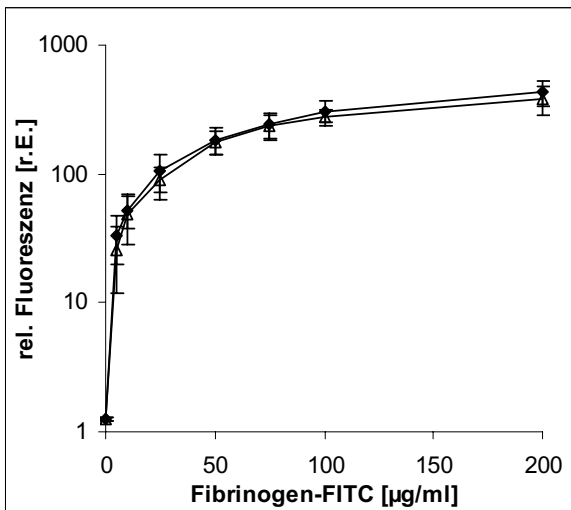


**Abb. 3-25: Bindung von Fibrinogen an *S. carnosus* Stämme, welche *fnbA* bzw. *fnbB* exprimieren.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Kreuz: *S. carnosus* TM300  
offenes Quadrat: *S. carnosus* TM300 (pFNBA4)  
offenes Dreieck: *S. carnosus* TM300 (pFNBB4)  
Raute: *S. aureus* Cowan 1

#### 3.4.1.3 Bindung von Fibrinogen an Eap defiziente *S. aureus* Mutante

Bei der Bindung von Fibrinogen an die *S. aureus* Eap defiziente Mutante AH12 konnte kein Unterschied zum isogenen Wildtyp *S. aureus* Newman festgestellt werden (Abb. 3-26).



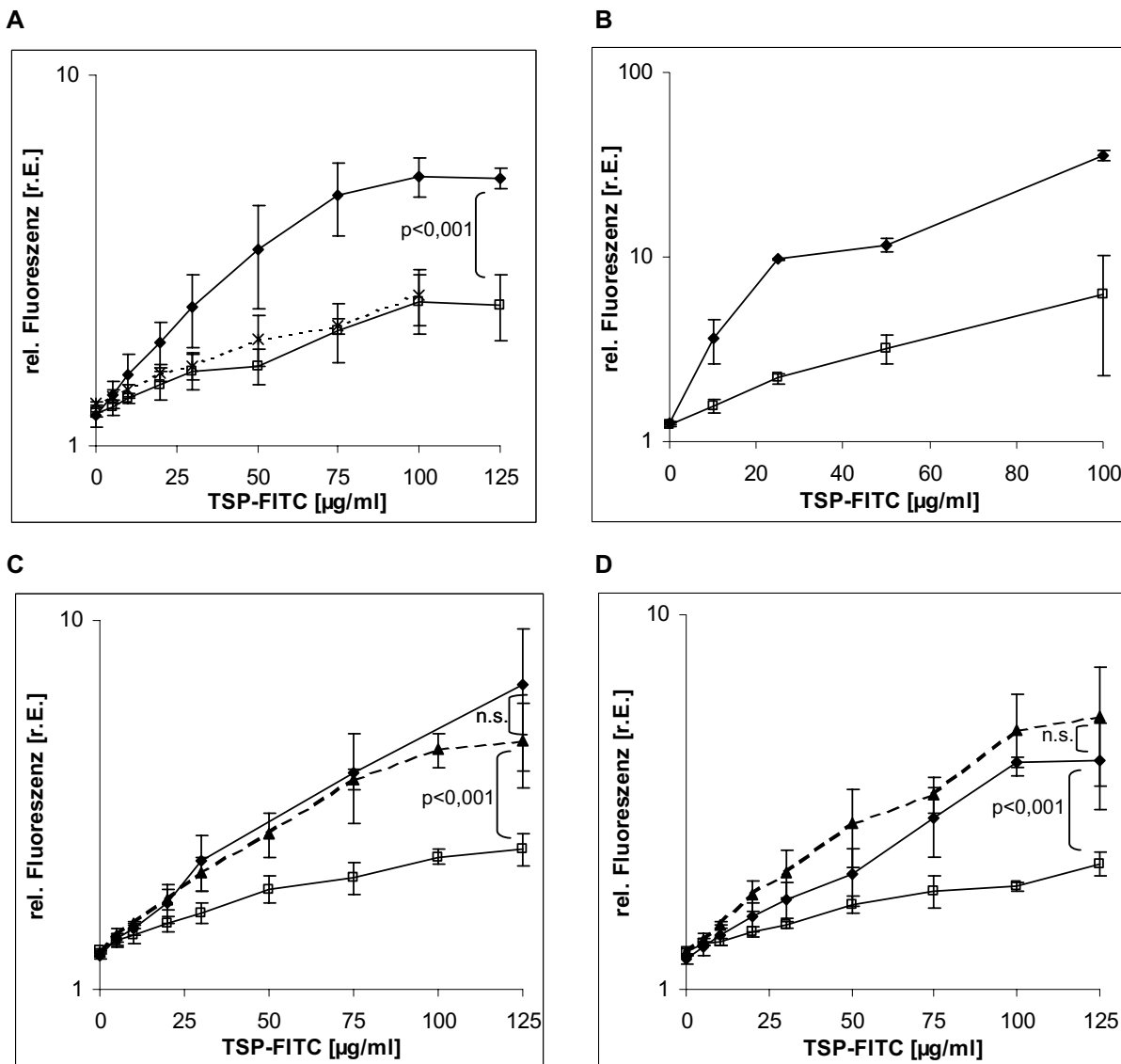
**Abb. 3-26: Bindung von Fibrinogen an einen Eap defizienten *S. aureus* Stamm.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
offenes Dreieck: *S. aureus* AH12 (*eap*<sup>-</sup>)



### 3.4.2 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von TSP-1

#### 3.4.2.1 Bindung von TSP-1 an *S. aureus* Protein A defiziente Mutanten



**Abb. 3-27: Bindung von TSP-1 an Protein A arme bzw. defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Abb. 3-27 (A): Raute: *S. aureus* Newman  
 Quadrat: *S. aureus* Wood 46, Protein A arm  
 Kreuz: *E. coli* TG1

Abb. 3-27 (B): Raute: *S. aureus* Cowan 1  
 Quadrat: *S. aureus* DU5889 (*spa*<sup>-</sup>)

Abb. 3-27 (C): Raute: *S. aureus* Newman  
 Quadrat: *S. aureus* DU5873 (*spa*<sup>-</sup>)  
 Dreieck: *S. aureus* DU5873 komplementiert mit *spa*

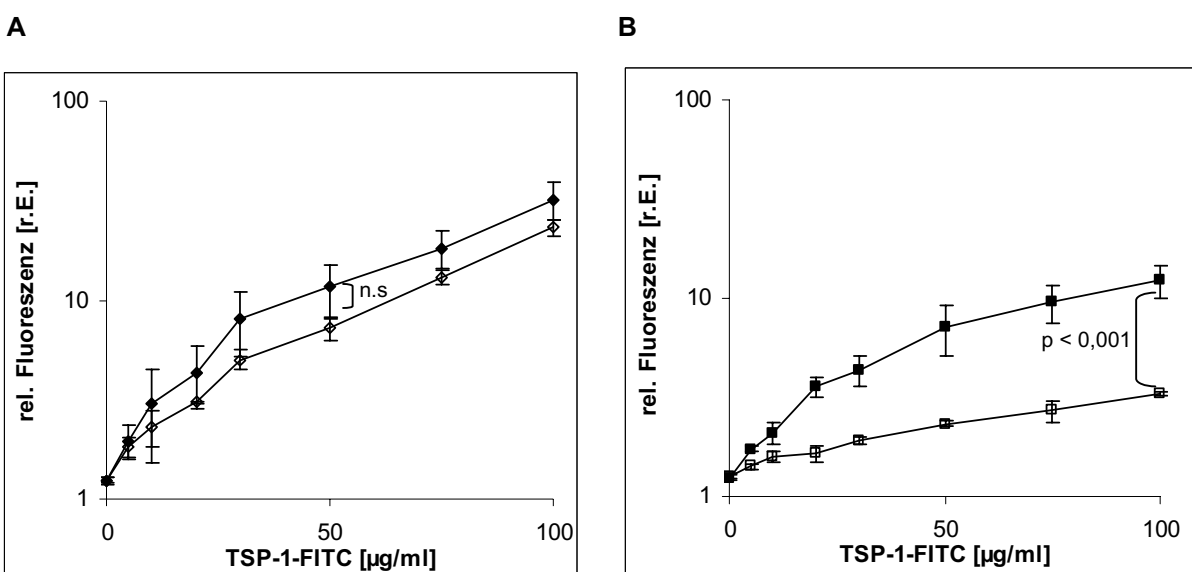
Abb. 3-27 (D): Raute: *S. aureus* 8325-4  
 Quadrat: *S. aureus* DU5875 (*spa*<sup>-</sup>)  
 Dreieck: *S. aureus* DU5875 komplementiert mit *spa*

### 3. Ergebnisse

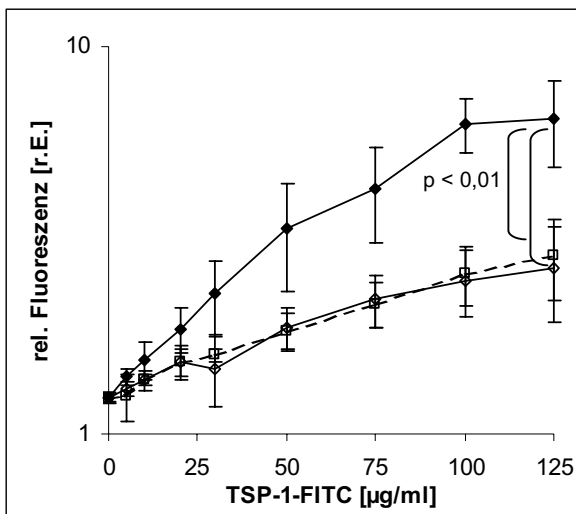
Der Protein A arme *S. aureus* Stamm Wood 46 zeigte eine deutlich verminderte Bindung von TSP-1-FITC im Vergleich zum Wildtypstamm *S. aureus* Newman; ähnlich gering wie die Negativkontrolle *E. coli* TG1 (Abb. 3-27/A). Auch die Protein A Deletionsmutante DU5889 aus *S. aureus* Cowan 1 hatte eine um den Faktor 5,7 verminderte Bindung von TSP-FITC (Abb. 3-27/B). Ebenso zeigte die Protein A Deletionsmutante von *S. aureus* Newman (DU5873) eine geringe Bindung von TSP-1. Die wieder komplementierte Mutante (DUNew/253) band dagegen so viel TSP-1 wie der Wildtyp (Abb. 3-27/C). Auch die knock out Mutante DU5875 zeigte eine höchst signifikante Verringerung der Bindung von TSP-1 im Vergleich zum isogenen Wildtyp *S. aureus* 8325-4. Die Bindung von TSP-1 an die komplementierte Mutante (DU83/253) war dagegen im Vergleich zum Wildtyp leicht erhöht (Abb.3-27/D).

#### 3.4.2.2 Bindung von TSP-1 an Clumping factor A, B und A/B defiziente Mutanten

Bei der Bindung von TSP-1 an die beiden untersuchten ClfA Deletionsmutanten der *S. aureus* Wildtypstämme Newman und 8325-4 gab es deutliche Unterschiede. DU5852 band weniger TSP-1-Moleküle als der Elternstamm Newman, aber der Unterschied war nicht signifikant (Abb. 3-28/A). DU5926 dagegen band bei einer Konzentration von 100 µg/ml TSP-1 nur ¼ der TSP-1 Moleküle im Vergleich zum Wildtypstamm 8325-4 (Abb. 3-28/B). Zu *S. aureus* Newman wurde außerdem noch die ClfB und ClfA/B Deletionsmutante untersucht. Beide Deletionsmutanten zeigten eine signifikant geringere Bindung von TSP-1 als der Elternstamm. Zwischen der ClfB und der ClfA/B Deletionsmutante gab es keine Unterschiede (Abb. 3-28/C).



C



**Abb. 3-28: Bindung von TSP-1 an Clf defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

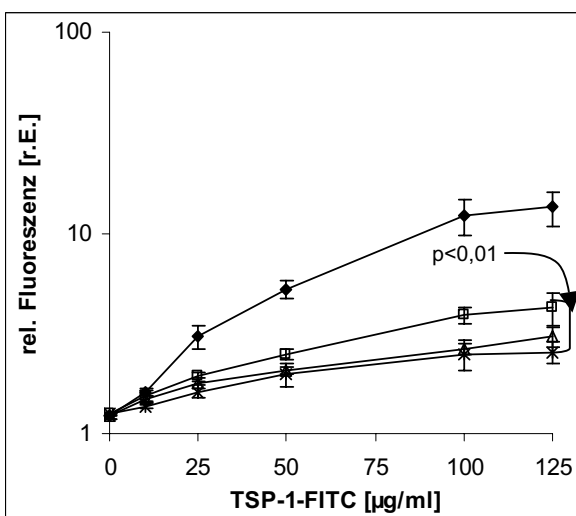
Abb. 3-28 (A):  
Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: DU5852 (*clfA*<sup>-</sup>)

Abb. 3-28 (B):  
Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
offenes Quadrat: DU5926 (*clfA*<sup>-</sup>)

Abb. 3-28 (C):  
Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: *S. aureus* DU5943 (*clfB*<sup>-</sup>)  
offenes Quadrat: *S. aureus* DU5944 (*clfA*<sup>-</sup>/*clfB*<sup>-</sup>)

### 3.4.2.3 Bindung von TSP-1 an FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme

Für die Untersuchung der Bedeutung der Fibronectinbindeproteine A und B für die Bindung von TSP-1 wurden wie bei der Untersuchung der Bindung von Fibrinogen (Kap 3.4.1.2) die *S. carnosus* TM300 Stämme (pFNBA4) und (pFNBB4) verwendet (Abb. 3-29) Im Gegensatz zur Fibrinogenbindung, band der Stamm *S. carnosus* (pFNBB4) nicht signifikant mehr TSP-1 als der Wildtypstamm *S. carnosus* TM300. Beim *fnba* exprimierenden *S. carnosus* Stamm dagegen konnte auch bei der TSP-1 Bindung eine signifikante Steigerung im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden ( $p=0,006$  bei 125 µg/ml TSP-1).

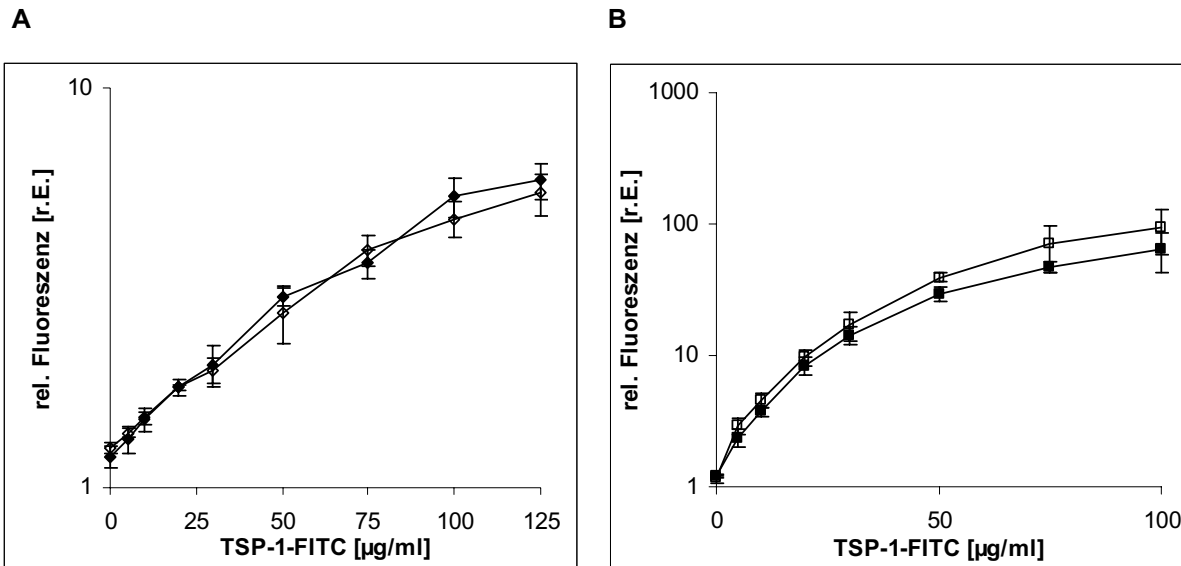


**Abb. 3-29: Bindung von TSP-1 an *S. carnosus* Stämme, welche FnBPA bzw. FnBPB produzieren.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Kreuz: *S. carnosus* TM300  
offenes Quadrat: *S. carnosus* TM300 (pFNBA4)  
offenes Dreieck: *S. carnosus* TM300 (pFNBB4)  
Raute: *S. aureus* Cowan 1

### 3.4.2.4 Bindung von TSP-1 an Koagulase und Eap defiziente Mutanten von *S. aureus*

Bei der Bindung von TSP-1 an die Koagulase-Deletionsmutanten von *S. aureus* Newman und 8325-4 konnten keine signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen Elternstämmen festgestellt werden (Abb. 3-30).

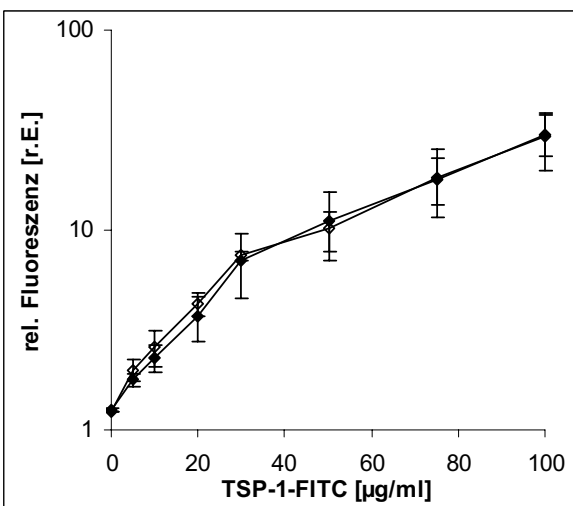


**Abb. 3-30: Bindung von TSP-1 an Koagulase defizienten *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Abb. 3-30 (A): Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: *S. aureus* DU5855 (*coa*<sup>-</sup>)

Abb. 3-30 (B): Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
offenes Quadrat: *S. aureus* DU5809 (*coa*<sup>-</sup>)

Auch die Eap Deletionsmutante von *S. aureus* Newman hatte die gleiche Bindefähigkeit für TSP-1 wie der Elternstamm (Abb. 3-31).



**Abb. 3-31: Bindung von TSP-1 an einen Eap defizienten *S. aureus* Stamm.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen TSP-1-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

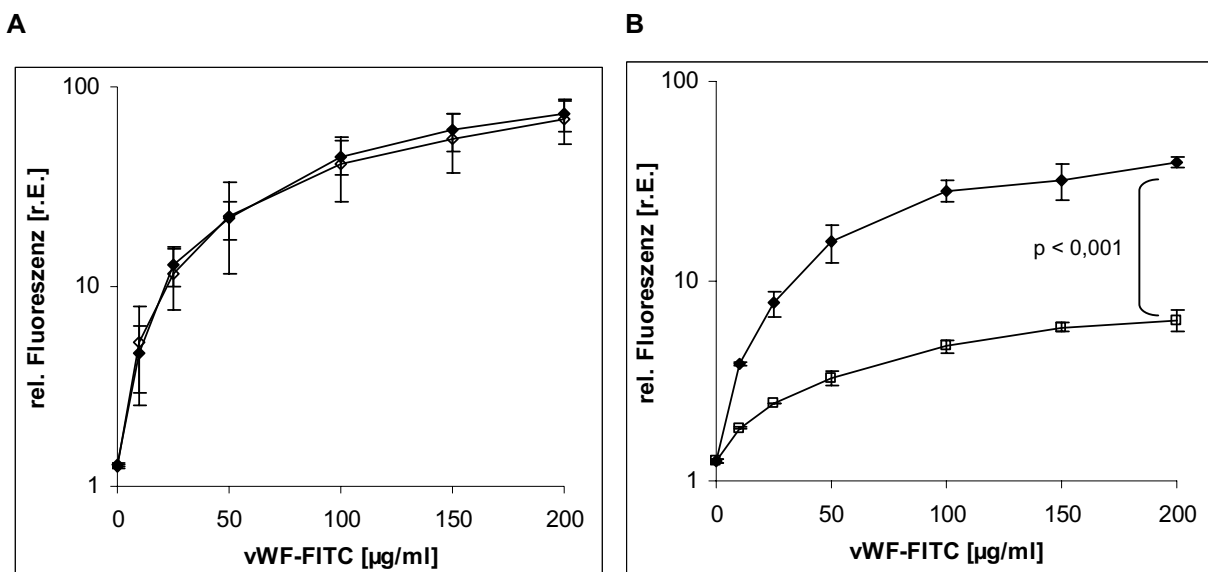
Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: *S. aureus* AH12 (*eap*<sup>-</sup>)

### 3.4.3 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von von Willebrand Faktor (vWF)

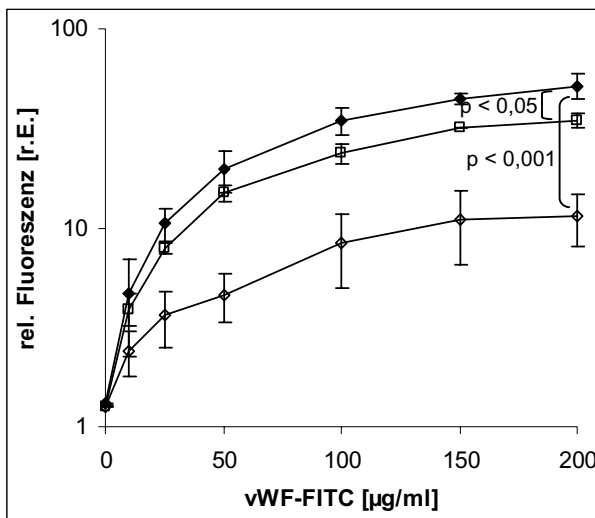
#### 3.4.3.1 Bindung von vWF an Clumping factor A, B und A/B defiziente Mutanten

Wie schon bei der Bindung von TSP-1 und Fibrinogen gesehen, gab es auch bei der Bindung von vWF deutliche Unterschiede zwischen den zwei durchflusszytometrisch untersuchten ClfA defizienten Mutanten. Die Deletionsmutante DU5852 zeigte die gleiche vWF-Bindefähigkeit wie der Elternstamm Newman, die Deletionsmutante DU5926 band dagegen nur 1/6 der vWF-Moleküle im Vergleich zum Elternstamm 8325-4 (Abb. 3-32/A und B).

Bei der Untersuchung der Bindung von vWF an die ClfB negative Mutante und die ClfA/B defiziente Mutante wurde in beiden Fällen eine deutliche Verringerung der Bindefähigkeit von vWF im Vergleich zum Elternstamm *S. aureus* Newman festgestellt. Zwischen den beiden Mutanten gab es signifikante Unterschiede. Während die ClfB negative Mutante etwa  $\frac{1}{4}$  der vWF-Menge band im Vergleich zum Wildstamm, verringerte sich die Bindung von vWF bei der Doppel- Deletionsmutanten nur um den Faktor 1,5 (Abb. 3-32/C) .



C



**Abb. 3-32: Bindung von vWF an Clf defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen vWF-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

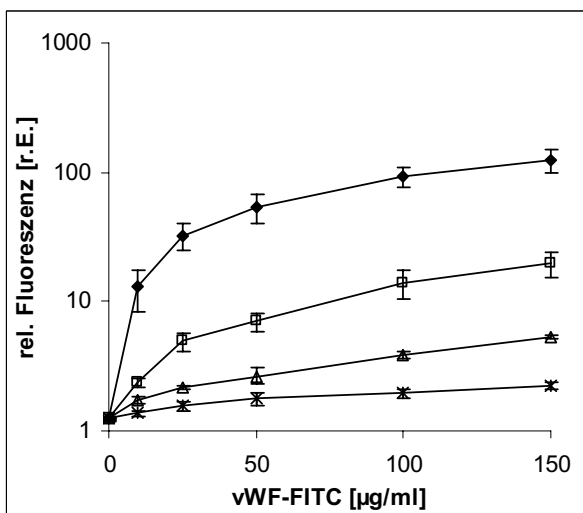
Abb. 3-32 (A):  
Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: DU5852 (*clfA*)

Abb. 3-32 (B):  
Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
offenes Quadrat: DU5926 (*clfA*)

Abb. 3-32 (C):  
Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: *S. aureus* DU5943 (*clfB*)  
offenes Quadrat: *S. aureus* DU5944 (*clfA*/*clfB*)

### 3.4.3.2 Bindung von vWF an FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme

Auch für die Bindung von vWF scheint FnBPA von größerer Bedeutung zu sein als FnBPB. Beide FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme banden mehr vWF als die Negativkontrolle (Abb. 3-33), aber während *S. carnosus* (pFNBB4) nur 2,4x soviel vWF-Moleküle im Vergleich zu *S. carnosus* TM300 band, war die Bindung bei *S. carnosus* (pFNBA4) um das 9-fache gesteigert.

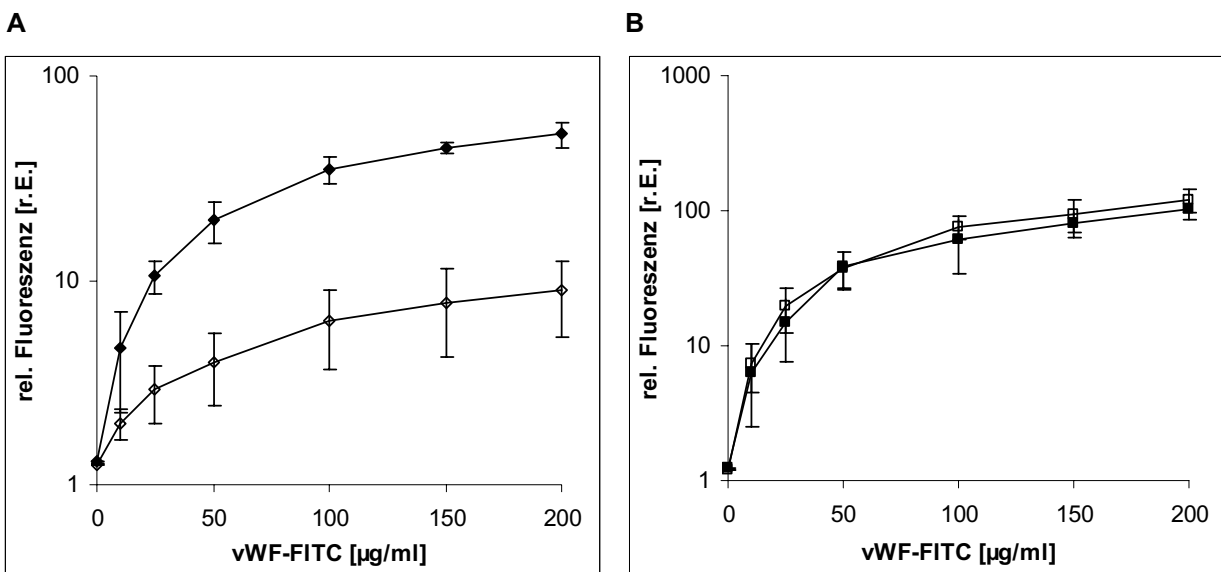


**Abb. 3-33: Bindung von vWF an *S. carnosus* Stämme, welche FnBPA bzw. FnBPB produzieren.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen vWF-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane (n=3) ± SD.

Kreuz: *S. carnosus* TM300  
offenes Quadrat: *S. carnosus* TM300 (pFNBA4)  
offenes Dreieck: *S. carnosus* TM300 (pFNBB4)  
Raute: *S. aureus* Cowan 1

### 3.4.3.3 Bindung von vWF an *S. aureus* Koagulase-Deletionsmutanten

Während bei der Bindung von Fibrinogen und TSP-1 keine Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Koagulase-Deletionsmutanten festgestellt werden konnte, war bei der Untersuchung der vWF-Bindung an diese Mutanten ein deutlicher Unterschied zu sehen. Während die Deletionsmutante DU5809 genauso viele vWF-Moleküle band wie der Elternstamm *S. aureus* 8325-4 (Abb. 3-34/B), band der Stamm *S. aureus* DU5855 nur 1/6 der vWF-Moleküle im Vergleich zum Elternstamm Newman (Abb. 3-34/A).



**Abb. 3-34: Bindung von vWF an Koagulase defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen vWF-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

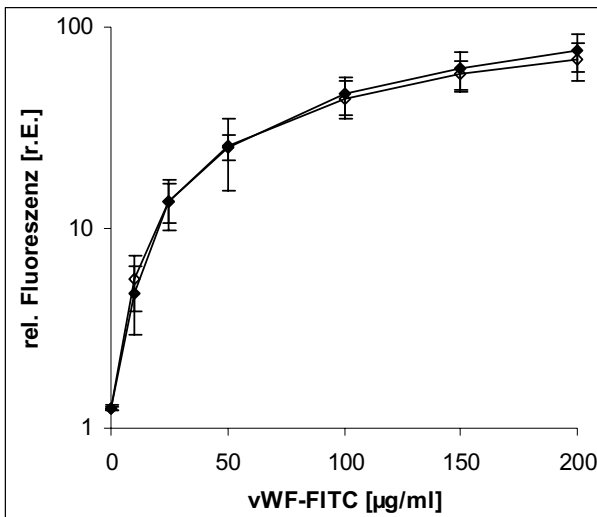
Abb. 3-34 (A): Raute: *S. aureus* Newman  
offene Raute: *S. aureus* DU5855 (*coa*<sup>-</sup>)

Abb. 3-34 (B): Quadrat: *S. aureus* 8325-4  
offenes Quadrat: *S. aureus* DU5809 (*coa*<sup>-</sup>)

### 3.4.3.4 Bindung von vWF an *S. aureus* Eap-Deletionsmutante

Wie auch schon bei der Untersuchung der Bindung von Fibrinogen und TSP-1 konnte auch bei der Bindung von vWF kein Unterschied zwischen der Eap defizienten Mutante und dem Elternstamm festgestellt werden (Abb. 3-35).

### 3. Ergebnisse

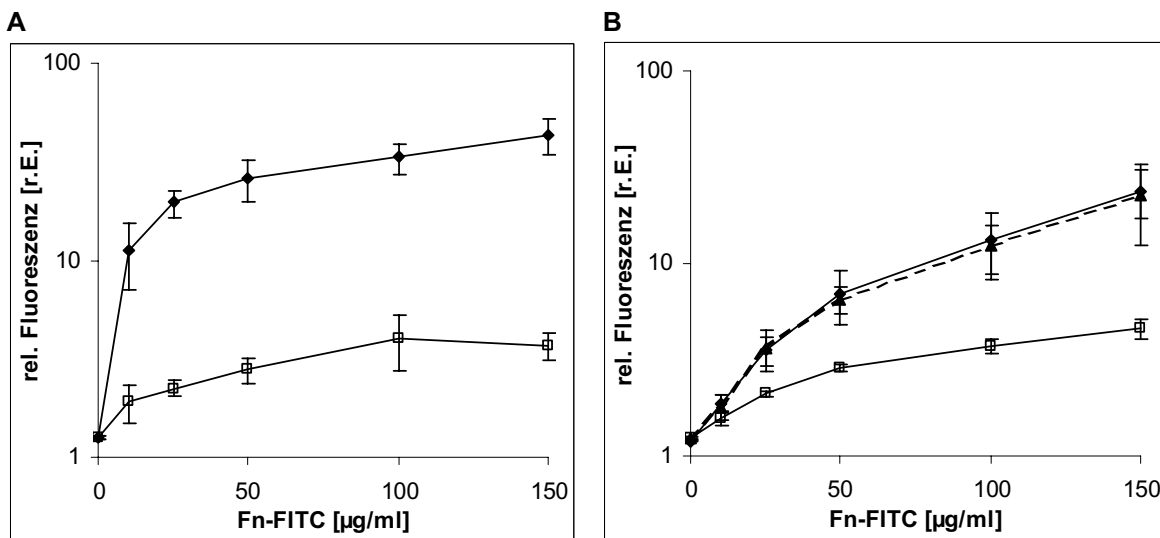


**Abb. 3-35: Bindung von vWF an einen Eap defizienten *S. aureus* Stamm.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen vWF-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Raute: *S. aureus* Newman  
 offenes Raute: *S. aureus* AH12 (*eap*<sup>-</sup>)

#### 3.4.4 Bedeutung verschiedener MSCRAMMs für die Bindung von Fibronektin

##### 3.4.4.1 Bindung von Fibronektin an *S. aureus* Protein A-Deletionsmutanten



**Abb. 3-36: Bindung von Fn an Protein A defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fn-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Abb. 3-36 (A): Raute: *S. aureus* Cowan 1  
 Quadrat: *S. aureus* DU5889

Abb. 3-36 (B): Raute: *S. aureus* Newman  
 Quadrat: *S. aureus* DU5873 (*spa*<sup>-</sup>)  
 Dreieck: *S. aureus* DUNew/253 (DU5873 komplementiert mit *spa*)

Auch die Bindung von Fibronektin an Protein A-Deletionsmutanten war verringert, bei der Deletionsmutante aus Cowan 1 etwa um den Faktor 12 (Abb. 3-36/A), bei der

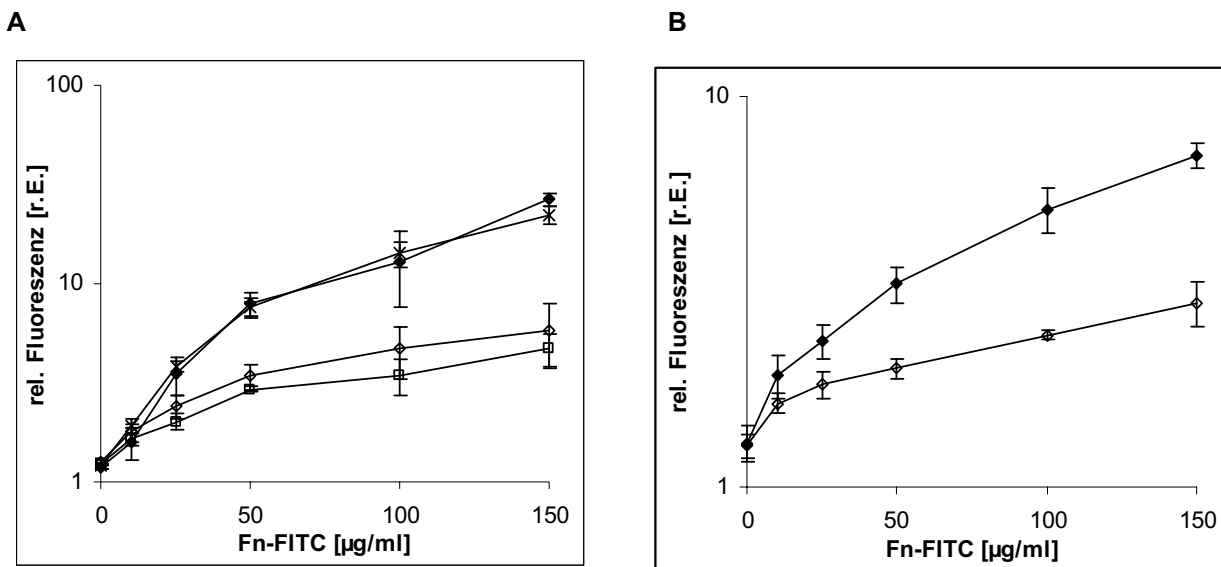


Deletionsmutante aus Newman etwa um den Faktor 5. Die wieder komplementierte Deletionsmutante zu *S. aureus* Newman zeigte wieder die gleiche Fibronektin-Bindefähigkeit wie der Elternstamm (Abb. 3-36/B).

### 3.4.4.2 Bindung von Fibronektin an *S. aureus* Clumping factor A, B und A/B

#### Deletionsmutanten

Während bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Fn-FITC Bindung bei der ClfA-Deletionsmutante aus *S. aureus* Newman kein Unterschied zum Elternstamm feststellbar war, zeigte die ClfB-Deletionsmutante eine um den Faktor 5 reduzierte Bindung von Fibronektin-Molekülen im Vergleich zum Wildtypstamm *S. aureus* Newman. Bei der ClfA/B doppel knock out Mutante war die Bindung noch weiter verringert, aber es gab keinen signifikanten Unterschied zu der ClfB defizienten Mutante (Abb. 3-37/A). Bei der ClfA Deletionsmutante aus *S. aureus* 8325-4 war die Bindung von Fibronektin-FITC im Vergleich zum Wildtypstamm deutlich verringert (Abb. 3-37/B).



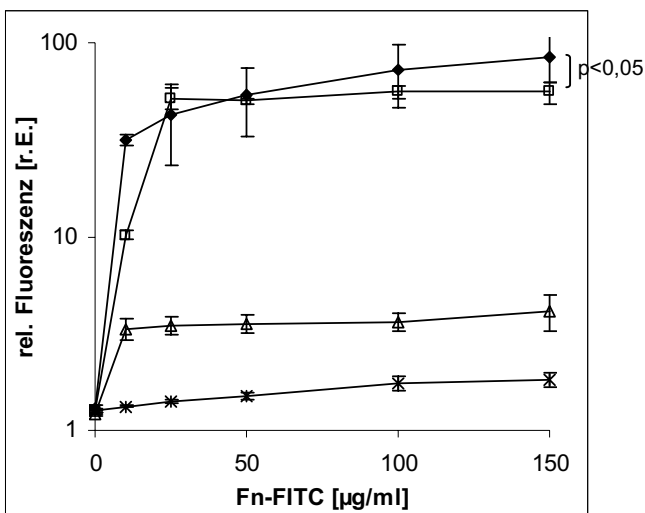
**Abb. 3-37: Bindung von Fn an Clf defiziente *S. aureus* Stämme.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fn-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Abb. 3-37 (A):  
 Raute: *S. aureus* Newman  
 Kreuz: *S. aureus* DU5852 (*clfA*)  
 offene Raute: offene Raute: *S. aureus* DU5943 (*clfB*)  
 offenes Quadrat: *S. aureus* DU5944 (*clfA/clfB*)

Abb. 3-37 (B):  
 Raute: *S. aureus* 8325-4  
 offene Raute: DU5926 (*clfA*)

### 3.4.4.3 Bindung von Fibronectin an FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme

Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung der Bindung von Fibronectin an den *fnbA* exprimierenden *S. carnosus* Stamm wurde festgestellt, dass er in einem bestimmten Fibronectinbereich (25-100 µg/ml Fibronectin) genauso viel Fibronectinmoleküle binden konnte, wie die Positivkontrolle Cowan 1 (Abb. 3-38). Eine vollständige Sättigung der Fibronectinbindung wurde bei *S. carnosus* (pFNBA4) bei einer Konzentration von 25 µg/ml zugefügtem Fibronectin-FITC erreicht. Bei *S. aureus* Cowan 1 war dagegen auch bei 150 µg/ml zugesetztem Fibronectin die Sättigung noch nicht vollständig erreicht, so dass bei dieser hohen Fibronectinkonzentration die Positivkontrolle eine signifikant ( $p=0,018$ ) höhere Fibronectin-Bindefähigkeit aufwies, als der FnBPA exprimierende *S. carnosus* Stamm. Der *fnbB* exprimierende *S. carnosus* Stamm erreichte eine Sättigung der Fibronectin-Bindefähigkeit schon bei 10 µg/ml, die Anzahl der gebundenen Fibronectinmoleküle war aber viel geringer als bei dem FnBPA exprimierenden *S. carnosus* Stamm und lag nur etwa doppelt so hoch wie bei der Negativkontrolle *S. carnosus* TM300.



**Abb. 3-38: Bindung von Fn an *S. carnosus* Stämme, welche *fnbA* bzw. *fnbB* exprimieren.** Die Bakterien wurden mit steigenden Mengen Fn-FITC inkubiert und die Bindung durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen dem Mittelwert der Mediane ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

Kreuz: *S. carnosus* TM300  
 offenes Quadrat: *S. carnosus* TM300 (pFNBA4)  
 offenes Dreieck: *S. carnosus* TM300 (pFNBB4)  
 Raute: *S. aureus* Cowan 1

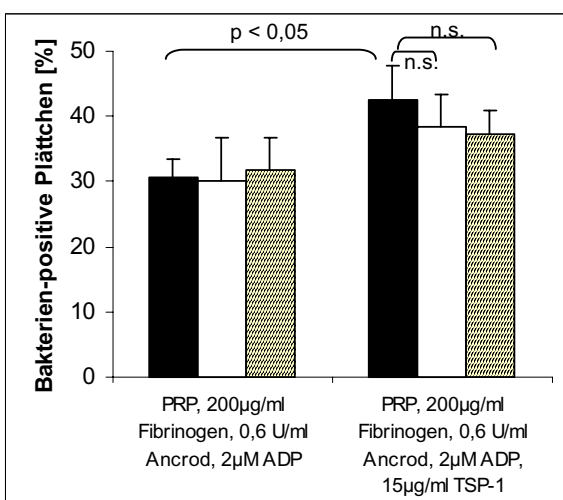
### 3.5 Bindung von genetisch veränderten *S. aureus* bzw. *S. carnosus* an Thrombozyten

Nachdem die Bedeutung von einigen Plasmaproteinen für die Bindung von *S. aureus* an aktivierte Thrombozyten (s. Kap. 3.2.2) und die Proteinbindefähigkeiten von einigen Adhäsinen untersucht worden war (s. Kap. 3.4), wurde in nachfolgenden Versuchen die

Assoziation von Thrombozyten mit einigen genetisch veränderten *S. aureus* bzw. *S. carnosus* untersucht. Die Fragestellung war, ob sich z. B. fehlende Adhäsine auf die Bindung von *S. aureus* an Plättchen auswirken. Die Plättchen (mit anti-CD42a-PE markiert) wurden dazu mit Thrombin (bis 1 U/ml) oder ADP (2  $\mu$ M) aktiviert und dann mit dem jeweiligen Bakterienstamm (mit Syto 13 markiert) für 15 min koinkubiert. Der Prozentsatz der Bakterien-positiven Plättchen an der gemessenen Gesamtplättchenzahl wurde durchflusszytometrisch bestimmt

### 3.5.1 Rolle von Protein A bei der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation

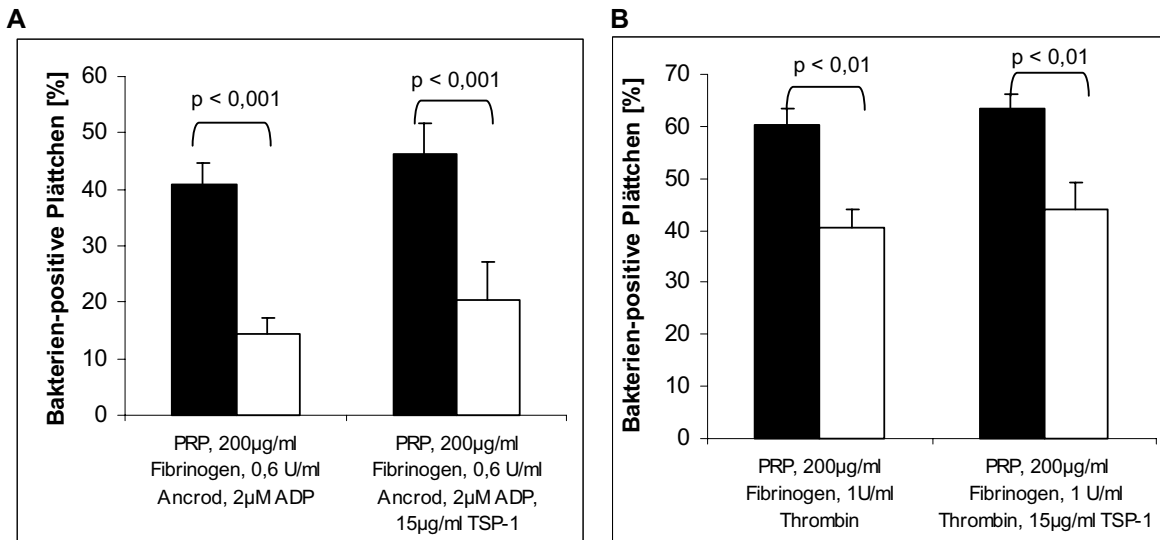
Mit 2  $\mu$ M ADP angeregte Plättchen wurden mit *S. aureus* 8325-4, DU5875 (Protein A Deletionsmutante aus 8325-4) bzw. DU83/253 (wieder komplementierte Mutante) inkubiert. Zur Fibrinbildung aus zusätzlichen 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen wurden 0,6 U/ml Ancrod zugesetzt, zeitgleich zur ADP-Aktivierung. Nach 15 min Thrombozyten-Bakterien-Koinkubation wurde der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 3-39). Es konnte kein Unterschied bei den drei *S. aureus* Stämmen festgestellt werden. Auch nach Zusatz von 15  $\mu$ g/ml TSP-1 war der Prozentsatz an Bakterien-positive Plättchen bei Elternstamm und Mutanten nicht signifikant verschieden.



**Abb. 3-39: Der SpA defiziente Stamm DU5875 zeigt keine Unterschiede in der Bindung an Plättchen im Vergleich zu dem isogenen Wildtypstamm *S. aureus* 8325-4** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch 2  $\mu$ M ADP und Fibrinbildung durch 0,6 U/ml Ancrod (Fibrin aus Fibrinogen im PRP + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen). *S. aureus* DU5875 (*spa*<sup>-</sup>) (weiße Säulen) bildete ähnlich viel Assoziat mit Plättchen wie der Elternstamm *S. aureus* 8325-4 (schwarze Säulen). Auch der Stamm DUNew/253 (DU5875 komplementiert mit *spa*, gestreifte Säulen) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Assoziatbildung im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm und dem Stamm DU5875. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

### 3.5.2 Rolle von ClfA bei der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation

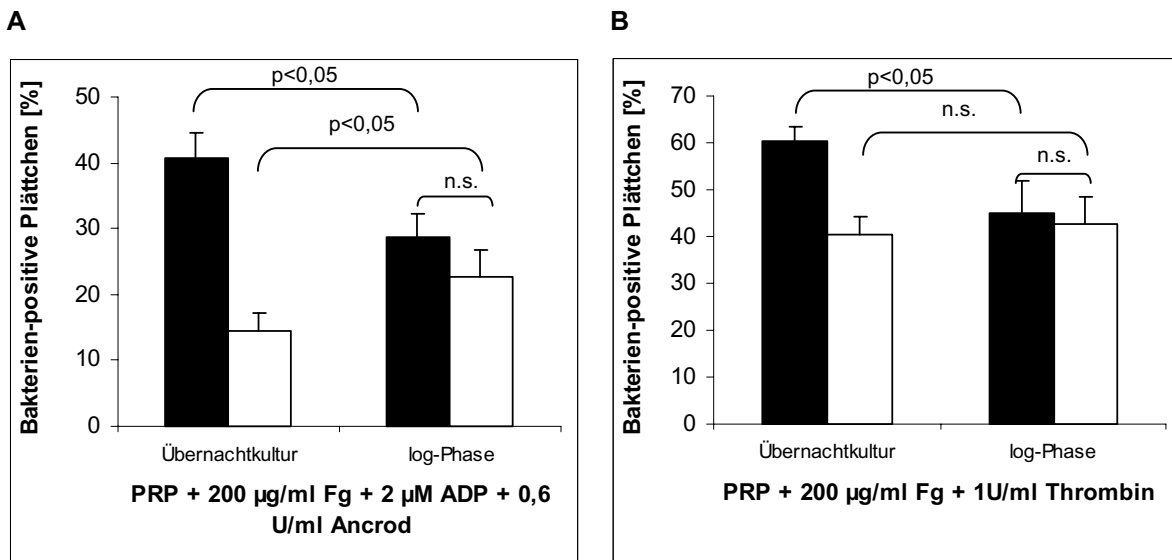
Bei der Prüfung der Rolle des ClfA wurde zunächst die ClfA-Deletionsmutante aus dem Stamm *S. aureus* Newman zusammen mit dem Elternstamm untersucht (Abb. 3-40/A).



**Abb. 3-40: Die Bindung von einem ClfA defiziente *S. aureus* Stamm an Plättchen ist verringert im Vergleich zu der Bindung des isogenen Wildtypstamms *S. aureus* Newman.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach (A) Aktivierung der Plättchen mit 2 µM ADP und Fibrinbildung durch 0,6 U/ml Ancrod (Fibrin aus Fibrinogen in PRP + 200 µg/ml Fibrinogen) bzw. (B) nach Aktivierung der Plättchen durch 1 U/ml Thrombin (PRP + 200 µg/ml Fibrinogen). *S. aureus* DU5852 (*clfA*<sup>-</sup>) (weiße Säulen) band deutlich geringer an Plättchen als *S. aureus* Newman (schwarze Säulen). Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

Nach Aktivierung durch ADP und Fibrinbildung aus zusätzlichen 200 µg/ml Fibrinogen durch 0,6 U/ml Ancrod, war der Prozentsatz der Bakterien-positiven Plättchen bei dem Versuch mit der Mutante signifikant verringert im Vergleich zum Versuch mit dem Elternstamm. TSP-1 Zusatz (15 µg/ml) brachte bei beiden Stämmen einen geringen, nicht signifikanten Anstieg in der Assoziationszahl. Auch nach Thrombinaktivierung (1 U/ml) unter Fibrinogenzusatz (200 µg/ml) war die Assoziationszahl bei der ClfA-Deletionsmutante signifikant geringer als bei dem Elternstamm (Abb. 3-40/B).

Um zu prüfen, ob die Wachstumsphase der Bakterien einen Einfluss auf dieses Ergebnis hat, wurde der Versuche mit Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase wiederholt (Abb. 3-41).

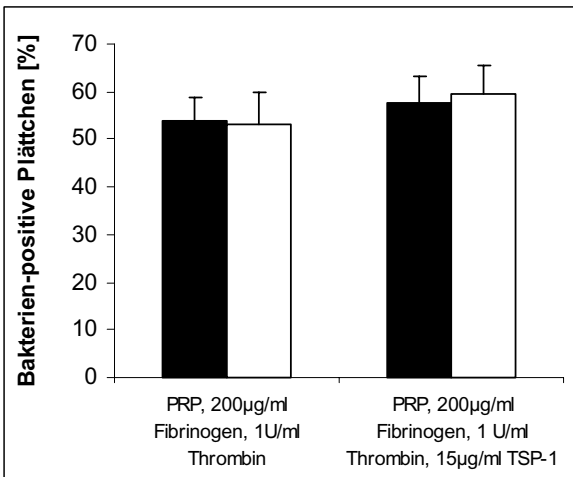


**Abb. 3-41: Der Unterschied in der Bindung von einem ClfA defizienten *S. aureus* Stamm im Vergleich zu der Bindung des isogenen Wildtypstamms *S. aureus* Newman an Thrombozyten verändert sich je nach Wachstumsphase der Bakterien.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach (A) Aktivierung der Plättchen mit 2 µM ADP und Fibrinbildung durch 0,6 U/ml Ancrod (Fibrin aus Fibrinogen in PRP + 200 µg/ml Fibrinogen) bzw. (B) nach Aktivierung der Plättchen durch 1 U/ml Thrombin (PRP + 200 µg/ml Fibrinogen). *S. aureus* DU5852 (*clfA*<sup>-</sup>) (weiße Säulen) band in der logarithmischen Phase des Wachstums gleich stark oder vermehrt an Thrombozyten an, während *S. aureus* Newman (schwarze Säulen) in der logarithmischen Wachstumsphase eine verringerte Bindung an Plättchen zeigte. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

Es stellte sich heraus, dass die Assoziatzahl bei *S. aureus* Newman signifikant verringert war im Vergleich zu der Assoziatzahl mit *S. aureus* Newman aus der Übernachtskultur. Die Assoziatzahl bei der ClfA-Mutante war dagegen etwa gleich hoch nach der Thrombinanregung (Abb. 3-41/B), bzw. signifikant höher nach der ADP/Ancrod-Behandlung (Abb. 3-41/A) im Vergleich zu der Assoziatzahl mit der ClfA-Mutante aus der Übernachtskultur. Dadurch war der Unterschied zwischen Mutante und Elternstamm nur noch gering und nicht mehr signifikant verschieden im Vergleich zu den Versuchen mit Bakterien aus der Übernachtskultur.

Es wurde noch eine weitere ClfA-Deletionsmutante untersucht. Die Mutante aus dem Elternstamm *S. aureus* 8325-4 (Übernachtskultur der Bakterien, Thrombinanregung der Thrombozyten, Fibrinogenzusatz (200 µg/ml)) zeigte im Gegensatz zu der aus *S. aureus* Newman keine Unterschiede in der Assoziatzahl im Vergleich zum Elternstamm (Abb. 3-42).

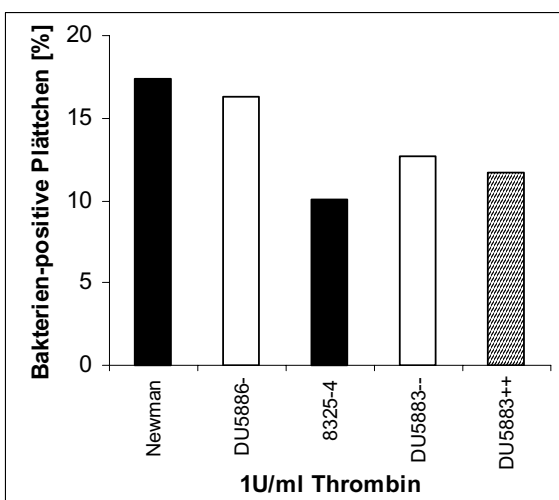
### 3. Ergebnisse



**Abb. 3-42: Der ClfA defiziente Stamm DU5926 zeigt keine Unterschiede in der Bindung an Plättchen im Vergleich zu dem isogenen Wildtypstamm *S. aureus* 8325-4** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch 1 U/ml Thrombin (PRP + 200 µg/ml Fibrinogen). *S. aureus* DU5926 (*clfA*<sup>-</sup>) (weiße Säulen) bildete ähnlich viel Assoziate mit Plättchen wie der Elternstamm *S. aureus* 8325-4 (schwarze Säulen). Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

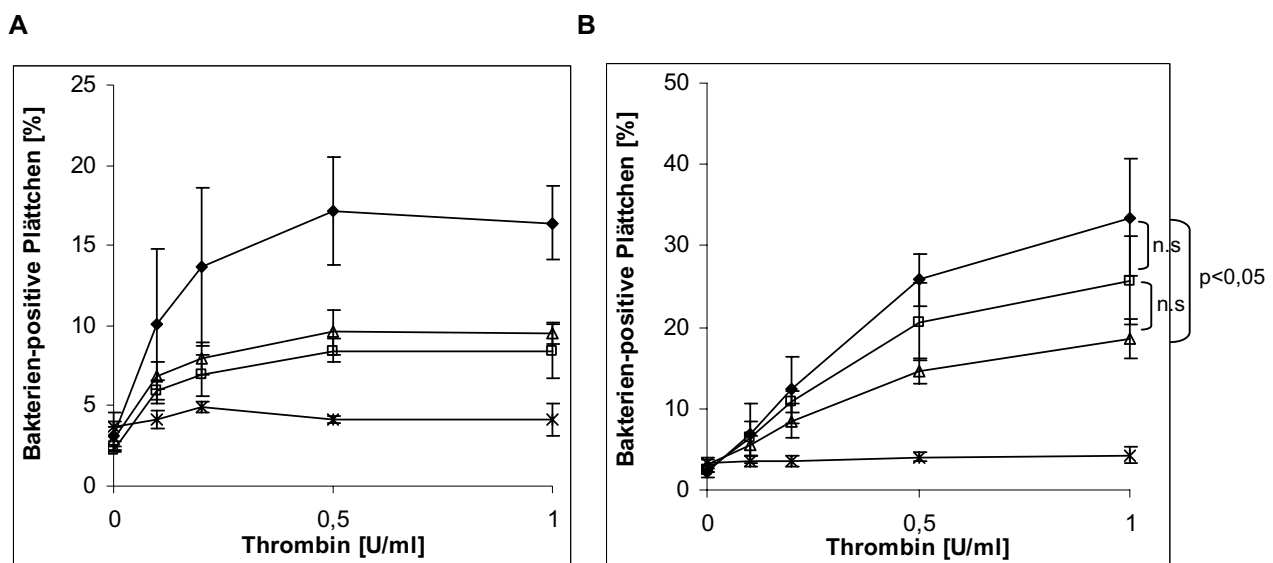
#### 3.5.3 Rolle von FnBPA und FnBPB bei der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation

Auch für die Untersuchung der Rolle von FnBPA und FnBPB bei der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation wurden zunächst *S. aureus* Deletionsmutanten verwendet. Beispielhaft ist in Abb. 3-43 das Ergebnis eines Versuchstages gezeigt. Weder die FnBPA-Deletionsmutante aus *S. aureus* Newman, noch die FnBPA/FnBPB-Doppeldeletionsmutante aus *S. aureus* 8325-4 zeigten eine deutliche Verringerung der Assoziation mit Thrombozyten.



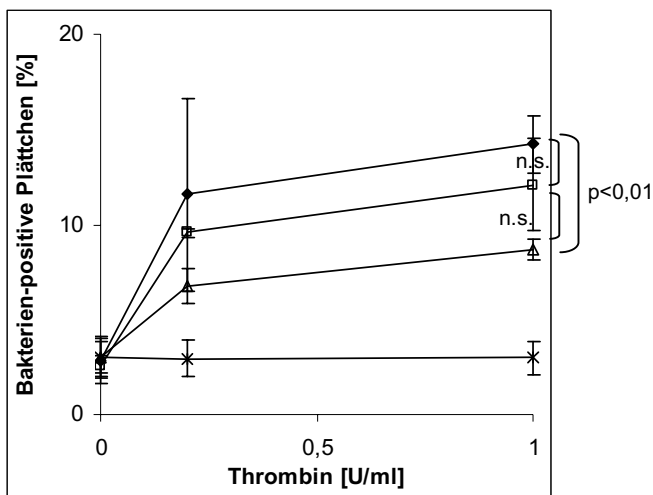
**Abb. 3-43: FnBP-Deletionsmutanten aus *S. aureus* Newman und *S. aureus* 8325-4 zeigen keine klaren Unterschiede in der Bindung an Thrombozyten im Vergleich zu den isogenen Wildtypstämmen.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch 1 U/ml Thrombin. Beispielhaft werden die Ergebnisse eines Versuchstages gezeigt. *S. aureus* DU5886 (*fnbA*<sup>-</sup>) aus Newman; *S. aureus* DU5883-- (*fnbA*<sup>-</sup>/*fnbB*<sup>-</sup>) aus *S. aureus* 8325-4; DU5883++ (DU5883 komplementiert mit *fnbA* und *fnbB*).

Zur weiteren Untersuchung der Bedeutung der FnBPs für die Interaktion mit Plättchen wurden deshalb *S. carnosus* Stämme verwendet, in welchen die Gene, die FnBPA und FnBPB codieren, heterolog exprimiert werden. Die Wildtypstämme *S. carnosus* TM300 und *S. aureus* Cowan 1 dienten als Negativ- bzw. Positivkontrolle (Abb. 3-44/A). Es zeigte sich, dass die FnBP produzierenden *S. carnosus* Stämme mehr Assoziante mit Thrombozyten bildeten als der *S. carnosus* Wildtypstamm. Die Assoziatbildung war, wie bei *S. aureus* Cowan 1, von der Thrombinkonzentration abhängig, wobei ab 0,5 U/ml Thrombin keine Steigerung der Assoziatzahl festgestellt werden konnte. Bei 1 U/ml Thrombin lagen bei den FnBP exprimierenden *S. carnosus*-Stämmen etwa halb so viele Assoziante vor wie bei *S. aureus* Cowan 1. Zwischen *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. carnosus* (pFNBB4) gab es keine signifikanten Unterschiede. Nach Zusatz von 200 µg/ml Fibrinogen zum PRP konnte eine Steigerung der Assoziatzahl bei *S. aureus* Cowan 1 und den beiden FnBP produzierenden Stämmen im Vergleich zu „ohne Fibrinogenzusatz“ festgestellt werden (Abb. 3-44/B). Zwischen der Assoziatbildung bei *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. carnosus* (pFNBB4) bestand wieder kein signifikanter Unterschied, aber auch nicht zwischen *S. aureus* Cowan 1 und *S. carnosus* (pFNBA). Wenn statt Fibrinogen Fibronektin (50 µg/ml) zugesetzt wurde, wurde nur die Assoziatbildung bei *S. carnosus* (pFNBA4) gesteigert, nicht dagegen bei *S. aureus* Cowan 1 und *S. carnosus* (pFNBB4) (Abb. 3-44/C).



### 3. Ergebnisse

C



**Abb. 3-44: FnBP exprimierende *S. carnosus* Stämme können an Thrombozyten anbinden.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch Thrombin. Eine Fibrinpolymerisierung wurde durch Zusatz von 1,25 mM GPRP verhindert. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

Abb. 3-43 (A): PRP

Abb. 3-43 (B): PRP + 200  $\mu$ g/ml Fg

Abb. 3-43 (C): PRP + 50  $\mu$ g/ml Fn

Kreuz: *S. carnosus* TM300

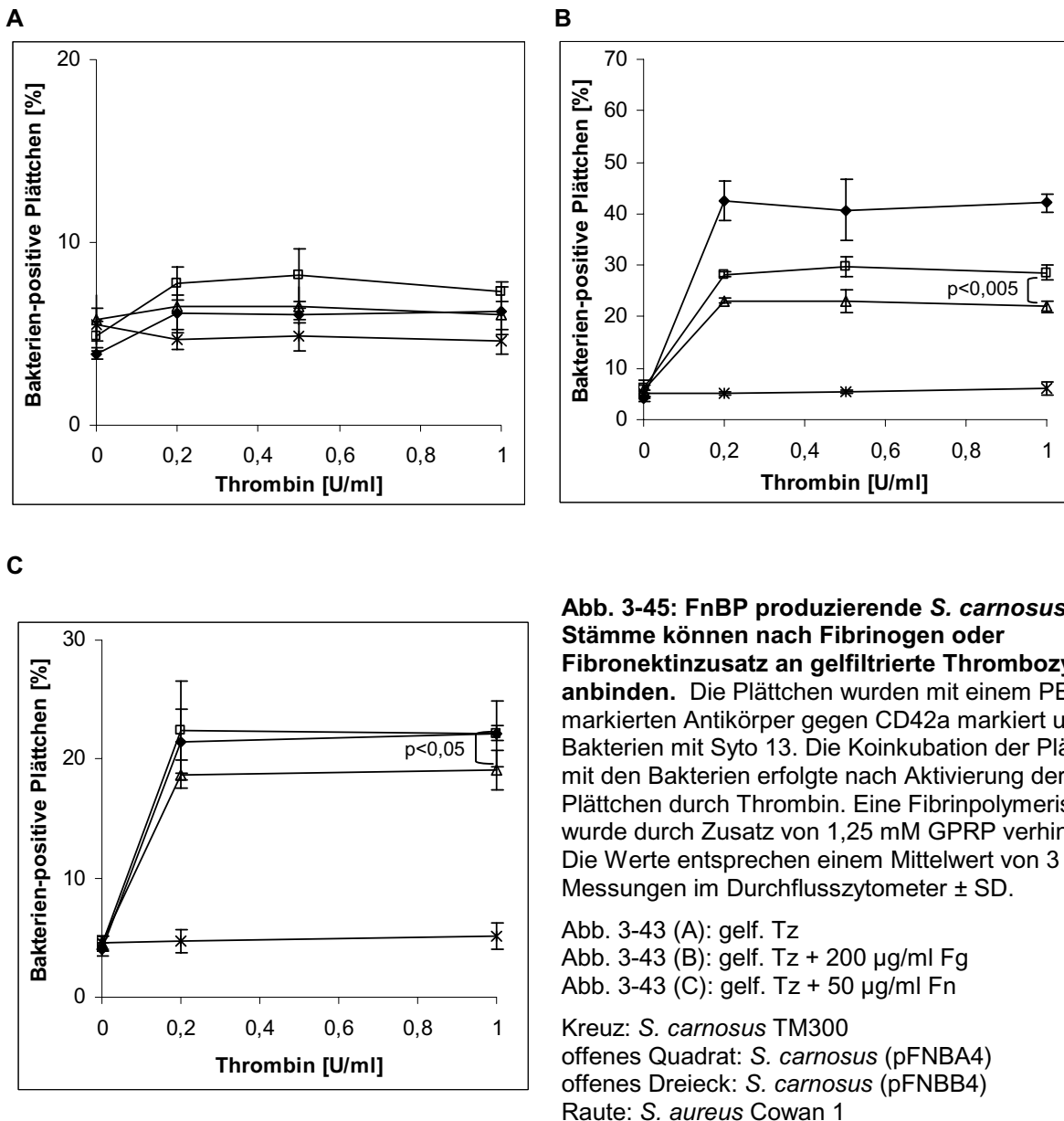
offenes Quadrat: *S. carnosus* (pFNBA4)

offenes Dreieck: *S. carnosus* (pFNBB4)

Raute: *S. aureus* Cowan 1

Um die Rolle von Fibrinogen und Fibronectin als Brückenmoleküle bei der Assoziation von Bakterien und Thrombozyten über die Fibronectinbindeproteine genauer untersuchen zu können, wurden nachfolgende Versuche mit gefilterten Plättchen gemacht (Abb. 3-45). Wurden die Bakterien nur mit gefilterten, thrombinaktivierten Plättchen inkubiert, bildeten nur wenige Thrombozyten mit den untersuchten Staphylokokkenstämmen Assoziate (Abb. 3-45/A). Nach Zusatz von 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen und Thrombinaktivierung stieg der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen auf 42 % bei *S. aureus* Cowan 1, bei *S. carnosus* (pFNBA4) auf 28 % und bei *S. carnosus* (pFNBB4) auf 23 % (Abb. 3-45/B). Zwischen den beiden FnBP produzierenden *S. carnosus* Stämmen gab es einen signifikanten Unterschied ( $p=0,003$ ). Der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen war abhängig von der Thrombinkonzentration. Die Negativkontrolle bildete kaum Assoziate mit den Plättchen. Auch nach Fibronectinzusatz (50  $\mu$ g/ml) – anstelle von Fibrinogen – bildeten die Thrombozyten vermehrt Assoziate mit *S. aureus* Cowan 1 und den FnBP exprimierenden *S. carnosus* Stämmen nach Thrombinaktivierung (Abb. 3-45/C). Zwischen *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. aureus* Cowan 1 war kein Unterschied in der Assoziatbildung mit Plättchen unter Fibronectinzusatz feststellbar. Die Assoziatbildung mit *S. carnosus* (pFNBB4) lag leicht niedriger, hier gab es einen signifikanten Unterschied zu *S. aureus* Cowan 1 ( $p=0,04$ ), aber der Unterschied zu *S. carnosus* (pFNBA4) war nicht signifikant.

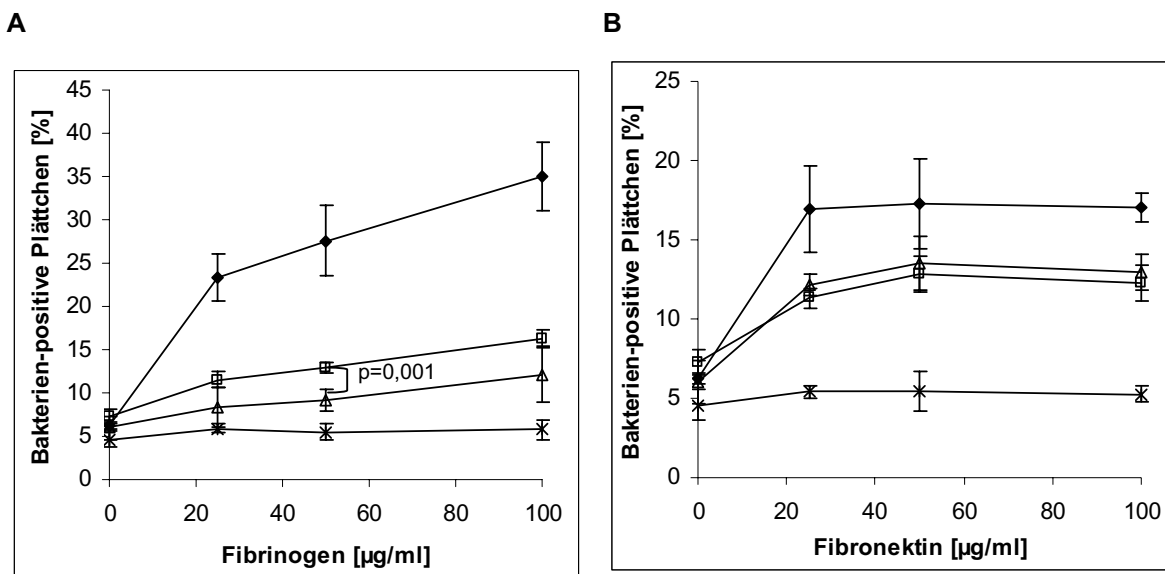




In Abb. 3-46 sieht man die Abhängigkeit der Anzahl der Bakterien-positiven Plättchen von der Fibrinogenkonzentration (Abb. 3-46/A) und der Fibronektinkonzentration (Abb. 3-46/B). Bei beiden Versuchen wurden gefilterte, mit 1 U/ml Thrombin aktivierte Thrombozyten verwendet. Bei Zusatz von Fibrinogen konnte bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen die Anzahl an Bakterien-Plättchen-Assoziaten noch gesteigert werden, der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen war bei den FnBP produzierenden *S. carnosus* Stämmen weniger als halb so hoch als bei *S. aureus* Cowan 1. *S. carnosus* (pFNBA4) bildete mehr Assoziante bei gleicher Fibrinogenkonzentration als *S. carnosus* (pFNBB4). Bei Fibronektinzusatz gab es

### 3. Ergebnisse

jeweils eine Konzentration bei der die Anzahl an Bakterien-positiven Plättchen nicht mehr gesteigert werden konnte. Diese lag bei *S. aureus* Cowan 1 bei 25 µg/ml Fibronektin, bei den FnBP exprimierenden *S. carnosus* Stämmen bei 50 µg/ml. Der Anteil an Bakterien-positiven Plättchen war bei *S. aureus* Cowan 1 höher als bei den beiden FnBP produzierenden *S. carnosus* Stämmen, aber nur um den Faktor 1,4. Zwischen *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. carnosus* (pFNBB4) gab es keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 3-46: FnBP produzierende *S. carnosus* Stämme binden in Abhängigkeit von der Konzentration von (A) Fibrinogen oder (B) Fibronectin an gefilterte, aktivierte Thrombozyten.**

Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch 1 U/ml Thrombin. Eine Fibrinpolymerisierung wurde durch Zusatz von 1,25 mM GPRP verhindert. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

Kreuz: *S. carnosus* TM300

offenes Quadrat: *S. carnosus* (pFNBA4)

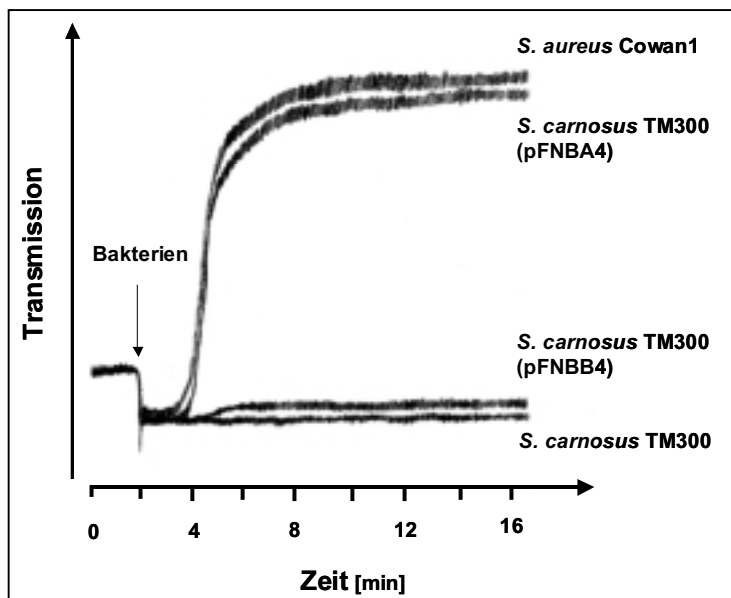
offenes Dreieck: *S. carnosus* (pFNBB4)

Raute: *S. aureus* Cowan 1

#### 3.6 Auslösung der Plättchenaggregation durch einen *S. carnosus* Stamm, in dem das Gen, dass FnBPA codiert, heterolog exprimiert wurde

Wie schon unter Kap. 3.3 gezeigt wurde, ist *S. aureus* in der Lage, eine Plättchenaggregation auszulösen. Um den Einfluss der FnBPs dabei zu untersuchen, wurden Plättchen aus PRP (auf 200.000 Tz/µl mit PPP eingestellt) in einer silanisierten Glasküvette mit *S. aureus* Cowan 1, *S. carnosus* TM300, *S. carnosus* (pFNBA4) bzw. *S. carnosus* (pFNBB4), inkubiert und der Verlauf der Aggregation der Plättchen mit

einem Aggregometer verfolgt. In Abb. 3-47 ist exemplarisch ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt. Zuvor war die Fähigkeit der Plättchen zur Aggregation in einem anderen Versuchsansatz durch das Hinzufügen von 0,2 U/ml Thrombin zu dem eingestellten PRP getestet worden. *S. aureus* Cowan 1 und *S. carnosus* (pFNBA4) waren in der Lage die Plättchenaggregation mit einer „lag-time“ von 3+/-1 min in monophasischer Weise auszulösen. *S. carnosus* TM300 und *S. carnosus* (pFNBB4) dagegen lösten die Aggregation nicht aus.



**Abb. 3-47:** *S. aureus* Cowan 1 und *S. carnosus* TM300 (pFNBA4) lösen die Plättchenaggregation aus, *S. carnosus* TM300 und *S. carnosus* TM300 (pFNBB4) dagegen nicht. Plättchen in PRP (auf 200.000 Tz/μl mit PPP eingestellt) wurden in einer silanisierten Glasküvette mit *S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. carnosus* inkubiert und der Verlauf der Aggregation der Plättchen mit einem Aggregometer verfolgt. Exemplarisch wurde ein Ergebnis von 3 durchgeführten Experimentreihen dargestellt.

### 3.7 Assoziation von Plättchen mit *Streptococcus pneumoniae*

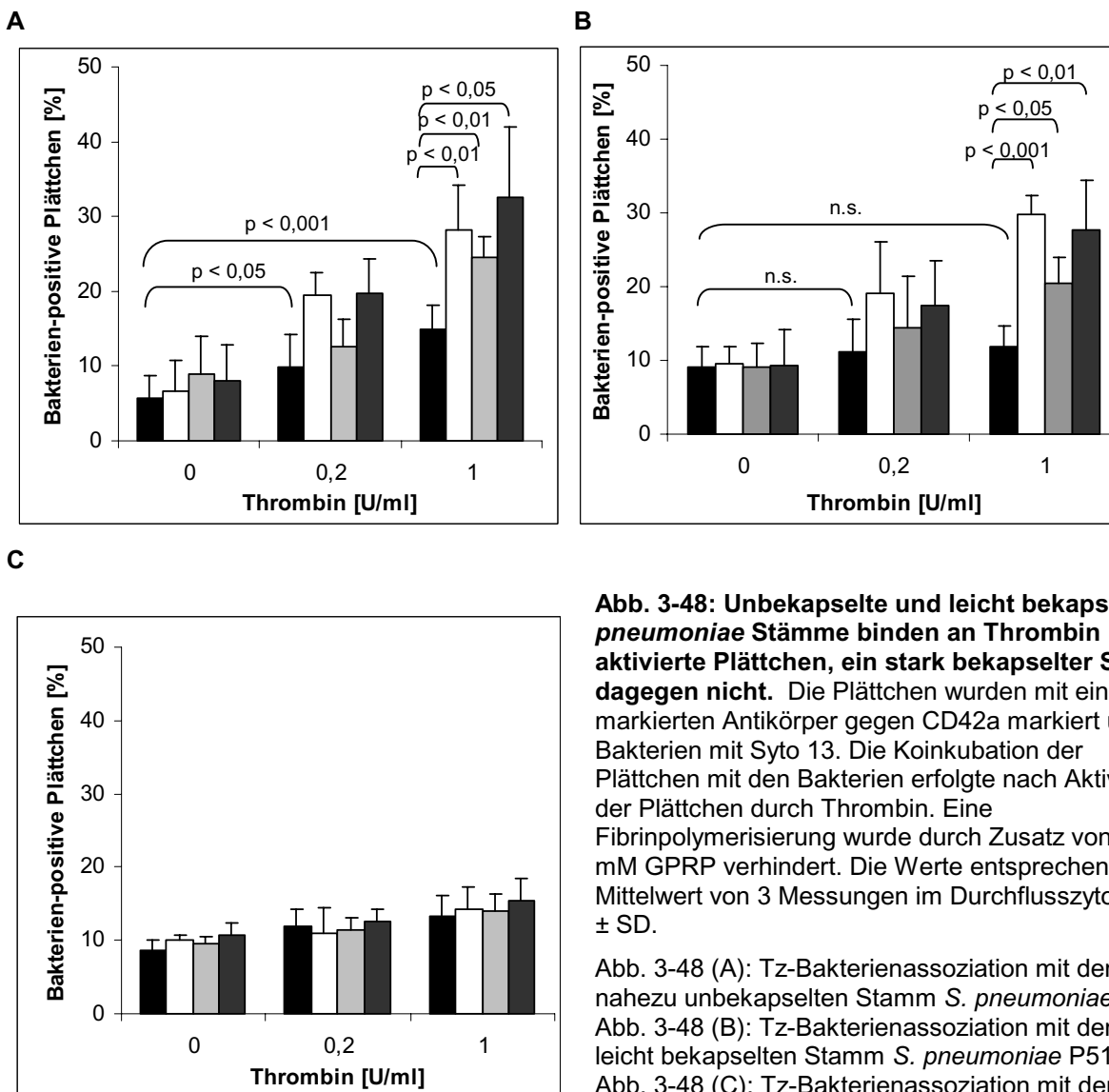
In nachfolgenden Untersuchungen wurde überprüft, ob auch Bakterien der Art *Streptococcus pneumoniae* an Plättchen anbinden und ob auch für deren Bindung Fibrinogen, Fibrin oder TSP-1 und der Aktivierungszustand der Plättchen von Bedeutung ist.

Der nahezu unbekapselte *Streptococcus pneumoniae* Stamm P37 (Abb. 3-48/A) zeigte einen Thrombinkonzentrationsabhängigen Anstieg der Assoziation mit Thrombozyten. Durch Zusatz von exogenem Fibrinogen oder TSP-1 (200 μg/ml bzw. 15 μg/ml) banden signifikant mehr Bakterien an die Plättchen als ohne den Proteinzusatz, dabei war der Unterschied in der Bakterien-Plättchen-Assoziation nach Fibrinogen- bzw. nach TSP-1-

### 3. Ergebnisse

Zusatz nicht signifikant. Der leicht bekapselte Stamm P51 (Abb. 3-48/B) zeigte ohne exogenen Proteinzusatz keinen Anstieg in der Assoziateszahl mit Thrombozyten. Nach Fibrinogen und/oder TSP-1-Zusatz stieg die Assoziateszahl im Vergleich zu ohne Proteinzusatz signifikant an. Der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen entsprach etwa dem bei *Streptococcus pneumoniae* P37 nach Proteinzusatz.

Der bekapselte Stamm D39 (Abb. 3-48/C) zeigte eine nur geringe Bindung an Plättchen, die auch nicht durch Aktivierung der Plättchen oder exogenen Proteinzusatz gesteigert werden konnte.

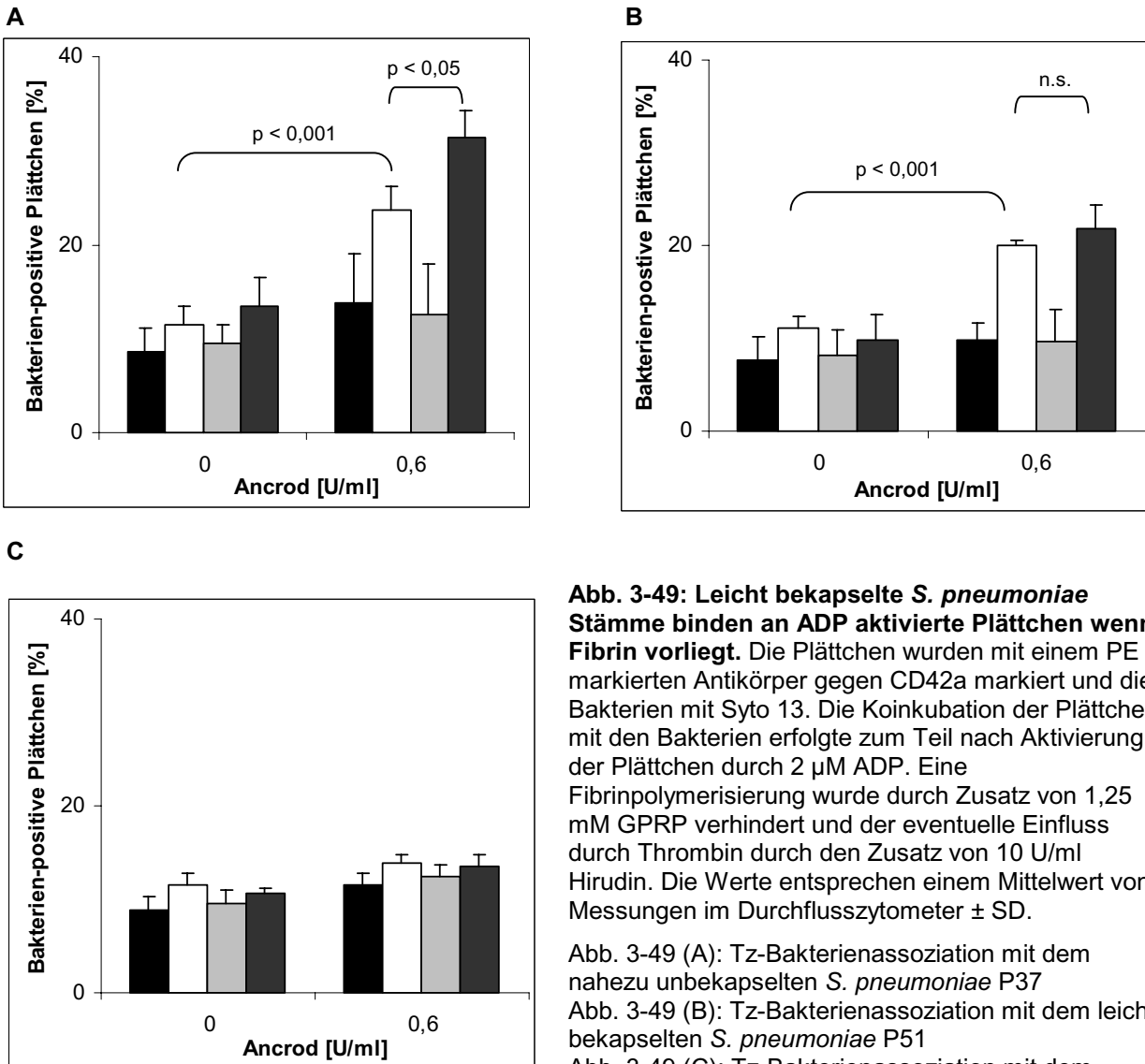


**Abb. 3-48: Unbekapselte und leicht bekapselte *S. pneumoniae* Stämme binden an Thrombin aktivierte Plättchen, ein stark bekapselter Stamm dagegen nicht.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte nach Aktivierung der Plättchen durch Thrombin. Eine Fibrinpolymerisierung wurde durch Zusatz von 1,25 mM GPRP verhindert. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

Abb. 3-48 (A): Tz-Bakterienassoziation mit dem nahezu unbekapselten Stamm *S. pneumoniae* P37  
 Abb. 3-48 (B): Tz-Bakterienassoziation mit dem leicht bekapselten Stamm *S. pneumoniae* P51  
 Abb. 3-48 (C): Tz-Bakterienassoziation mit dem bekapselten Stamm *S. pneumoniae* D39

schwarze Säulen: PRP  
 weiße Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen  
 hellgraue Säulen: PRP + 15 µg/ml TSP-1  
 dunkelgraue Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen + 15 µg/ml TSP-1

Wie in Abb. 3-49 zu sehen, war für eine große Anzahl an *S. pneumoniae*-positiven Plättchen, genauso wie auch bei der Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen, die Fibrinbildung (hier durch Ancrod aus 200 µg/ml Fibrinogen zusätzlich zu dem Fibrinogen im PRP) und aktivierte Plättchen (durch 2 µM ADP) notwendig.



**Abb. 3-49: Leicht bekapselte *S. pneumoniae* Stämme binden an ADP aktivierte Plättchen wenn Fibrin vorliegt.** Die Plättchen wurden mit einem PE markierten Antikörper gegen CD42a markiert und die Bakterien mit Syto 13. Die Koinkubation der Plättchen mit den Bakterien erfolgte zum Teil nach Aktivierung der Plättchen durch 2 µM ADP. Eine Fibrinpolymerisierung wurde durch Zusatz von 1,25 mM GPRP verhindert und der eventuelle Einfluss durch Thrombin durch den Zusatz von 10 U/ml Hirudin. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen im Durchflusszytometer ± SD.

Abb. 3-49 (A): Tz-Bakterienassoziation mit dem nahezu unbekapselten *S. pneumoniae* P37  
 Abb. 3-49 (B): Tz-Bakterienassoziation mit dem leicht bekapselten *S. pneumoniae* P51  
 Abb. 3-49 (C): Tz-Bakterienassoziation mit dem bekapselten *S. pneumoniae* D39

schwarze Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen  
 weiße Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen + 2 µM ADP  
 hellgraue Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen + 15 µg/ml TSP-1  
 dunkelgraue Säulen: PRP + 200 µg/ml Fibrinogen + 15 µg/ml TSP-1 + 2 µM ADP

Ein Zusatz von 15 µg/ml TSP-1 verstärkte die Assoziatbildung mit aktivierten Plättchen bei dem nahezu unbekapselten *S. pneumoniae* Stamm P37 signifikant, erhöhte aber die Assoziatzahl bei dem leicht bekapselten Stamm P51 nicht signifikant (Abb. 3-49/B). Wie auch schon bei der Aktivierung mit Thrombin bildeten sich mit dem bekapselten Stamm

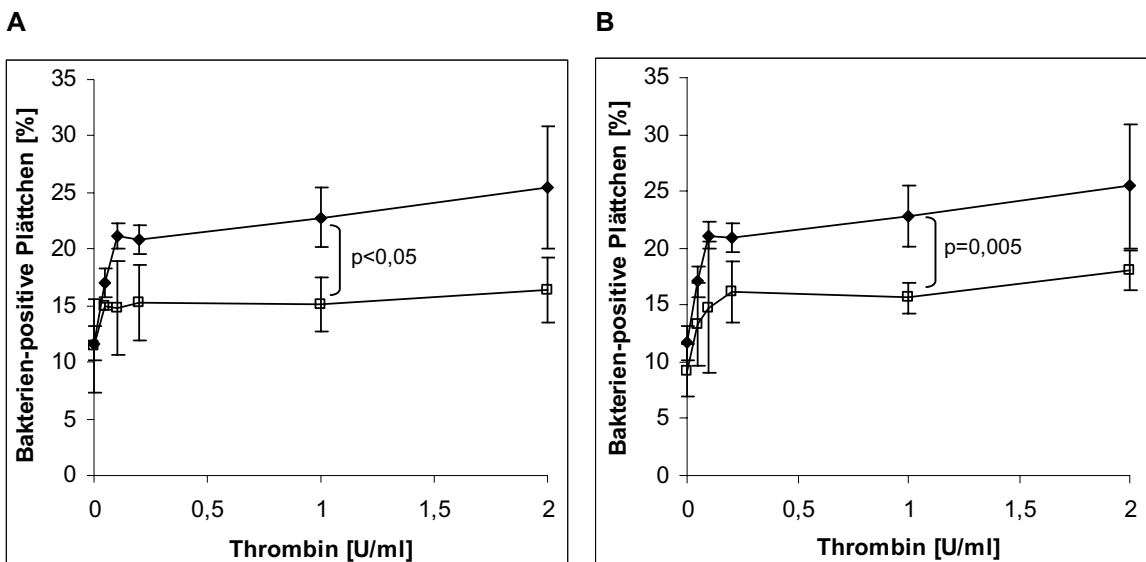
### 3. Ergebnisse

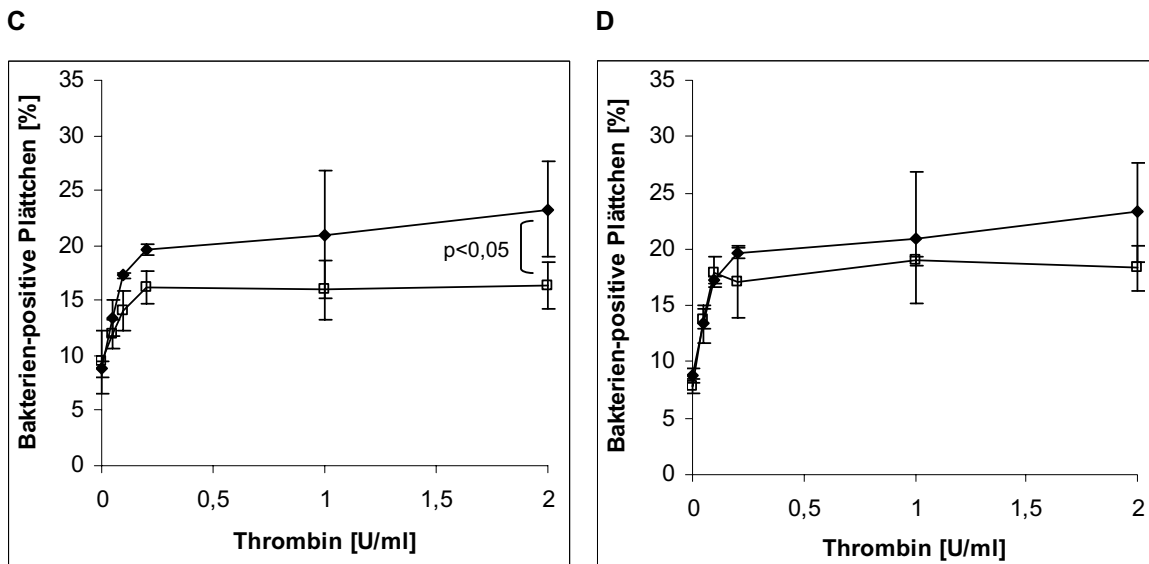
*S. pneumoniae* D39 auch nach Fibrinbildung durch Ancrod und Aktivierung der Thrombozyten mit ADP nur wenig Assoziante (Abb. 3-49/C).

#### 3.8 Die Rolle von Syndecan-1 und Syndecan-4 bei *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation

Syndecane sind omnipräsente Komponenten der Plasmamembran von Zellen. Um zu prüfen, ob Syndecane, die auch eine Bindungsstelle für Proteine an Thrombozyten sind, eine Rolle in der Bakterien-Plättchen-Interaktion spielen, wurden die Plättchen von Syndecan-1 und Syndecan-4 knock out Mäusen untersucht. Sie wurden im PRP mit einem PE gekoppelten Antikörper gegen CD61 markiert und mit Thrombin (bis 2 U/ml) aktiviert. Anschließend wurden die Plättchen für 10 min mit *S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. aureus* Newman (jeweils mit Syto13 markiert) koinkubiert. Danach erfolgte die Messung der Bakterien-positive Plättchen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

Die murinen Plättchen ließen sich durch Thrombin aktivieren und bildeten mit *S. aureus* Assoziaten (Abb. 3-50). Sowohl Wildtyp als auch die Syndecan k.o.Mäuse erreichten die maximale Bindung von Bakterien bei einer Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin. Die Assoziationsrate von *S. aureus* Newman als auch *S. aureus* Cowan 1 war mit den Plättchen der Syndecan-1 k.o. Mäuse signifikant erniedrigt (Abb. 3-50/A, Abb. 3-50/C). Bei den Syndcan-4 k.o. Mäusen war die Assoziation mit *S. aureus* Newman signifikant verringert, bei *S. aureus* Cowan 1 war die Bildung von Bakterien-positiven Plättchen auch erniedrigt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, aber der Unterschied war nicht signifikant (Abb. 3-50/B, Abb. 3-50/D).





**Abb. 3-50: Plättchen von Syndecan-1 und Syndecan-4 knock out Mäusen bilden weniger Assoziaten mit *S. aureus* als die Plättchen von Wildtypmäusen.** Die murinen Plättchen wurden im PRP mit einem PE gekoppelten Antikörper gegen CD61 markiert und anschließend mit Thrombin (bis 2 U/ml) aktiviert. Eine Fibrinpolymerisierung wurde durch Zusatz von 1,25 mM GPRP verhindert. Anschließend wurden die Plättchen für 10 min mit *S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. aureus* Newman (jeweils mit Syto13 markiert) kokubiert. Danach erfolgte die Messung der Bakterien-positive Plättchen mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

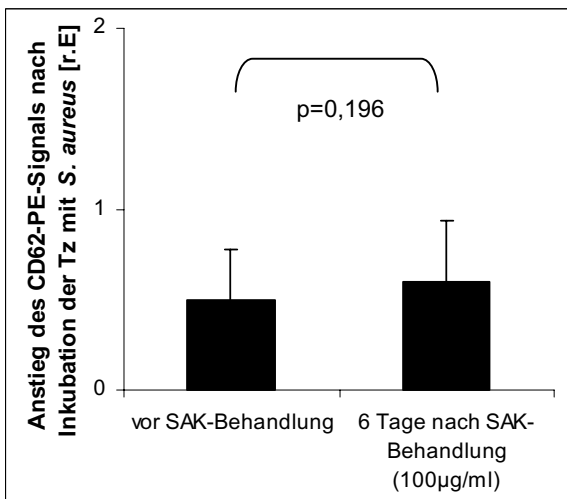
- Abb. 3-50 (A): *S. aureus* Newman  
 Raute: Wildtyp-Mäuse  
 offenes Quadrat: Syndecan-1 knock out Mäuse
- Abb. 3-52 (B): *S. aureus* Newman  
 Raute: Wildtyp-Mäuse  
 offenes Quadrat: Syndecan-4 knock out Mäuse
- Abb. 3-52 (C): *S. aureus* Cowan 1  
 Raute: Wildtyp-Mäuse  
 offenes Quadrat: Syndecan-1 knock out Mäuse
- Abb. 3-52 (D): *S. aureus* Cowan 1  
 Raute: Wildtyp-Mäuse  
 offenes Quadrat: Syndecan-4 knock out Mäuse

### 3.9 Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus* in Anwesenheit von Antikörpern gegen Staphylokinase

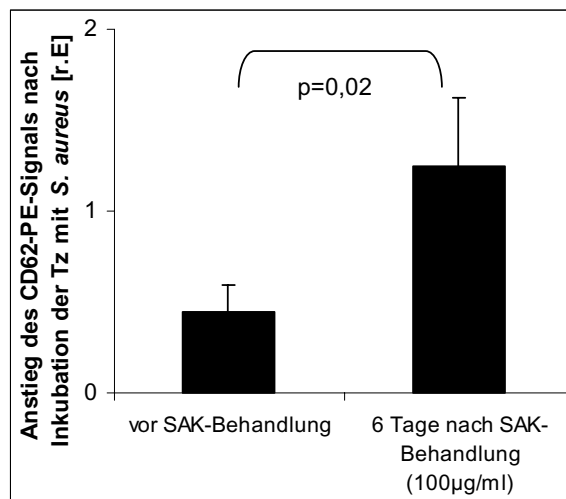
Während Streptokinase die Plättchenaggregation auslösen kann, ist Staphylokinase (SAK) alleine nicht dazu in der Lage (Abdelouahed *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass die Bindung von Antistreptokinase Antikörpern an den FcRII-Rezeptor an der Aktivierung der Plättchen durch Streptokinase beteiligt ist (Lebrazi *et al.*, 1995). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Antikörper gegen SAK einen Einfluss auf die Aktivierbarkeit von Plättchen durch *S. aureus* haben. Dazu wurden 2 Kaninchen mit SAK immunisiert.

### 3. Ergebnisse

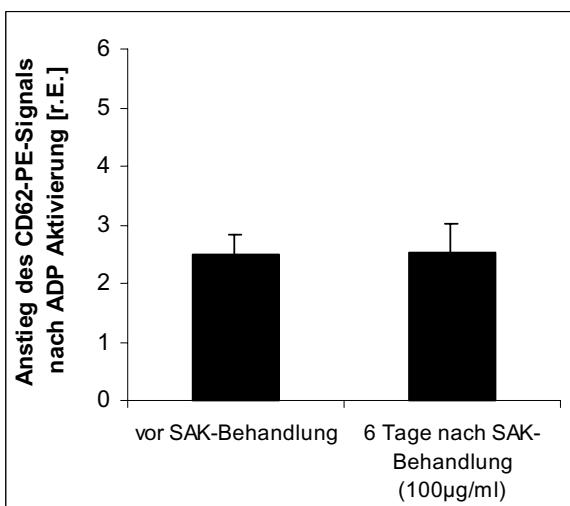
**A** Kaninchen 1



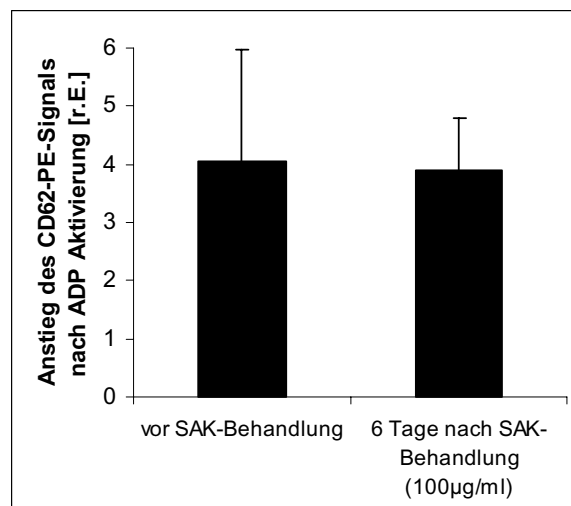
**B** Kaninchen 2



**C** Kaninchen 1



**D** Kaninchen 2



**Abb. 3-52: Sechs Tage nach dem „boostern“ der Kaninchen mit 100 µg/ml SAK ließen sich die Plättchen von Kaninchen 2 durch *S. aureus* Newman aktivieren.** Die Kaninchen wurden mit SAK immunisiert. Jeweils 6 Tage nach dem „boostern“ wurde den Tieren Blut entnommen und die Aktivierbarkeit der Plättchen durch *S. aureus* Newman nach 10 min Koinkubation mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers gegen CD62P bestimmt; (A) Kaninchen 1, (B) Kaninchen 2. Im Vergleich dazu wurden die Kaninchen statt mit *S. aureus* mit ADP aktiviert; (C) Kaninchen 1; (D) Kaninchen 2. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von mindestens 5 Messungen im Durchflusszytometer  $\pm$  SD.

Jeweils vor der SAK-Gabe und 6 Tage nachdem die Tiere „geboostert“ wurden, wurde den Tieren Blut entnommen und die Kaninchenplättchen auf eine eventuelle Aktivierbarkeit durch *S. aureus* hin untersucht. Dazu wurden Plättchen in PRP mit *S. aureus* Newman für 10 min inkubiert. Die Detektion der Plättchenaktivierung erfolgte mit einem monoklonalen PE-konjugierten Antikörper gegen CD62P (Abb. 3-52). Die Plättchen des Kaninchens 2 ließen sich 6 Tage nach dem SAK-„boost“ durch *S. aureus* Newman aktivieren. Die Mittelwert-Bildung der Aktivierungsversuche zeigte bei dem



Kaninchen 2 signifikante Unterschiede zwischen „vor“ und „nach SAK-Behandlung“. Bei beiden Kaninchen war nach ADP-Anregung (1  $\mu\text{M}$ ) der Anstieg des Signals höher als bei der Aktivierung durch *S. aureus* (Abb. 3-52/C und D) wobei bei Kaninchen 2 der Anstieg größer war, als bei Kaninchen 1, es gab aber keinen Unterschied zwischen „vor“ und „nach SAK-Behandlung“.

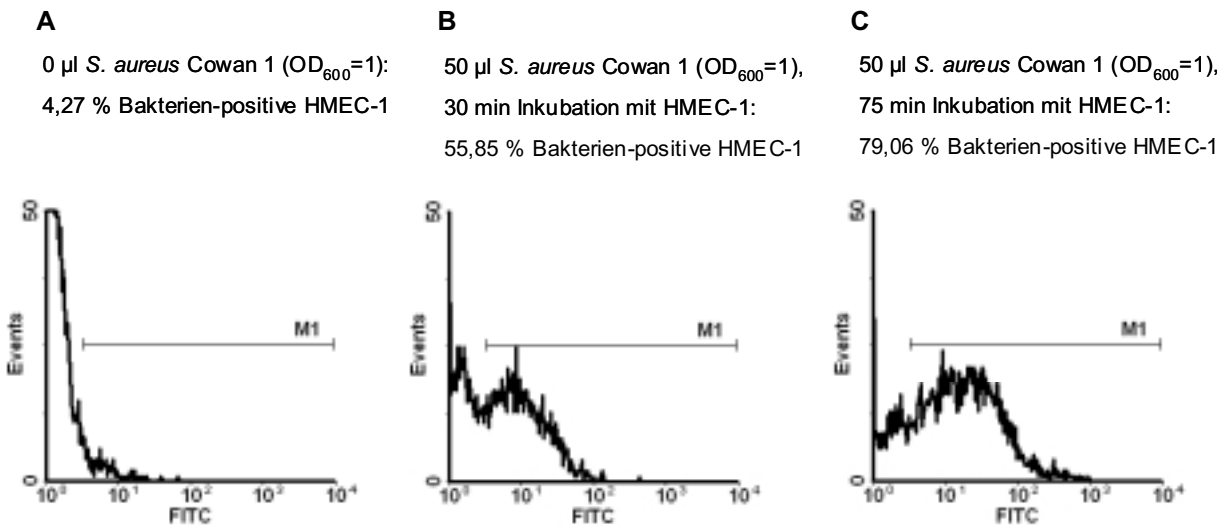
### **3.10 Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen (HMEC-1)**

Auch für die Untersuchung der Staphylokokken-Endothel-Interaktion wurde ein Versuchsaufbau verwendet, der eine durchflusszytometrische Messung zuließ. Dazu wurde *S. aureus* mit FITC angefärbt. Nach mehrmaligen Waschen und einer Ultraschallbehandlung zur Vereinzelung der Bakterien wurde die Bakteriensuspension mit PBS oder HEPES-Tyrode-Puffer auf eine  $\text{OD}_{600}=1$  eingestellt. Kultivierte mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) wurden in „24-well“-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden sie mit je nach Versuch festgelegten Mengen an Bakteriensuspension für festgelegte Zeit in den „Cellwells“ bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenierten bzw. invadierten Bakterien mit dem Puffer abgezogen und nach mehrmaligem Waschen die HMEC-1 mit Accutase abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Puffer aufgenommen und die Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde ein Gate um die Endothelzellpopulation gesetzt und bei 5000 Ereignissen in diesem Gate die Zunahme bzw. die Verteilung des 1. Fluoreszenzsignals geprüft.

#### **3.10.1 Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen in Abhängigkeit von der Bakterienzahl**

Es sollte geprüft werden, wie sich die Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen mit steigender Bakterienzahl verändert. In Abb. 3-53 sind beispielhaft die Ergebnisse von 3 Messungen gezeigt.

### 3. Ergebnisse

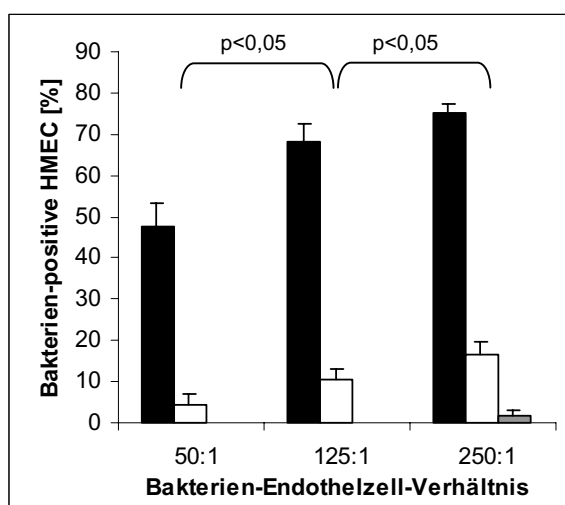


**Abb. 3-53: Anstieg der Bakterien-positiven HMEC-1 mit der Zeit.** *S. aureus* wurde mit FITC angefärbt. Nach mehrmaligen Waschen wurde die Bakteriensuspension mit HEPES-Tyrode-Puffer auf eine  $OD_{600}=1$  eingestellt. Kultivierte mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) wurden in „24-well“-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden sie mit 50  $\mu$ l/well Bakteriensuspension für (B) 30 min und für (C) 75 min in den „Cellwells“ bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die nicht adhärerten bzw. invasiven Bakterien mit dem Puffer abgezogen und nach mehrmaligem Waschen die HMEC-1 mit Accutase abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in Puffer aufgenommen und die Bindung von *S. aureus* an die Endothelzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurde ein Gate um die Endothelzellpopulation gesetzt und bei 5000 Ereignissen in diesem Gate die Zunahme bzw. die Verteilung des 1. Fluoreszenzsignals geprüft.

Obwohl in Abb. 3-53/A keine Bakterien zugegeben wurden, wurden durch das Setzen des Gates 4% der HMEC-1 als Bakterien-positiv detektiert. In Abb. 3-53/B sieht man die Ausbildung von 2 Zellpopulationen, die HMEC-1 ohne und die HMEC-1 mit Bakterien, nach Zugabe von 50  $\mu$ l *S. aureus* Cowan 1 ( $OD_{600}=1$ ), welches etwa einem Verhältnis von 250 Bakterien auf eine Endothelzelle entspricht. Die Inkubationszeit betrug 30 min. Nach 75 min waren nahezu 80 % der HMEC-1 Bakterien-positiv bei gleichem Endothelzell-Bakterien-Verhältnis (Abb. 3-53/C). Um den Prozentsatz an „falsch-Bakterien-positiven“ Endothelzellen (in diesem Beispiel 4,27 %) wurde im folgendem die Ergebnisse jeweils korrigiert.

Die Abb. 3-54 zeigt den prozentualen Anteil der Bakterien-positiven HMEC-1 nach 60 min Inkubation mit *S. aureus* Cowan 1 und *S. aureus* Newman in unterschiedlichen Zellzahl-Verhältnissen zu den Endothelzellen (50:1 – 250:1 Bakterien:Endothelzellen). Bei dem Verhältnis 250 Bakterien pro 1 Endothelzelle wurde außerdem noch die

Bindung von *S. carnosus* TM300 als Negativkontrolle untersucht. *S. aureus* Cowan 1 hatte nach 60 min stark an die Endothelzellen angebinden. Schon bei einem Verhältnis von 50 *S. aureus* zu 1 Endothelzelle waren nahezu 50 % der HMEC-1 Bakterien-positiv. Bei einem Verhältnis von 250 zu 1 waren es fast 80 %. Auch bei *S. aureus* Newman stieg der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven HMEC-1 mit steigender Bakterienmenge signifikant an, aber bei einem Verhältnis von 250 zu 1 waren nur 17 % der Endothelzellen Bakterien-positiv. Bei der Zugaben von 50  $\mu$ l *S. carnosus* TM300 (*S. carnosus* : Endothelzellen = 250 : 1) wurden nur 1,87 % als Bakterien-positive HMEC-1 detektiert. *S. carnosus* band also fast gar nicht an die untersuchten Endothelzellen an.



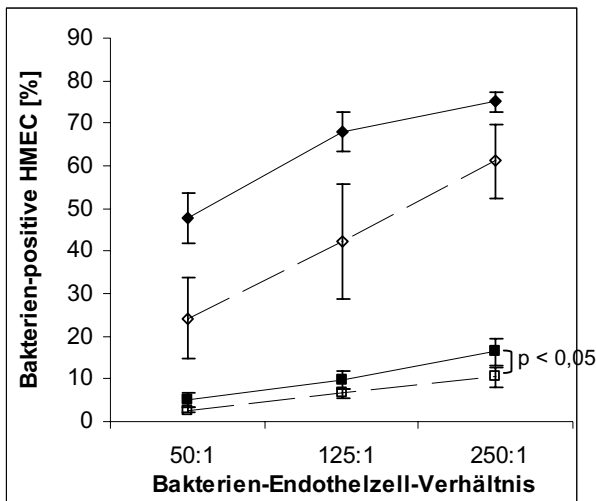
**Abb. 3-54: *S. aureus* Cowan 1 bindet stark an die Endothelzellen. *S. aureus* Newman bindet geringer und *S. carnosus* TM300 bindet nahezu gar nicht.** HMEC-1 wurden mit FITC-markierte *S. aureus* (in unterschiedlichen Zellzahlverhältnissen zu den Endothelzellen) in 24-„well“-Platten für 60 min inkubiert. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD. *S. aureus* Cowan 1 (schwarze Säulen), *S. aureus* Newman (weißen Säulen), nur bei 250:1 Bakterien-Endothelzellverhältnis: *S. carnosus* TM300 (graue Säule).

### 3.10.2 Bestimmung der in die Endothelzellen invadierten *S. aureus*

Um nur die in die Endothelzellen eingedrungenen *S. aureus* zu bestimmen, wurden die extrazellulären Bakterien mit 20  $\mu$ g/ml Lysostaphin 20 min vor Ende der Inkubationszeit mit den Endothelzellen (60 min) lysiert. In Abb. 3-55 ist zu sehen, dass bei *S. aureus* Cowan 1 auch der prozentuale Anteil an Endothelzellen mit intrazellulären Bakterien mit ansteigendem Bakterien-Endothelzellenverhältnis stark anstieg. Dabei stieg der Anteil der Endothelzellen mit invadierten Bakterien stärker an als der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven Endothelzellen (adhärenten und invadierten *S. aureus* Cowan 1): während bei dem Bakterien-Endothelzellverhältnis 50:1 nur etwa in die Hälfte der Bakterien-positiven HMEC-1 Bakterien eindringen, drangen bei dem Verhältnis 250:1 in mehr als 4/5 der Bakterien-positiven Endothelzellen Bakterien ein. Das heißt, mit ansteigender Bakterienzahl nahm die Aufnahme in die Endothelzellen zu und die Anzahl an adhären Zellen ab. Bei *S. aureus* Newman gab es bei dem Bakterien-

### 3. Ergebnisse

Endothelzellverhältnis 250:1 einen signifikanten Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil der HMEC-1 mit invadierten Zellen und den HMEC-1 mit invadierten plus adhären Zellen ( $p=0,037$ ), d. h. dass die meisten *S. aureus* Newman nur adhären waren.



**Abb. 3-55: Die Bestimmung der invadierten *S. aureus* ist nach Entfernung der an den HMEC-1 adhären *S. aureus* möglich.**

HMEC-1 wurden mit FITC-markierten *S. aureus* in 24-„well“-Platten für 60 min inkubiert. 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien mit 20  $\mu\text{g/ml}$  Lysostaphin entfernt. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

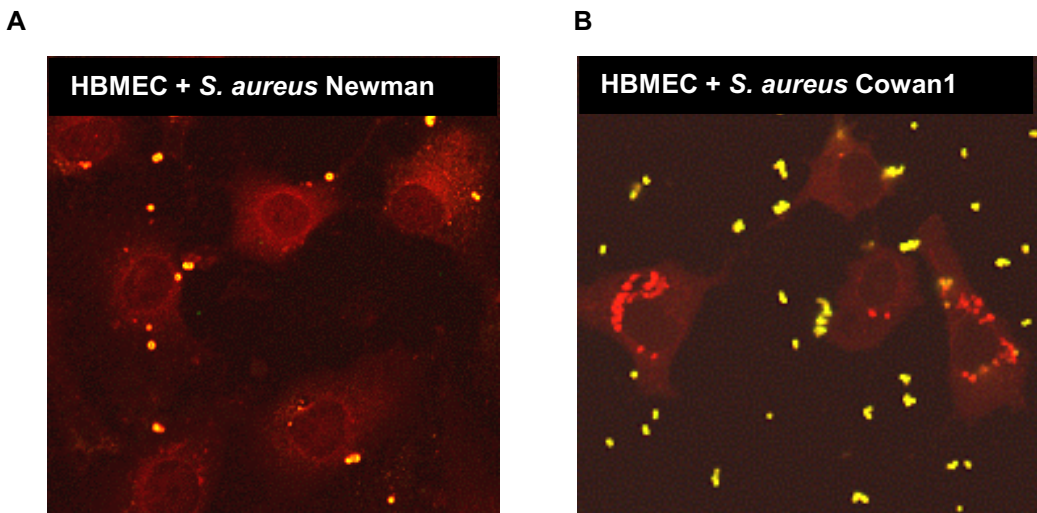
Raute: *S. aureus* Cowan 1

Quadrat: *S. aureus* Newman

durchgezogene Linie: adhären und invadierte *S. aureus*

gestrichelte Linie: nur invadierte *S. aureus*

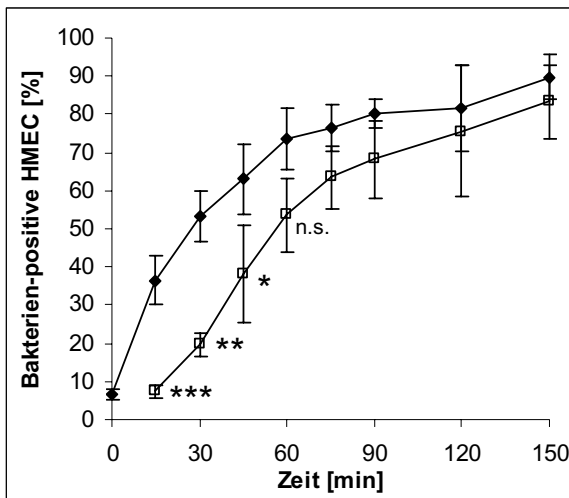
Für die Aufnahmen in Abb. 3-56 wurden Endothelzellen (HBMEC) auf Glas-Deckgläsern in 24-„well“-Platten ausgesät. Das Wachstum erfolgte bis zur Konfluenz. Die Endothelzellen wurden mit  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Keimen (*S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. aureus* Newman) für 2 Stunden inkubiert. Um nichtgebundene Bakterien zu entfernen, wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 3,75 % Paraformaldehyd. Adhärenz und invadierte Bakterien wurde mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Dafür wurden die extrazellulären Bakterien zuerst mit Alexa 488 markiert, anschließend wurden die Endothelzellen mit TritonX-100 permeabilisiert und die Bakterien, auch die eingedrungenen, mit Alexa 568 markiert. In der Fluoreszenzmikroskopie erschienen die extrazellulären Bakterien daher gelb und die intrazellulären Bakterien rot. In Abb. 3-58/A sind nur wenige *S. aureus* Newman zu sehen, und diese sind extrazellulär. In Abb. 3-58/B sind dagegen viele intra- als auch extrazelluläre *S. aureus* Cowan 1 zu erkennen.



**Abb. 3-56: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Endothelzellen (HBMEC) mit extrazellulären und intrazellulären *S. aureus*.** Die HBMEC wurden auf Glas-Deckgläsern bis zur Konfluenz angezogen und dann mit *S. aureus* (Newman (A), bzw. Cowan 1 (B)) inkubiert. Nach Fixierung der Zellen mit 3,75 % Paraformaldehyd wurden die extrazellulären Bakterien mit Alexa 488 markiert, anschließend wurden die Endothelzellen mit TritonX-100 permeabilisiert und die Bakterien, auch die invasiven, mit Alexa 568 markiert. In der Fluoreszenzmikroskopie erscheinen die extrazellulären Bakterien gelb und die intrazellulären Bakterien rot. Während nur wenige *S. aureus* Newman an die Endothelzellen anbanden, sind nach der Inkubation mit *S. aureus* Cowan 1 viele Bakterien sowohl invasiv als auch adhären.

### 3.10.3 Abhängigkeit der Bindung und Invasion von *S. aureus* Cowan 1 von der Zeit

Um die zeitliche Abhängigkeit der Bindung und Invasion von *S. aureus* zu untersuchen, wurden Endothelzellen (HMEC-1) mit FITC-markierten *S. aureus* Cowan 1 im Verhältnis 1:250 inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 0-150 min. Für die Untersuchung der intrazellulären *S. aureus* wurden die extrazellulären Bakterien 20 min vor Ende der Inkubationszeit mit 20 µg/ml Lysostaphin lysiert. Bei der 15 min Inkubationszeit erfolgte die Lyse mit Lysostaphin nur für 10 min. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase. Während der ersten 60 min stieg die Anzahl der Bakterien-positiven Endothelzellen nahezu linear mit der Zeit an, danach nur noch gering (Abb. 3-57). Der Anteil der HMEC-1 mit intrazellulären Bakterien war während der ersten 30 min Inkubationszeit noch gering, aber nach 60 min gab es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den HMEC-1 mit intrazellulären Bakterien und den HMEC-1 mit intrazellulären plus adhären *S. aureus*. Das heißt nach 1 h waren fast alle Bakterien intrazellulär.



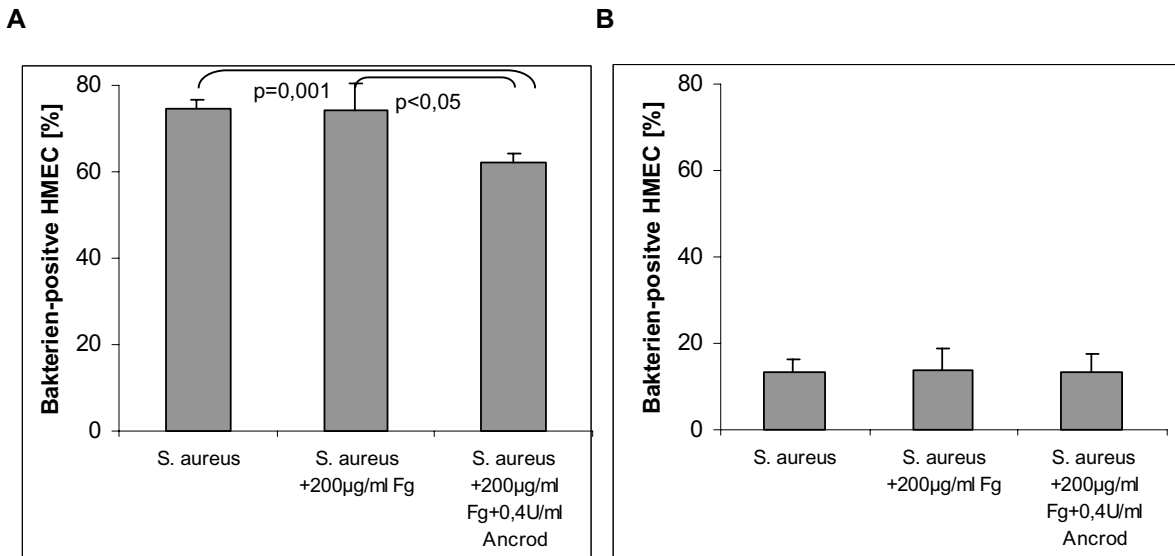
**Abb. 3-57: Die Anzahl an intrazellulären *S. aureus* Cowan 1 in Endothelzellen (HMEC-1) nimmt mit der Länge der Inkubationszeit zu.** HMEC-1 wurden mit FITC-markierten *S. aureus* in 24-„well“-Platten in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 250 zu 1 für 150 min inkubiert. 20 min vor Ende der Inkubationszeit (bei 15 min Inkubationszeit nur 10 min vor Ende der Inkubationszeit) wurden die extrazellulären Bakterien in einem weiteren Versuchsansatz mit 20 µg/ml Lysostaphin entfernt. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen ± SD.

Raute: intrazelluläre und adhärenente *S. aureus* Cowan 1  
 Quadrat: nur intrazelluläre *S. aureus* Cowan 1

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ : Vergleich Endothelzellen mit adhärenenten und intrazellulären Bakterien mit Endothelzellen mit nur intrazellulären Bakterien zum gleichen Zeitpunkt

#### 3.10.4 Einfluss von Fibrinogen und Fibrin auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen

In dieser Dissertation wurde der Assoziationszahl steigernde Einfluss von Fibrin bei *S. aureus* mit Thrombozyten festgestellt, im Gegensatz zu Fibrinogen, welches keinen Einfluss auf die Assoziatbildung hatte (Kap. 3.2.2). Um zu prüfen, ob Fibrinogen oder Fibrin auch einen Einfluss auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen hat, wurden HMEC-1 für 30 min mit 200 µg/ml Fibrinogen bzw. 200 µg/ml Fibrinogen, 0,4 U/ml Ancrod (zur Fibrinbildung) und 1,25 mM GPRP (zur Verhinderung der Fibrinpolymerisation) inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Endothelzellen mit FITC-markierten *S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. aureus* Newman in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 125 zu 1. In Abb. 3-58/A ist zu sehen, dass bei *S. aureus* Cowan 1 der Fibrinogenzusatz keine Auswirkung auf die Anzahl der Bakterien-positiven Endothelzellen hatte. Bei der Behandlung „*S. aureus* + 200 µg/ml Fibrinogen plus 0,4 U/ml Ancrod“ dagegen war der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven HMEC-1 signifikant verringert im Vergleich zu der Behandlung „*S. aureus*“ ( $p=0,001$ ) und auch der Behandlung „*S. aureus* + 200 µg/ml Fibrinogen“ ( $p=0,042$ ). Bei *S. aureus* Newman hatten sowohl Fibrinogen als auch Fibrin keinen erkennbaren Einfluss auf die Assoziatbildung (Abb. 3-58/B).

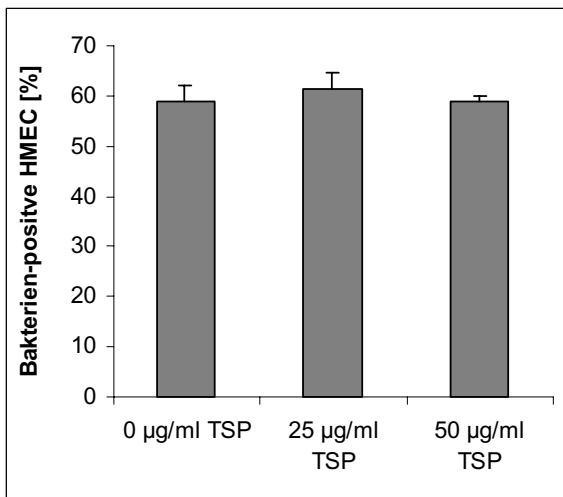


**3-58: Adhärenz und Invasion von *S. aureus* Cowan 1 (A) bzw. *S. aureus* Newman (B) an/in Endothelzellen (HMEC-1) wird durch Zusatz von Fibrinogen oder Fibrin nicht verändert.** Die HMEC-1 wurden mit 200 µg/ml Fibrinogen bzw. 200 µg/ml Fibrinogen + 0,4 U/ml Ancrod + 1,25 mM GPRP für 30 min inkubiert, anschließend wurden sie weiter mit FITC-markierten *S. aureus* in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 125 zu 1 für 60 min inkubiert. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen ± SD.

### 3.10.5 Einfluss von TSP-1 auf die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob TSP-1 nicht nur bei den Plättchen und *S. aureus* einen Assoziationszahl steigernden Einfluss hat, sondern auch bei den Endothelzellen und *S. aureus*, wurden die Endothelzellen für 30 min mit TSP-1 (25 mg/ml und 50 µg/ml bei *S. aureus* Cowan 1 bzw. 5-150 µg/ml bei *S. aureus* Newman) in HEPES-Tyrode-Puffer plus 2 mM Calcium inkubiert. Anschließend wurden die FITC-markierten *S. aureus* in einem Verhältnis zu den Endothelzellen von 125 zu 1 zugesetzt. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit. Die Detektierung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch. Wie in Abb. 3-59 zu sehen ist, gab es bei *S. aureus* Cowan 1 keine Steigerung des prozentualen Anteils an Bakterien-positiven HMEC-1 durch TSP-

### 3. Ergebnisse

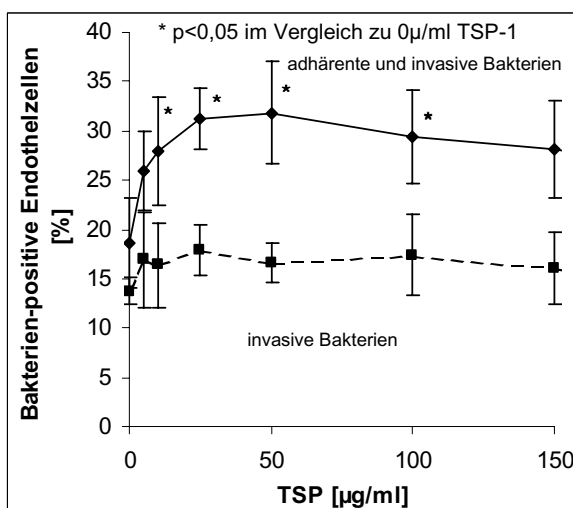


**Abb. 3-59: Adhärenz und Invasion von *S. aureus* Cowan 1 an/in Endothelzellen (HMEC-1) wird durch Zusatz von TSP-1 nicht verändert.** Die HMEC-1 wurden mit TSP-1 für 30 min vorinkubiert, anschließend wurden sie weiter mit FITC-markierten *S. aureus* in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 125 zu 1 für 60 min inkubiert. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

Bei *S. aureus* Newman dagegen wurde der Anteil an Bakterien-positiven HMEC durch TSP-1 signifikant gesteigert (Abb. 3-60/A). Der positive Effekt auf die Assoziatbildung war abhängig von der Konzentration des zugesetzten TSP-1. Ab einer Konzentration von 100 µg/ml TSP-1 sank der Anteil an Bakterien-positiven HMEC wieder und war ab einer Konzentration von 150 µg/ml TSP-1 nicht mehr signifikant verschieden von dem Versuchsansatz ohne TSP-1. Durch Einsatz von Lysostaphin wurde bei *S. aureus* Newman festgestellt, dass TSP-1 keinen Einfluss auf die Invasion von *S. aureus* in die Endothelzellen hatte. (Abb. 3-60/A).

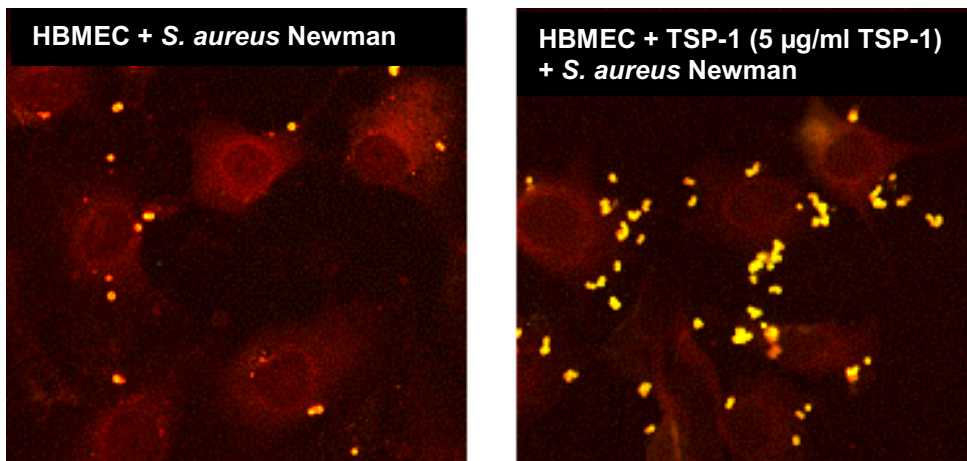
Auch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Bindung/Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen (HBMEC) nach 30 min Vorinkubation der Endothelzellen mit 5 µg/ml TSP-1 zeigte, dass *S. aureus* vermehrt an den Endothelzellen anband, aber nicht stärker invadierte (Abb. 3-60/B).

A





B



**Abb. 3-60: Die Adhärenz von *S. aureus* Newman an Endothelzellen (HMEC-1) wird durch Zusatz von TSP-1 gesteigert, die Invasion in Endothelzellen nicht.** (A) Die HMEC-1 wurden mit TSP-1 für 30 min vorinkubiert, anschließend wurden sie weiter mit FITC-markierten *S. aureus* in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 125 zu 1 für 60 min inkubiert. 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in einem weiteren Versuchsansatz mit 20 µg/ml Lysostaphin entfernt. Nach Ablösen der HMEC-1 mit Accutase wurde die Bakterien-positiven HMEC-1 durchflusszytometrisch bestimmt. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

(B) HBMEC wurden auf Glas-Deckgläsern bis zur Konfluenz angezogen, mit 5 µg/ml TSP-1 für 30 min vorinkubiert und dann mit *S. aureus* Newman inkubiert. Nach Fixierung und Markierung der Bakterien erschienen die extrazellulären Bakterien in der Doppelimmunfluoreszenz gelb und die intrazellulären Bakterien rot. Nach TSP-1 Zusatz hatte die Anzahl an extrazellulären Bakterien zugenommen, nicht aber die Anzahl an intrazellulären Bakterien.

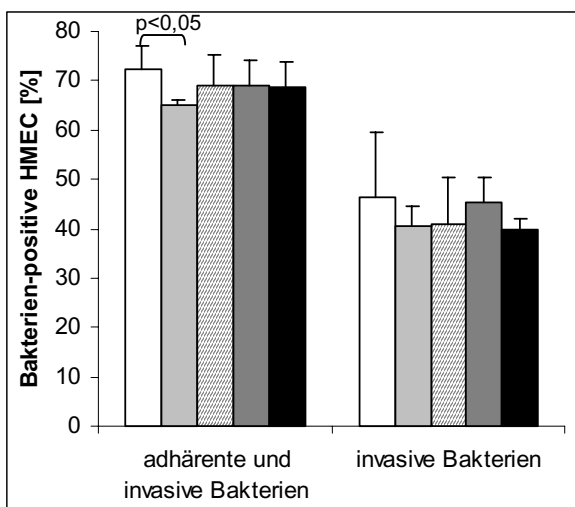
### 3.10.6 Bedeutung von Thrombozyten und Fibrinogen bzw. Fibrin für die Bindung und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen

Um zu untersuchen, ob Thrombozyten in Zusammenarbeit mit Fibrinogen bzw. Fibrin die Adhärenz und Invasion von *S. aureus* an bzw. in Endothelzellen verändern, wurden Endothelzellen mit gefilterten Thrombozyten (50.000 Tz/µl) für 30 min vorinkubiert. Zusätzlich wurde in weiteren Versuchsansätzen noch Fibrinogen (200 µg/ml) bzw. Fibrin (aus 200 µg/ml Fibrinogen und 0,4 U/ml Ancrod) bzw. Fibrin und 2 µM ADP zur Aktivierung der Thrombozyten hinzugefügt. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Cowan 1 bzw. *S. aureus* Newman in einem Bakterien-Endothelzellverhältnis von 125 zu 1 ohne nichtgebundene Thrombozyten, Fibrinogen oder Fibrin zu entfernen. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach einem Waschschrift und dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase. Zur getrennten Untersuchung der nur invadierten *S. aureus* wurden die extrazellulären *S. aureus* mit

### 3. Ergebnisse

Lysostaphin entfernt. Die Lyse erfolgte in den letzten 20 min der Inkubationszeit mit *S. aureus*.

Die Bindung an bzw. Invasion in Endothelzellen von *S. aureus* Cowan 1 (Abb. 3-61) wurde durch die Anwesenheit von Thrombozyten bzw. Thrombozyten und Fibrinogen oder Fibrin nicht verändert. Nur durch Thrombozyten alleine wurde der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven HMEC-1 (adhärenten und invasive *S. aureus*) leicht aber signifikant ( $p=0,025$ ) gesenkt.



**Abb. 3-61 Thrombozyten plus Fibrinogen bzw. Fibrin haben keinen Einfluss auf die Bindung bzw. Invasion von *S. aureus* Cowan 1 an/in Endothelzellen.** HMEC-1 wurden mit gelf. Thrombozyten (50.000 Tz/ $\mu$ l) für 30 min vorinkubiert. Zusätzlich wurde in weiteren Versuchsansätzen noch Fibrinogen (200  $\mu$ g/ml) bzw. Fibrin (aus 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen und 0,4 U/ml Ancrod) bzw. Fibrin und 2  $\mu$ M ADP zur Aktivierung der Thrombozyten hinzugefügt. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Cowan 1 (Bakterien-Endothelzellverhältnis 125 zu 1). 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in einem weiteren Versuchsansatz mit 20  $\mu$ g/ml Lysostaphin entfernt. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase.

weiße Säulen: HMEC-1 + *S. aureus* Cowan 1

hellgraue Säulen: HMEC-1 + Tz + *S. aureus* Cowan 1

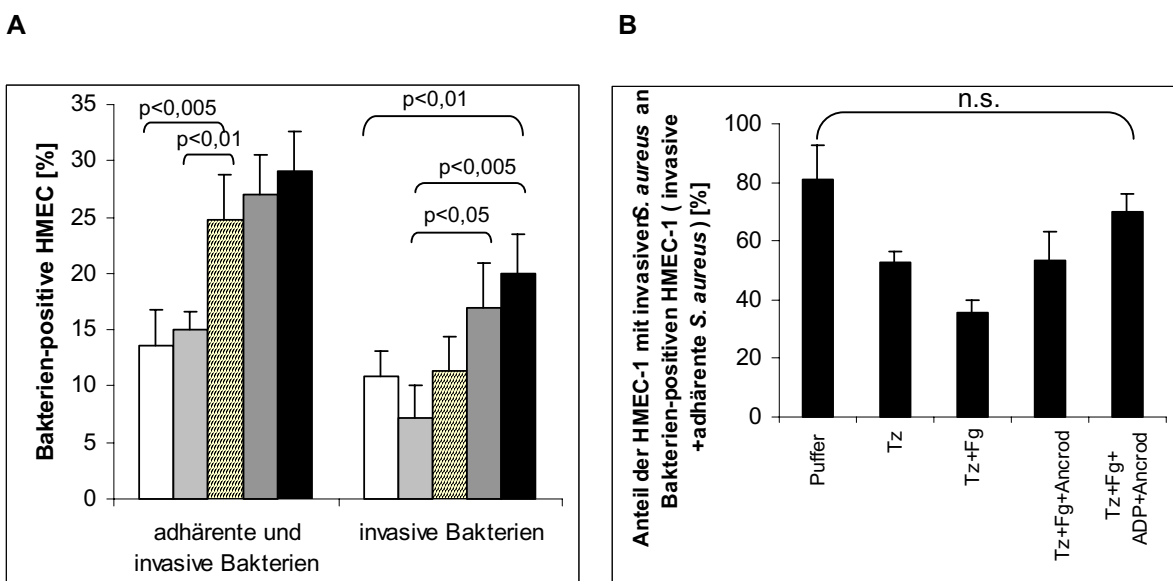
gestreifte Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + *S. aureus* Cowan 1

dunkelgraue Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + 0,4 U/ml Ancrod + *S. aureus* Cowan 1

schwarze Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + 0,4 U/ml Ancrod + 2  $\mu$ M ADP + *S. aureus* Cowan 1

Bei *S. aureus* Newman (Abb. 3-62/A) wurde der prozentuale Anteil der Bakterien-positiven HMEC-1 durch Thrombozytenzugabe nicht signifikant verändert. Durch Zusatz von Thrombozyten und Fibrinogen wurde die Assoziation dagegen signifikant gesteigert. Eine weitere Steigerung der Anzahl der Bakterien-positiven HMEC-1 wurde durch Spaltung des Fibrinogens durch Ancrod erreicht und noch eine weitere durch die Aktivierung der Thrombozyten, diese Steigerungen waren aber nicht signifikant. Bei den HMEC-1 mit nur intrazellulären *S. aureus* wurde ein ähnliches Ergebnis festgestellt, es gab aber nur einen signifikanten Unterschied zu dem Versuchsansatz „ohne Thrombozyten“ bei dem Versuchsansatz mit Aktivierung der Thrombozyten durch ADP

und Bildung von Fibrin durch Ancrod. Außerdem gab es eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils der Endothelzellen mit invasiven *S. aureus* Newman bei dem Versuchsansatz „Ancrod“ und „Ancrod und ADP“ im Vergleich zu dem Versuchsansatz, bei dem nur Thrombozyten zugesetzt wurden. Der Abb. 3-62/B ist zu entnehmen, dass der prozentuale Anteil der HMEC-1 mit intrazellulären *S. aureus* an der Gesamtheit der *S. aureus* tragenden HMEC-1 bei allen Versuchsansätzen mit Thrombozyten signifikant niedrigerer war als im Puffersystem, mit Ausnahme des Versuchsansatzes „Thrombozyten + Fibrinogen + ADP + Ancrod“.



**Abb. 3-62 Thrombozyten plus Fibrinogen bzw. Fibrin steigern die Bindung bzw. Invasion von *S. aureus* Newman an/in Endothelzellen.** (A) HMEC wurden mit gelb. Thrombozyten (50.000 Tz/ $\mu$ l) für 30 min vorinkubiert. Zusätzlich wurde in weiteren Versuchsansätzen noch Fibrinogen (200  $\mu$ g/ml) bzw. Fibrin (aus 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen und 0,4 U/ml Ancrod) bzw. Fibrin und 2  $\mu$ M ADP zur Aktivierung der Thrombozyten hinzugefügt. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Newman (Bakterien-Endothelzellverhältnis 125 zu 1). 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in einem weiteren Versuchsansatz mit 20  $\mu$ g/ml Lysostaphin entfernt. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

weiße Säulen: HMEC-1 + *S. aureus* Newman

hellgraue Säulen: HMEC-1 + Tz + *S. aureus* Newman

gestreifte Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + *S. aureus* Newman

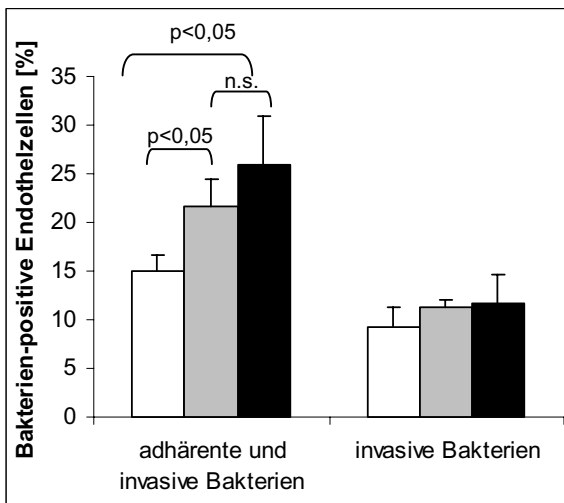
dunkelgraue Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + 0,4 U/ml Ancrod + *S. aureus* Newman

schwarze Säulen: HMEC-1 + Tz + 200  $\mu$ g/ml Fg + 0,4 U/ml Ancrod + 2  $\mu$ M ADP + *S. aureus* Newman

Abb. 3-62/B zeigt den Anteil der Endothelzellen mit invasiven *S. aureus* Newman im Vergleich zu allen Bakterien-positiven Endothelzellen (mit adhärenen und invasiven *S. aureus*).

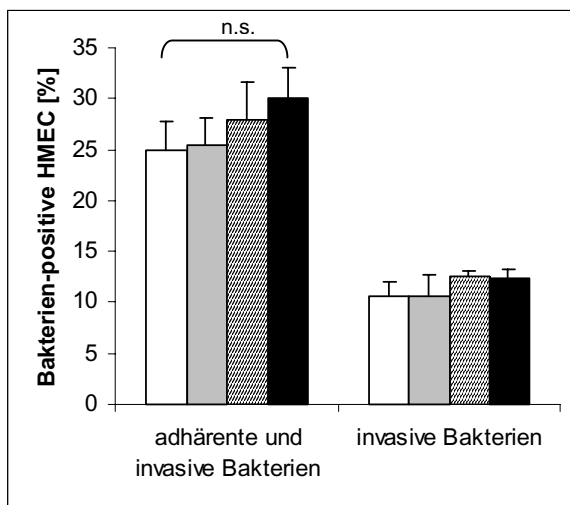
### 3.10.7 Bedeutung von Thrombozyten und TSP-1 für die Bindung und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen

Durch Vorinkubation der HMEC-1 mit Thrombozyten und TSP-1 (50 µg/ml bzw. 200 µg/ml) wurde die Bindung von *S. aureus* Newman an die Endothelzellen signifikant gesteigert (Abb. 3-63). Der Anstieg entsprach etwa dem von TSP-1 alleine, ohne zusätzlichen Einfluss der Thrombozyten (Abb. 3-60/A). Die Invasion wurde durch TSP-1 und Thrombozyten nicht signifikant verändert.



**Abb. 3-63 Thrombozyten plus TSP-1 steigern die Bindung von *S. aureus* Newman an Endothelzellen, wobei der Anstieg der Bakterien-positiven HMEC-1 vergleichbar ist mit dem Anstieg durch TSP-1 alleine (Abb. 3-60).** HMEC wurden mit gelf. Thrombozyten (50.000 Tz/µl) für 30 min vorinkubiert (weiße Säulen). Zusätzlich wurde in weiteren Versuchsansätzen 50 µg/ml TSP-1 (graue Säulen) bzw. 200 µg/ml TSP-1 (schwarze Säulen) hinzugefügt. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Newman (Bakterien-Endothelzellverhältnis 125 zu 1). 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in weiteren Versuchsansätzen mit 20 µg/ml Lysostaphin entfernt. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen ± SD.

Wurden die Thrombozyten zusätzlich zu dem TSP-1-Zusatz (50 µg/ml) mit ADP (2 µM) aktiviert und Ancrod (0,4 U/ml) zugesetzt (Abb. 3-64), stieg die Anzahl der Endothelzellen mit adhärenen und invasiven *S. aureus* Newman leicht an, der Unterschied war aber nicht signifikant. Die Anzahl der Endothelzellen mit invasiven Bakterien veränderte sich auch nicht signifikant.



**Abb. 3-64 Thrombozyten plus TSP-1, Aktivierung der Plättchen und Ancrodeinfluss steigern die Bindung von *S. aureus* Newman an Endothelzellen leicht, aber nicht signifikant.**

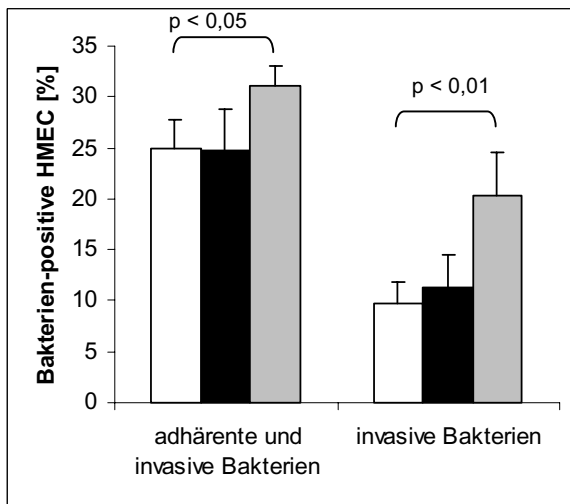
HMEC-1 wurden mit gelf. Thrombozyten (50.000 Tz/ $\mu$ l) und 50  $\mu$ g/ml TSP-1 für 30 min vorinkubiert (weiße Säulen). Zusätzlich wurde in weiteren Versuchsansätzen 2  $\mu$ M ADP (graue Säule), 0,4 U/ml Ancrod (gestreifte Säulen) oder 2  $\mu$ M ADP und 0,4 Ancrod (schwarze Säulen) hinzugefügt. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Newman (Bakterien-Endothelzellverhältnis 125 zu 1). 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in weiteren Versuchsansätzen mit 20  $\mu$ g/ml Lysostaphin entfernt. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

### 3.10.8 Zusammenspiel von (aktivierten) Thrombozyten, Fibrinogen bzw. Fibrin und TSP-1 bei der Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen

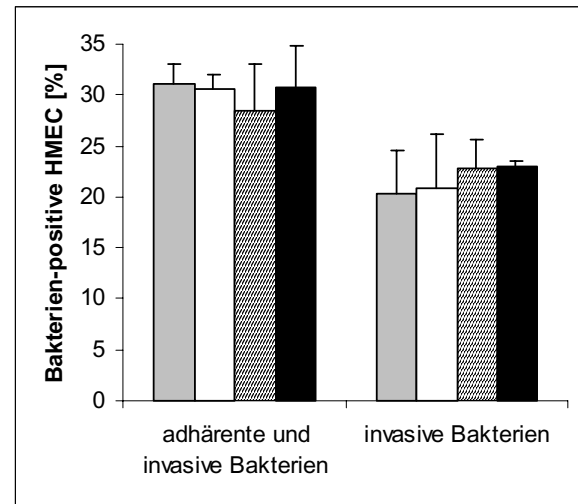
Die Abb. 3-65/A zeigt, dass vorherige Inkubation mit Thrombozyten und 50  $\mu$ g/ml TSP-1 zu genauso vielen Bakterien-positiven Endothelzellen führte, wie die Inkubation mit Thrombozyten und 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen. Durch Inkubation mit Thrombozyten, TSP-1 und Fibrinogen konnte die Bindung signifikant gesteigert werden. Auch die Invasion alleine wurde signifikant durch gemeinsame Inkubation von Thrombozyten mit Fibrinogen und TSP-1 gesteigert. Durch zusätzliche Aktivierung der Thrombozyten mit ADP und/oder Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Ancrod (Abb. 3-63/B) wurde dagegen die Anzahl der Bakterien-positiven Endothelzellen nicht weiter verändert. Auch die Anzahl an HMEC-1 mit invasiven *S. aureus* veränderte sich dadurch nicht.

### 3. Ergebnisse

A



B



**Abb. 3-65: Thrombozyten, TSP-1 und Fibrinogen haben einen synergistischen Effekt auf die Adhärenz und Invasion von *S. aureus* Newman an/in Endothelzellen.** (A) HMEC wurden mit gelf.

Thrombozyten (50.000 Tz/ $\mu$ l) und

-50  $\mu$ g/ml TSP-1 (weiße Säulen) bzw.

-200  $\mu$ g/ml Fibrinogen (schwarze Säulen) bzw.

-50  $\mu$ g/ml TSP + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen (graue Säulen)

für 30 min vorinkubiert. Nach der Vorinkubation erfolgte die einstündige Inkubation der HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* Newman (Bakterien-Endothelzellverhältnis 125 zu 1). 20 min vor Ende der Inkubationszeit wurden die extrazellulären Bakterien in weiteren Versuchsansätzen mit 20  $\mu$ g/ml Lysostaphin entfernt. Die Bestimmung der Bakterien-positiven HMEC-1 erfolgte durchflusszytometrisch nach dem Ablösen der Endothelzellen mit Accutase. Die Werte entsprechen einem Mittelwert von 3 Messungen  $\pm$  SD.

(B) Fibrinbildung durch Ancrod oder Aktivierung der Plättchen durch ADP steigert den Effekt von Thrombozyten, TSP-1 und Fibrinogen nicht weiter.

gelf. Tz + 50  $\mu$ g/ml TSP-1 + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen (graue Säulen)

gelf. Tz + 50  $\mu$ g/ml TSP-1 + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen + 2  $\mu$ M ADP (weiße Säulen)

gelf. Tz + 50  $\mu$ g/ml TSP-1 + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen + 0,4 U/ml Ancrod (gestreifte Säulen)

gelf. Tz + 50  $\mu$ g/ml TSP-1 + 200  $\mu$ g/ml Fibrinogen + 2  $\mu$ M ADP + 0,4 U/ml Ancrod (schwarze Säulen)

## 4. Diskussion

### 4.1 Plasmatische Adhäsionsproteine binden an *S. aureus*

*S. aureus* ist ein wichtiger Krankheitserreger bei intravaskulären Infektionen. Die Anbindung der Bakterien an das Wirtsgewebe ist dabei der erste wichtige Schritt. Die Anbindung kann direkt oder indirekt über Brückenmoleküle wie Fibrinogen, TSP-1, vWF oder Fibronectin erfolgen. Die Bindung von gelöstem Wirtsprotein an die Bakterienoberfläche kann den Bakterien auch eine schützende Hülle bieten, die die Erkennung durch Wirtsabwehrmechanismen behindert (Patti *et al.*, 1994).

Die prinzipielle Bindungsfähigkeit einzelner Adhäsionsproteine an *S. aureus* konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (z. B. Kuusela, 1978; Herrmann *et al.*, 1991; McDevitt *et al.*, 1994; Herrmann *et al.*, 1997). In der erwähnten Literatur wurden die Adhäsionsproteine dafür immobilisiert und die Adhäsion von *S. aureus* an diese Proteine gemessen. In dieser Arbeit sollte die spezifische Bindung plasmatischer Adhäsionsproteine in der flüssigen Phase an *S. aureus* mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Methode untersucht werden. Dafür wurden die zu untersuchenden, reinen Proteine zuerst mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert, und dann die Bindung dieser markierten Proteine in Lösung an *S. aureus* und auch an andere Bakterien wie *S. carnosus* oder *E. coli* durchflusszytometrisch bestimmt.

Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das in einer Konzentration von 3 mg/ml im Blutplasma vorkommt. Es wird in den Hepatozyten synthetisiert, ins Blut abgegeben und wird von Megakaryozyten und Thrombozyten aufgenommen. Nach Aktivierung der Thrombozyten wird es aus den  $\alpha$ -Granula der Plättchen wieder freigesetzt. Seine besondere Bedeutung hat es in der Hämostase. Außerdem ist bekannt, dass Fibrinogen *S. aureus* agglutinieren kann (Hawiger *et al.*, 1978). Es konnte mit der gewählten Methode gezeigt werden, dass alle untersuchten *S. aureus* Wildtyp-Stämme, im Gegensatz zu dem gram-negativen Stamm *E. coli*, Fibrinogen konzentrationsabhängig binden konnten und dass diese Bindung auch sättigbar war. Dabei lag die Sättigungsgrenze (etwa 100  $\mu$ g/ml Fibrinogen) weit unter der Konzentration, die Fibrinogen im Blutplasma aufweist (3 mg/ml).

TSP-1 wird vornehmlich während der Entwicklung und Wachstum und als Antwort auf Verletzungen exprimiert (Bornstein, 2001). Das Protein ist an Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen beteiligt und spielt eine Rolle in der Hämostase und der Wundheilung. Das Hauptreservoir für gespeichertes TSP-1 sind die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und von dort wird es bei der Plättchenaktivierung freigesetzt. Es macht dabei etwa ein Viertel des sezernierten Gesamtproteins aus (Kehrel *et al.*, 1996). Es liegt aber nicht nur in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten vor, sondern wird auch noch von Endothelzellen (Mosher *et al.*, 1982), Monozyten (Jaffe *et al.*, 1985), glatten Muskelzellen (Raugi *et al.*, 1982) und Fibroblasten (Jaffe *et al.*, 1983) synthetisiert. "Platelet-derived growth factors" (PDGFs), welche von Thrombozyten freigesetzt werden, können ein "immediate early gene" in glatten Muskelzellen aktivieren, welches zur Expression von TSP-1 führt (Miano *et al.*, 1993). So kann innerhalb von 15 min die Thrombospondinkonzentration gesteigert werden (Majack *et al.*, 1986). Im Gegensatz zu Fibrinogen kommt TSP-1 im Blutplasma in nur sehr geringen Konzentrationen vor, aber über einem Gerinnsel steigt die Konzentration sehr stark an, da TSP-1 von aktivierten Thrombozyten in großen Mengen freigesetzt wird. So ist die in dieser Arbeit eingesetzte TSP-1-Konzentration bis zu 100  $\mu\text{g/ml}$  physiologisch bzw. pathophysiologisch für lokale Prozesse.

TSP-1 wurde konzentrationsabhängig von allen untersuchten *S. aureus* Stämmen gebunden, im Gegensatz zu dem untersuchten gram-negativen *E. coli* Stamm. Die Bindung bei den *S. aureus* Stämmen war nicht sättigbar. Eine Assoziation mit sich selbst, wie sie in unserer Arbeitsgruppe für TSP-1 gefunden wurde, könnte der Grund sein, warum keine gesättigte Bindung erreicht werden konnte. Die Bindung von TSP-1 an *S. aureus* 8325-4 und dem aus einem Patienten isolierten Stamm 4074 lag höher als die Bindung an *S. aureus* Newman bzw. *S. aureus* Cowan1. Dieser Unterschied ist vermutlich auf unterschiedliche Adhäsinszusammensetzung auf der *S. aureus* Oberfläche zurückzuführen. So gilt *S. aureus* Newman als Clf und Koagulase reicher Stamm, aber es ist auch bekannt, dass die FnBPs nicht in der Zellwand von *S. aureus* Newman verankert werden können (Grundmeier *et al.*, 2004).

Fibronektin ist wichtig für Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen. So ist das Glykoprotein bei der Zelladhäsion, der Migration, dem Wachstum und der Entwicklung von Bedeutung. Als Brückenmolekül zwischen *S. aureus* und Endothelzellen hat es eine Schlüsselrolle in der Adhärenz an und die Invasion in Endothelzellen (Sinha *et al.*,



1999). Im Plasma kommt lösliches Fibronektin in einer Konzentration von 300 µg/ml vor (Pankov und Yamada, 2002). Im Zusammenhang mit Hämostasevorgängen und Thrombusbildung kann die lokale Fibronektinkonzentration aber auch ansteigen. So wurden bei Patienten mit einem Herzinfarkt mit einem Thrombus im linken Ventrikel Plasma-Fibronektinkonzentrationen von 400 - 500 µg/ml gemessen (Örem *et al.*, 2002). Auch bei der Fibronektin-Bindung gab es starke Unterschiede in der Bindefähigkeit, aber alle untersuchten *S. aureus* Wildtyp-Stämme banden lösliches Fibronektin konzentrationsabhängig, und diese Bindung erreichte auch eine Sättigung. Die Sättigung wurde bei den unterschiedlichen Stämmen bei unterschiedlichen Konzentrationen erreicht, aber bei 150 µg/ml Fibronektin, also bei einer halb so geringen Konzentration wie sie im Plasma zu finden ist, war die Sättigungsgrenze bei allen untersuchten Stämmen erreicht. Die Bindung von Fibronektin an *S. aureus* Newman war geringer als die Bindung an *S. aureus* Cowan 1, aber nicht geringer als die Bindung an *S. aureus* 8325-4 und dem aus einem Patienten isolierten Stamm 4074, obwohl *S. aureus* Newman keine FnBPs auf seiner Oberfläche verankern kann (Grundmeier *et al.*, 2004). Das deutet darauf hin, dass *S. aureus* andere Möglichkeiten neben den FnBPs entwickelt hat, Fibronektin zu binden. *S. carnosus*, ein apathogener Keim ohne Adhäsine auf seiner Oberfläche, konnte dagegen kaum Fibronektin binden.

Der vWF wird in den Megakaryozyten (Sporn *et al.*, 1985) und Endothelzellen (Jaffe *et al.*, 1974) synthetisiert und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen und in den  $\alpha$ -Granula der Plättchen gespeichert. Der im Blutplasma zirkulierende vWF kommt aus den Endothelzellen, von denen er kontinuierlich abgegeben wird (Ruggeri, 2003). Die vWF-Plasmakonzentration beträgt etwa 10 µg/ml. Bei einer Verletzung wird der vWF kontrolliert freigesetzt. Die Thrombozyten sezernieren vWF nach ihrer Aktivierung. So verdoppelt sich bei einem Herzinfarkt die vWF-Plasmakonzentration nahezu (Sakaki *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei der TSP-1-Konzentration ist die vWF-Konzentration in der Nähe eines Blutgerinnsels durch die Freisetzung aus Plättchen und Endothel deutlich höher als im Plasma. Die in dieser Arbeit eingesetzte vWF-Konzentration von bis 200 µg/ml ist also physiologisch bzw. pathophysiologisch für lokale Prozesse.

Die großen vWF-Multimere haben eine wichtige Rolle in der Hämostase. Sie vermitteln die Anbindung von Thrombozyten an Kollagen unter hohem Scherstress (Ruggeri *et al.*, 1999). Es konnte mit der gewählten Methode gezeigt werden, dass große vWF-Multimere auch von *S. aureus* konzentrationsabhängig gebunden wurden. Bei der

Bindung gab es keine Unterschiede zwischen den untersuchten *S. aureus* Wildtypstämmen. Der als Negativkontrolle gewählte *E. coli* Stamm zeigte dagegen nur eine sehr geringe vWF-Bindung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die gewählte Methode für die Untersuchung der Bindung von löslichen Proteinen an *S. aureus* genutzt werden kann. Alle untersuchten *S. aureus* Stämme banden die gewählten Adhäsionsproteine konzentrationsabhängig und die Bindung erreichte nahezu oder vollständig eine Sättigung. Während lösliches Fibrinogen und löslicher vWF von allen *S. aureus* Stämmen im gleichen Maße gebunden wurde, zeigten sich bei der TSP-1 und Fibronektinbindung deutliche Unterschiede zwischen den Stämmen. Alle untersuchten Stämme haben eine unterschiedliche Adhäsinszusammensetzung. So ist *S. aureus* Cowan 1 als Protein A reicher Stamm bekannt und *S. aureus* Newman als Clumping factor und Koagulase reicher, FnBP negativer Stamm. Der Stamm 8325-4 hat eine *clfA* verminderte Expression. Alle drei Laborstämme sind aber bisher auf ihre Adhäsinszusammensetzung gering untersucht. Auch über den aus einem Endokarditis-Patienten isolierten Stamm 4074 gibt es bezüglich der Adhäsine auf der *S. aureus* Oberfläche nur geringe Angaben. So ist es schwierig, aus den gemachten Ergebnissen konkrete Schlüsse für die Gründe der unterschiedlichen Bindung von Fibronektin und TSP-1 zu ziehen.

Ein Überschuss an unmarkiertem Fibrinogen inhibierte die Bindung von markiertem Fibrinogen, TSP-1 und vWF an *S. aureus*. Dies Ergebnis deutet darauf hin, dass alle drei Proteine um mindestens ein gleiches Adhäsin konkurrieren, oder aber, dass es sterische Behinderungen durch die Interaktion der Proteine mit unterschiedlichen Bindungsstellen auf der Bakterienoberfläche gibt. Unter physiologischen Umständen wird eine Konkurrenz der einzelnen Proteine um die Anbindung an die Adhäsine durch ihre sehr unterschiedlichen Konzentrationen im Plasma bestimmt. So kommt Fibrinogen in einer Konzentration von 3 mg/ml im Blutplasma vor, TSP-1 dagegen nur im ng/ml-Bereich. Auch die Konzentration von vWF im Plasma ist im Vergleich zu Fibrinogen sehr gering (10 µg/ml). Unter pathophysiologischen Bedingungen können sich aber die Konzentrationen sehr verändern. Die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Adhäsionsproteine steigen in Abhängigkeit von dem Aktivierungsstatus der unterschiedlichen freisetzenden Zellen an. So wird TSP-1 nach Aktivierung von

Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten und glatten Muskelzellen freigesetzt, wobei der TSP-1-Spiegel sehr schnell erhöht werden kann (s.o.). VWF wird aus aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen freigesetzt. Durch die Veränderung der Proteinkonzentration verändern sich dann auch die Konkurrenzverhältnisse.

Eine partielle Entfernung der Proteine auf der Oberfläche von *S. aureus* durch Proteinase K führte zu einer reduzierten Bindung von Fibrinogen und vWF an die Bakterien. Dadurch wurde gezeigt, dass Proteine, wie die schon zuvor diskutierten Adhäsine, zumindest zum Teil für die Bindung der untersuchten Adhäsionsglykoproteine an *S. aureus* verantwortlich sind.

#### 4.2 Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten

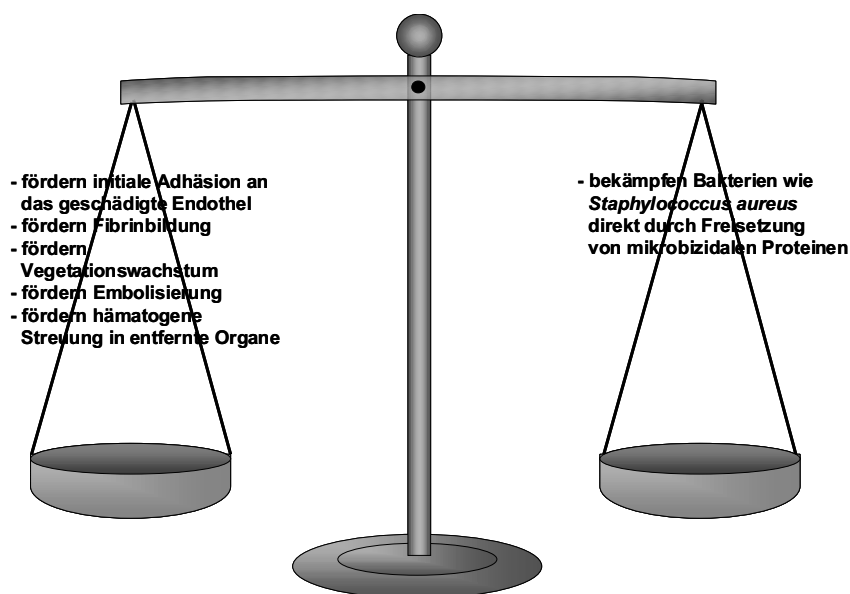
Die Rolle der Plättchen bei der Entwicklung von endovaskulären Infektionen kann von zwei Seiten betrachtet werden (Abb. 4.1). Sie fördern die Entwicklung einer Infektion und die Ausbreitung von *S. aureus* über das Blut, indem die Plättchen den Bakterien eine Oberfläche zur Anbindung bieten (Sullam, 1994). Dies wurde auch in einem Tierexperiment bestätigt, bei dem eine verringerte Plättchenbindung zu einer verringerten Virulenz in einem Endokarditis-Modell führte (Sullam *et al.* 1996). An der Oberfläche der Thrombozyten werden große Mengen Prothrombin in Thrombin umgewandelt („Zell-basiertes Modell der Koagulation“, (Bouchard und Tracy, 2001; Monroe *et al.* 2002; Roberts *et al.*, 2006)). Das Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin. Das Fibringerinnsel stabilisiert den Plättchenthrombus. Einerseits sind dadurch die Bakterien noch besser geschützt, die an Plättchen im Thrombus gebundenen sind, andererseits ist Fibrin auch ein weiteres mögliches Brückenmolekül für die Anbindung von *S. aureus* an Plättchen (s.u.). Durch Thrombin können auch noch weitere Plättchen aktiviert werden, die wiederum den Plättchenthrombus vergrößern, aber auch Bakterien binden können. Dadurch wird das Wachstum der Bakterienvegetation gefördert. Durch abgelöste und über die Blutbahn verschleppte Blutgerinnsel können Embolien entstehen und *S. aureus* kann hämatogen in entfernte Organe gestreut werden.

Thrombozyten haben aber auch eine Abwehrfunktion, da sie antimikrobielle Peptide („platelet microbicidal proteins“, PMP) freisetzen, welche die Bakterien abtöten können (Yeaman *et al.* 1998, Koo *et al.*, 1999). Einige Stämme haben gegen die PMP Resistenzen entwickelt. Bei einer vaskulären Infektion können die PMP-resistenten

## 4. Diskussion

---

Stämme die Abwehrfunktion der PMP umgehen und haben damit einen Überlebensvorteil gegenüber den PMP-sensitiven Stämmen; die PMP-resistenten Stämme können schneller eine infektiöse Endokarditis auslösen (Kupferwasser *et al.*, 2002). Bei Infektionen mit PMP-resistenten Stämmen überwiegt vermutlich die Rolle der Plättchen als Infektionsförderer. Aus dem Grunde könnten therapeutische Strategien Erfolg versprechend sein, die bei der Inhibierung der Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten ansetzen. Dafür sind aber genaue Kenntnisse der Mechanismen nötig, die der Adhäsion zu Grunde liegen. Deshalb wurden in dieser Arbeit Plättchen-abhängige Faktoren untersucht, die in die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation mit einbezogen sind.



**Abb. 4.1:** Die ambivalente Rolle der Thrombozyten bei einer Endokarditis

Durch Aktivierung werden die Thrombozyten verändert: ihre Form wandelt sich, Granulainhaltsstoffe wie ADP,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Serotonin, aber auch Fibrinogen, vWF und TSP-1 werden abgegeben, Glykoproteine wie P-Selektin (CD62P) oder Granulophysin (CD63) werden auf der Plättchenoberfläche exprimiert usw. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass *S. aureus* deutlich stärker an aktivierte Thrombozyten bindet, dabei war der Aktivator von großer Bedeutung: nur nach Thrombinaktivierung, und nicht nach ADP- oder TRAP-Aktivierung der Thrombozyten stieg die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Thrombin und den anderen Plättchenagonisten ist die Fähigkeit von Thrombin,

Fibrinogen zu Fibrin zu spalten. Aus dem Grunde wurde der Einfluss von Fibrinogen/Fibrin auf die Plättchen-*S. aureus*-Assoziation untersucht. Hier zeigte sich, dass nach Zusatz von 200 µg/ml Fibrinogen und Aktivierung durch Thrombin, also auch nach Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, die Anzahl an Bakterien-positiven Plättchen stark anstieg; es kam nahezu zu einer Verdreifachung der Assoziate im Vergleich zu der Assoziatbildung nach Thrombinaktivierung der Plättchen im PRP ohne Fibrinogenzusatz. Obwohl auch nach ADP-Aktivierung Fibrinogen an Thrombozyten bindet, und Fibrinogen auch an *S. aureus* binden kann, erfolgte nach Fibrinogenzusatz nur ein sehr geringer Anstieg der Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation. Um zu zeigen, dass wirklich Fibrin und nicht Fibrinogen für die Bindung von *S. aureus* an Plättchen von Bedeutung ist, wurde die Fibrinbildung von der Aktivierung der Thrombozyten getrennt untersucht. Dazu wurde das Enzym Ancrod verwendet, das Fibrinogen zu Fibrin spaltet, aber die Plättchen selber nicht aktiviert. Nach Aktivierung mit ADP und Fibrinbildung durch Ancrod kam es zu einer starken *S. aureus*-Plättchen-Assoziatbildung, und je mehr Fibrinogen zugesetzt wurde und deshalb auch je mehr Fibrin gebildet werden konnte, desto mehr Assoziate wurden gebildet. Gelfiltrierte Plättchen in einem HEPES-Puffer zeigten dagegen fast keine Assoziatbildung mit *S. aureus*, da in diesen Versuchsansätzen kein Fibrinogen vorlag, welches zu Fibrin gespalten werden konnte. Die Transglutaminase FXIII vernetzt monomeres Fibrin und stabilisiert dadurch das Gerinnsel. Der Zusatz von FXIII hatte keinen Einfluss auf die Bakterien-Plättchen-Assoziation. Dies zeigt, dass eine stabilisierende Vernetzung des Fibrins durch Faktor XIII nicht notwendig für den Prozess der Assoziatbildung ist. Es konnte also in dieser Arbeit die in der Literatur vertretende Meinung widerlegt werden, dass Fibrinogen der Hauptvermittler der *S. aureus* Adhäsion an Plättchen ist (Bayer *et al.*, 1995, O'Brien *et al.*, 2002).

Die Assoziation von Bakterien mit Plättchen führt zu der nächsten Stufe der Pathogenese, der Plättchenaggregation. Hierbei adhären Thrombozyten miteinander. Auch hier konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Bildung von löslichem Fibrin ein Schlüsselmechanismus ist, der es erlaubt, dass große Aggregate gebildet werden. Diese Ergebnisse scheinen zunächst widersprüchlich zu denen von O'Brien *et al.* (2002) zu sein, die auch die Aggregatbildung durch *S. aureus* untersucht haben. Sie konnten eine Aggregatbildung ohne weitere Zusätze wie z. B. Ancrod beobachten. Die Aggregatbildung erfolgte nach einer Verzögerungszeit von mehreren Minuten. Da *S. aureus* Plättchen aktivieren können und diese Aktivierung zu einer Thrombinbildung

führen kann (Arvand *et al.*, 1990; Fitzgerald *et al.*, 2006), ist es wichtig, bei der Untersuchung des Einflusses von Fibrin auf die Aggregatbildung die Thrombinwirkung zu unterbinden. In dieser Arbeit erfolgte dies durch den Thrombininhibitor Hirudin. Wurde PRP – statt gefilterten Plättchen plus Fibrinogenzusatz – ohne Zusatz von Hirudin verwendet, konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von O'Brien und Kollegen auch in dieser Arbeit eine Aggregatbildung festgestellt werden. Dies legt nahe, dass auch bei den Untersuchungen von O'Brien *et al.* Fibrin der Vermittler der Assoziation zwischen Plättchen und *S. aureus* war.

Eine der großen Unterschiede zwischen Fibrinogen und löslichem Fibrin ist, dass Fibrin in Lösung repetitive Bindungssequenzen für Liganden anbietet. Diese Sequenzen wirken wie ein Klettverschluss und erhöhen die Bindungsavidität, die zwischen zwei Proteinen wirkt. Der Unterschied zwischen der Bindung von *S. aureus* zu adhären Plättchen bzw. zu adhären Protein und der Bindung in Lösung ist, dass Immobilisation auch zu repetitiven Sequenzen führt. So kann *S. aureus* leicht an immobilisiertes Fibrinogen oder vWF binden (Herrmann *et al.*, 1993; Hartleib *et al.*, 2000).

Nicht alle Plasmaproteine fördern die Assoziatbildung von Plättchen mit *S. aureus*. So hat humanes Albumin keinen Einfluss auf die Assoziation.

Plättchen, denen sowohl die  $\alpha$ -Granula als auch die „dense-bodies“ fehlen, bilden nur wenig Assoziat mit *S. aureus*. Und auch Plättchen von Menschen mit einem „Gray-Platelet-Syndrom“, denen die  $\alpha$ -Granulainhaltstoffe fehlen, zeigen nur eine sehr geringe Assoziation mit *S. aureus*.  $\alpha$ -Granula Proteine sind also notwendig für die Anbindung von *S. aureus* an Plättchen (Niemann *et al.*, 2004). Die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten sind ein Hauptreservoir für gespeichertes TSP-1, und von dort wird es bei der Plättchenaktivierung freigesetzt. Es kann dann zurück an die Plättchen-Oberfläche binden und auch an immobilisiertes Fibrinogen oder an nicht vernetztes lösliches Fibrin (Tuszynski *et al.*, 1985). Das Gray-Platelet-Syndrom ist eine äußerst seltene Erkrankung. In Deutschland wurden bisher nur drei Patienten mit dieser Erkrankung gefunden, von denen ein Patient verstorben ist. Für weiterführende Untersuchungen konnte daher nicht auf Blut von Gray-Platelet Patienten zurück gegriffen werden. Daher wurden die Untersuchungen zur Rolle des TSP-1 mit Plättchen von gesunden Kontrollprobanden durchgeführt, die viel Thrombospondin gespeichert haben.

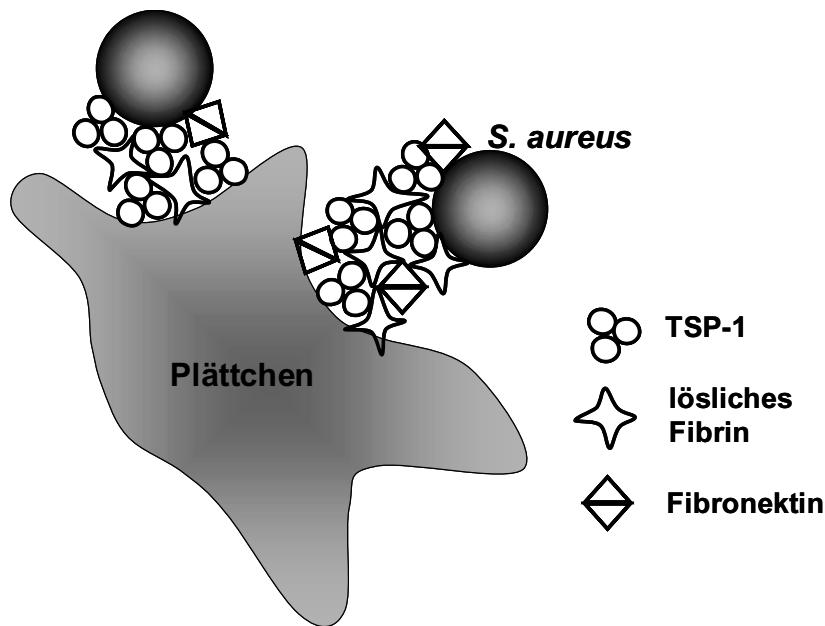
Wurde TSP-1 aktivierten Plättchen zugesetzt, bildeten sich mehr *S. aureus*-Plättchen-Assoziate als ohne TSP-1 Zusatz. Dies zeigt, dass TSP-1 das gesuchte assoziatbildungssteigernde Protein der  $\alpha$ -Granula sein könnte.

Der Anstieg der Assoziate durch TSP-1 war nicht sehr groß. Dies ist eventuell darauf zurückzuführen, dass bei der Plättchenaktivierung sehr viel TSP freigesetzt wird, und deshalb bei allen Versuchen, auch ohne exogen zugesetztes TSP-1, ein Einfluss von TSP vorhanden ist. Um die Rolle von TSP-1 genauer bestimmen zu können, müssten die Versuche noch einmal mit Blut von Gray-Platelet-Patienten wiederholt werden.

Ein weiteres Protein, das die Bindung von *S. aureus* an Plättchen fördern könnte, ist Fibronectin. Es kommt im Plasma vor (300  $\mu\text{g/ml}$ ), wird aber auch in den  $\alpha$ -Granula der Plättchen gespeichert und bei deren Aktivierung abgegeben. Fibronectin kann an das GPIIb/IIIa und an den Fibronectinrezeptor  $\alpha_5\beta_1$  anbinden. Außerdem kann es durch Faktor XIII mit Fibrin vernetzt werden. Auf der Bakterienseite ist bekannt, dass Fibronectin an die Fibronectinbindepoteine anbindet.

Nach Zusatz von Fibronectin zu Plättchen in PRP wurde auch nach Aktivierung der Plättchen die Assoziation mit *S. aureus* nicht gesteigert. Um zu prüfen, ob eventuell andere Plasmaproteine den Fibronectineinfluss maskieren, wurde der Versuch mit gelfiltrierten Plättchen wiederholt. Dabei wurde festgestellt, dass auch Fibronectin die Assoziationsrate von *S. aureus* mit Thrombozyten steigert.

Alle drei untersuchten Proteine können an *S. aureus*, an aktivierte Plättchen und sich gegenseitig binden. Zusammen können sie ein großes Bindungs-Cluster bilden, das die Adhäsion zwischen zwei Zellen vermittelt. Ein hypothetisches Modell zeigt die Abbildung 4.2



**Abb. 4.2 Hypothetisches Modell der Plättchen-*S. aureus*-Assoziat Bildung und der Plättchen/Plasmaproteine, die dazu beitragen.** Geringe Mengen Thrombin aktivieren die Plättchen und die Koagulation. TSP-1 wird von den  $\alpha$ -Granula der aktivierten Plättchen freigesetzt und bindet zurück an die Plättchen-Oberfläche, genauso wie an lösliches Fibrin, das durch Thrombin gebildet wird. Auch Fibronectin wird bei Thrombozytenaktivierung freigesetzt. Es kann an die Plättchen binden, aber auch an TSP-1 oder Fibrin. *S. aureus* kann alle drei Proteine binden. Auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen können die Proteine zusammen große Bindungs-Cluster bilden, die eine starke Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten ermöglichen.

In Tiermodellen konnte eine Therapie mit Aspirin das Vegetationsgewicht bei einer *S. aureus* Endokarditis senken. Zur Bestimmung des Vegetationsgewichtes wurde bei den Versuchstieren nach deren Tod die Vegetation, bestehend aus Plättchen, Fibrin und Bakterien, von der Gefäßwand entfernt und das Gewicht bestimmt. Auch eine Kombination von Aspirin und Ticlopidin zeigte Erfolge bei der Reduzierung der Gefäßwandvegetation der Aorta (Nicolau *et al.*, 1995; Nicolau *et al.*, 1999). Die Effekte waren signifikant, aber schwach. Beide Medikamente, Aspirin und Ticlopidin, haben einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchen-Sekretion, dieser ist aber nur sehr gering. Eine Kombination von direkten Thrombin-Hemmern und Antibiotika könnte eine effektivere Methode sein, um endovaskuläre Infektionen, die durch *S. aureus* verursacht werden, zu verhindern oder zu behandeln, da Thrombin-Hemmer gleichzeitig die



Bildung von Fibrin aus Fibrinogen und die Aktivierung von Plättchen, mit Sezernierung von TSP-1, unterbinden.

Die Adhäsinszusammensetzung auf der Bakterienoberfläche scheint nur einen geringen Einfluss auf die durch Fibrin und aktivierte Plättchen geförderte Anbindung von *S. aureus* an Plättchen zu haben. So bildete *S. aureus* Newman, dem die FnBPs auf der Oberfläche fehlen, nach Aktivierung mit ADP und Fibrinbildung durch Ancrod nur leicht weniger Assoziante mit Plättchen als *S. aureus* Cowan 1. Dies deutet darauf hin, dass ein Fehlen eines Adhäsins auf der *S. aureus* Oberfläche nur von geringer Bedeutung für die Bakterien-Plättchenassoziation ist, da eventuell der Einfluss der anderen Adhäsine die „Lücke“ beseitigt. Das gleiche gilt auch für eine unterschiedliche Expression der Adhäsine während der Bakterienwachstumsphase.

Bei Arbeiten mit PRP, das mit Puffer auf eine bestimmte Plättchenzahl eingestellt wurde, ist die Fibrinogenkonzentration geringer als die physiologische Fibrinogenkonzentration. Bei diesen geringeren Fibrinogenkonzentrationen bildeten die Bakterien aus der logarithmischen Wachstumsphase signifikant weniger Assoziante als die Plättchen aus der stationären Phase. Dies Ergebnis ist erstaunlich, da viele Adhäsine während der exponentiellen Phase des Bakterienwachstums exprimiert werden, aber zum Teil während der stationären Phase durch Proteasen wieder abgebaut werden. So ist ClfB nur während der frühen exponentiellen Phase auf *S. aureus* zu finden, aber nicht mehr in der späten exponentiellen Phase (Ni Eidhin *et al.*, 1998). Das könnte darauf hin deuten, dass die Adhäsine, die hauptsächlich in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert werden, von einer geringeren Bedeutung für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation sind.

#### **4.3 Die wichtigsten MSCRAMMs sind promiskuitiv und binden Fibrinogen, vWF, TSP-1 und Fibronectin**

Für die Interaktion von *S. aureus* mit Plättchen haben Oberflächenkomponenten von *S. aureus* eine wichtige Bedeutung. So ist bekannt, dass die Adhärenz über Proteine vermittelt wird, die zu der Familie der MSCRAMMs („microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“, also Oberflächenkomponenten von *S. aureus*, die adhäsive Matrixmoleküle erkennen) gehören. Zu den wichtigsten MSCRAMMs

gehören unter anderem die als Fibrinogen-bindende MSCRAMMs bekannten Clumping factor A (McDevitt *et al.*, 1992) und B (Eidhin *et al.* 1998). Isogene Mutanten, die nicht *clfA* und *clfB* exprimieren können, zeigen eine signifikant reduzierte Infektiosität im Vergleich zu komplementierten Stämmen (Moreillon *et al.*, 1995)). Lactokokken und auch *S. gordonii*, die *clfA* heterolog exprimieren, zeigen eine höhere Infektiosität als die Wildtypstämme (Stutzmann Meier *et al.*, 2001; Que *et al.*, 2005). Auch das Fibronectin binding protein A (FnBPA) hat eine Fibrinogen-bindende Domäne (Wann *et al.*, 2000), zusätzlich zu seiner Fähigkeit zur Fibronectin-Bindung. Die Fibrinogen-Anbindung an das Fibronectin binding protein B (FnBPB) ist in Bezug auf seine Fähigkeit, Fibrinogen zu binden, noch nicht untersucht worden. Die FnBPs vermitteln die Invasion von *S. aureus* in eine Vielzahl von Säugetierzellen (Sinha *et al.*, 1999; Dziwanoska *et al.*, 1999; Peacock *et al.*, 1999; Fowler *et al.*, 2000). Laktokokken, die *fnbA* heterolog exprimieren, erhöhen den bakteriellen Titer in Vegetation und Milz und dringen in anliegendes Endothel ein (Que *et al.*, 2005). Das MSCRAMM Protein A kann die Fc-Domäne von Immunglobulin G (IgG), Plättchen  $\text{gC1qR/p33}$  (Nguyen *et al.*, 2000) und vWF (Hartleib *et al.*, 2000) binden. Das „Extracellular adherence protein“ (Eap, früher Map genannt (Jonsson *et al.*, 1995)) und die Koagulase gehören nicht zu den MSCRAMMs, sind aber adhäsive Proteine, die von *S. aureus* sezerniert werden. Eap bindet an die Oberfläche von *S. aureus* zurück, und es konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, unterschiedliche Plasma-Proteine zu binden, wie die  $\alpha$ -Kette von Fibrinogen, Fibronectin und Prothrombin (Palma *et al.*, 1999). Staphylokoagulase kann Fibrinogen, vWF und Prothrombin binden (Boden und Flock, 1989; Bjerketorp *et al.*, 2004; Kawabata *et al.*, 1985).

Von FnBPA ist bekannt, dass es Fibronectin (Massey *et al.*, 2001), genauso wie Fibrinogen (Wann *et al.*, 2000) und Elastin (Roche *et al.*, 2004) binden kann. Walsh *et al.* (2004) haben Cytokeratin 10 als einen alternativen Liganden für ClfB zusätzlich zum Fibrinogen beschrieben. Unmarkiertes TSP-1 und rekombinanter vWF inhibieren die Bindung von TSP-1 zu *S. aureus* Cowan1 (Yanagisawa *et al.*, 2001), was vermuten lässt, dass der inhibitorische Effekt von rekombinanten vWF aus der Konkurrenz um den gleichen Oberflächenrezeptor resultiert. Palmqvist *et al.* (2004) haben gezeigt, dass ClfA auch unter einer verringerten Fibrinogenkonzentration die *S. aureus* Infektion vermittelt. Das deutet darauf hin, dass ClfA noch einen anderen Adhäsionsprotein-Liganden neben Fibrinogen hat. In dieser Arbeit sollte der Frage systematisch nachgegangen werden, ob die wichtigsten MSCRAMMs (ClfA, ClfB, FnBP, Protein A)

spezifisch nur mit einem Adhäsionsprotein reagieren, oder ob sie eher ein „promiskuitives“ Verhalten zeigen. Es wurde die Bindung der wichtigsten Adhäsionsproteine (Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin) an *S. aureus* MSCRAMM-Deletionsmutanten durchflusszytometrisch untersucht, um zu ermitteln, welche MSCRAMMs für welche Proteine als Adhäsine fungieren.

Zuerst wurde die Bindungsfähigkeit für Fibrinogen untersucht.

Nicola Spehr aus unserer Arbeitsgruppe (Spehr, 2001) hat gezeigt, dass lösliches Fibrinogen an *S. aureus* anbinden kann. In ihrer Dissertation wurde festgestellt, dass der Protein A arme *S. aureus* Stamm Wood 46 im Vergleich zu *S. aureus* Newman und Cowan 1 nur  $\frac{1}{4}$  des Fibrinogens gebunden hat. Bei weiteren Untersuchungen zu Protein A wurden Deletionsmutanten der Stämme Newman, Cowan 1 und 8325-4 verwendet. Für die Stämme Newman und 8325-4 standen außerdem die durch Einführung des Plasmids pSPA7235 komplementierten Mutanten zur Verfügung. Sämtliche Stämme wurden mit steigenden Konzentrationen Fibrinogen-FITC inkubiert und die Bindung im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Protein A-Deletionsmutanten eine deutliche Verringerung in der Fibrinogenbindung zeigten. Diese Verringerung war bei den komplementierten Mutanten wieder aufgehoben. Protein A ist also nicht nur ein vWF-bindendes Protein, sondern es bindet auch Fibrinogen.

Nicola Spehr (2001) konnte darüber hinaus zeigen, dass ClfA-knock out Mutanten im Gegensatz zu ihrem jeweiligen Wildtyp eine deutliche Verminderung der Bindungsfähigkeit für lösliches Fibrinogen aufwiesen, wobei deutliche Unterschiede zwischen den ClfA-knock out Mutanten von *S. aureus* Wildtypstamm Newman und 8325-4 bestanden. Bei der ClfA-Deletionsmutante vom Wildtyp *S. aureus* Newman war die Anbindung von Fibrinogenmolekülen bei niedrigen Fibrinogenkonzentrationen sehr gering, näherte sich aber mit Erhöhung der Fibrinogenkonzentration der Anzahl der an den Wildtyp gebundenen Fibrinogenmoleküle an. Bei *S. aureus* 8325-4 hingegen zeigte die Deletionsmutante eine durchgehend niedrigere Fibrinogenbindung als der Wildtyp. Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eine deutliche Verringerung der Fibrinogen-Bindung an eine ClfB-Deletionsmutante, und die Doppel-knock out-Mutante (*clfA*<sup>-</sup>/*clfB*<sup>-</sup>) zeigte eine noch geringere Fibrinogenbindung. Diese Ergebnisse sind zu erwarten

gewesen, da ClfA und B als Fibrinogen-bindende Proteine bekannt sind (McDevitt *et al.*, 1992; Eidhin *et al.* 1998).

Ob auch FnBPA und FnBPB Fibrinogen binden können, wurde mit Hilfe von *S. carnosus*-Stämmen untersucht, die die Gene *fnbA* und *fnbB* heterolog exprimieren. Während *S. carnosus* TM300 kaum Fibrinogen band, zeigten *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. carnosus* (pFNBB4) eine deutliche Fibrinogen-Bindung. Dabei war die Anbindung an *S. carnosus* (pFNBA4) stärker ausgeprägt. Dies ist eventuell auf den Unterschied in der Aminosäuresequenz der Fibrinogen-bindende A-Region von FnBPA und FnBPB zurückzuführen (Wann *et al.*, 2000), könnte aber auch an der Zahl der auf der Bakterienoberfläche zur Verfügung stehenden FnBPA, bzw. FnBPB Moleküle liegen, die mangels spezifischer Antikörper nicht quantifiziert werden konnte. Die Ergebnisse bestätigen, dass FnBPA und FnBPB nicht nur Fibronectin-, sondern auch Fibrinogen-bindende MSCRAMMs sind.

Als Adhäsionsproteine, die nicht zur Gruppe der MSCRAMMs gehören, wurden Eap und die Staphylokoagulase untersucht. Sie gehören zu den löslichen Adhäsinen, die im Gegensatz zu den MSCRAMMs keinen homologen Aufbau haben und die zu den SERAM („Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules“) zusammengefasst werden (Chavakis *et al.* 2005).

Bei der Überprüfung der Bindung von Fibrinogen an das Seram Eap konnte kein Unterschied zwischen der Eap-knock out Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Eap bindet also eventuell kein lösliches Fibrinogen oder die Bindefähigkeit wird durch MSCRAMMs maskiert.

Bei der Untersuchung von Staphylokoagulase-knock out Mutanten konnte durch Nicola Spehr (2001) ebenfalls keine signifikante Verringerung der Fibrinogenbindung festgestellt werden.

Nachdem gefunden wurde, dass Fibrinogen an *S. aureus* Stämme in geringerer Anzahl band, wenn eines der MSCRAMMs Protein A, ClfA oder ClfB fehlte, bzw. vermehrt an *S. carnosus* Stämme anband, die FnBPs exprimieren, wurde überprüft, ob die MSCRAMMs ein gleiches Verhalten für TSP-1 zeigen.

TSP-1 band in geringerer Zahl an Protein A-Deletionsmutanten als an die untersuchten Wildtypstämme. Eine Komplementierung der Mutante mit Protein A stellte die Bindefähigkeit für TSP-1 wieder her. Die Tatsache, dass bei *S. aureus* 8325-4 die TSP-1-Bindung der komplementierten Mutante höher war als der Wildtyp, ist vermutlich auf eine zum Vergleich zum Wildtyp erhöhte Expression an Protein A zurückzuführen. Diese Ergebnisse zeigen, dass Protein A auch ein TSP-1 bindendes Adhäsins ist.

Die Bindung von löslichem TSP-1 an die ClfA defiziente Mutante aus dem Wildtypstamm Newman war nur leicht verringert im Vergleich zu der TSP-1-Bindung an den Elternstamm. Die Bindung an die ClfA defiziente Mutante aus dem Wildtypstamm 8325-4 war dagegen deutlich verringert. Unterschiede in der TSP-1-Bindung an die beiden Mutanten sind eventuell auf den Einfluss anderer Adhäsine zurückzuführen. So könnte der Stamm Newman eine größere Anzahl an Adhäsinen, außer ClfA besitzen, die eine TSP-1 Bindung vermitteln und dadurch den Verlust von ClfA bei *S. aureus* Newman ausgleichen. TSP-1 band im Vergleich zum Elternstamm in geringerer Zahl an die ClfB defiziente Mutante und die ClfA/B defiziente Mutante aus *S. aureus* Newman, wobei es keine Unterschiede in der TSP-1-Bindung zwischen der ClfB und der ClfA/B-Doppelmutante gab. Auch dies deutet darauf hin, dass bei *S. aureus* Newman ein Verlust von ClfA durch andere Adhäsine in Bezug auf die TSP-1-Bindung ausgeglichen werden kann, ein Verlust von ClfB dagegen nicht. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass ClfA und ClfB die Bindung von TSP-1 an *S. aureus* vermitteln können.

Die Ergebnisse, dass Protein A, ClfA und ClfB TSP-1-bindende Adhäsine sind, wird durch Untersuchungen zur Anbindung von Protein A- bzw. Clf-Deletionsmutanten an immobilisiertes TSP-1 gestützt. Auch hier zeigten die Deletionsmutanten eine geringere Adhärenz an dem immobilisierten Protein im Vergleich zu den isogenen *S. aureus* Wildtypstämme (Niemann *et al.*, eingereicht).

Wie schon bei der Untersuchung der Bindung von Fibrinogen an *S. aureus* MSCRAMMs, so wurden auch bei der Untersuchung der TSP-1-Bindung an die FnBPs die *fnbA* und *fnbB* exprimierenden *S. carnosus* Stämme TM300 (pFNBA4) und TM300 (pFNBB4) verwendet.

Mit Hilfe des *fnbA* exprimierenden Stammes *S. carnosus* TM300 (pFNBA4) konnte eine Bindung von TSP-1 an FnBPA gezeigt werden. Der *fnbB* exprimierende *S. carnosus* Stamm konnte dagegen nicht besser TSP-1 binden als der Wildtyp. Dies ist eventuell

auf Unterschiede von FnBPA und FnBPB in ihrer A-Region zurückzuführen. Diese Annahme führt zu der Schlussfolgerung, dass TSP-1 an diese Region bindet. TSP-1 könnte auch bei FnBPA an die B-Region binden, die FnBPB fehlt. Der Unterschied könnte aber auch in einer verringerten FnBPB Expression liegen (s.o.)

Wie bei der Bindung von Fibrinogen an Eap und Staphylokoagulase konnte auch bei der Bindung von TSP-1 an die beiden SERAM kein Unterschied zwischen den defizienten Mutanten und den Elternstämmen beobachtet werden. Koagulase und Eap scheinen also keinen Einfluss auf die Bindung von TSP-1 an *S. aureus* zu haben oder ihre Bindefähigkeit wird z. B. durch MSCRAMMs maskiert.

Es wurde auch die Bindung von vWF an die MSCRAMMs Protein A, Clf A, ClfB, FnBPA und FnBPB untersucht.

Wie schon aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, ist Protein A ein vWF-bindendes Protein auf *S. aureus* (Hartleib *et al.*, 2000; Spehr, 2001). Bei den Untersuchungen zeigte der Protein A arme *S. aureus* Stamm Wood 46 eine verminderte vWF-FITC-Bindung. Protein A-Deletionsmutanten zeigten eine deutliche Verringerung der vWF-Bindung. Durch Komplementierung der Deletion konnte die vollständige Bindungsfähigkeit wieder hergestellt werden. Der Nachweis der Fähigkeit des Protein A, vWF zu binden, wurde von Hartleib *et al.* (2000) auch durch Anbindungsversuche von *S. aureus* an immobilisierten vWF erbracht. Protein A-Deletionsmutanten zeigten eine deutlich verringerte Adhärenz an dem immobilisierten Protein im Vergleich zu den isogenen *S. aureus* Wildtypstämmen

In dieser Arbeit konnte ClfA und ClfB auch als vWF-bindende Adhäsine festgestellt werden. VWF band in geringerer Zahl an die ClfA-defiziente Mutanten aus *S. aureus* 8325-4 als an den isogenen Wildtypstamm. Die Bindung von vWF an die ClfA-Mutanten aus *S. aureus* Newman war dagegen nicht vermindert. Hier zeigte sich also das gleiche Phänomen wie bei der TSP-1-Bindung an ClfA-Mutanten aus unterschiedlichen Wildtypstämmen. Auch hier ist eine unterschiedliche Adhäsinszusammensetzung und damit ein Ausgleich des ClfA-Verlustes eine mögliche Erklärung. Die Bindung von vWF an die ClfB- und die ClfA/B-Deletionsmutante war jeweils im Vergleich zum isogenen *S.*

*aureus* Wildtypstamm Newman verringert. Die Doppel-Deletionsmutante (*clfA*<sup>-</sup>/*clfB*<sup>-</sup>) band aber mehr vWF-Moleküle als die *ClfB*-Deletionsmutante. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das Fehlen von zwei Adhäsinen anderen Adhäsinen erlaubt, vWF vermehrt zu binden. Eine eventuelle sterische Konkurrenz könnte dafür der Grund sein. Das würde bedeuten, dass sich die Adhäsine untereinander beeinflussen können.

Auch die FnBPs wurden in dieser Arbeit als vWF-bindende Adhäsine erkannt. Für die Untersuchung der vWF-Bindefähigkeit der FnBPs wurden die *fnbA* und *fnbB* exprimierenden *S. carnosus* Stämme TM300 (pFNBA4) und TM300 (FNBB4) verwendet. VWF band an beide Stämme in einer höheren Zahl als an *S. carnosus* TM300, wobei *S. carnosus* TM300 (pFNBB4) weniger Protein band als *S. carnosus* TM300 (pFNBA4). Wie schon für die TSP-1-Bindung an die FnBPs diskutiert, sind mögliche Gründe dafür Unterschiede in der A-Region der beiden FnBPs, das Fehlen der B-Region bei FnBPB oder aber eine verringerte FnBPB Expression.

Bei der Untersuchung der Bindung von vWF an das Seram Eap gab es keine Unterschiede in der vWF-Bindefähigkeit zwischen der Eap-defizienten Mutante und dem isogenen Wildtypstamm. Eap scheint also keinen Einfluss auf die vWF-Bindung zu haben, oder der Eap-Verlust bei der Mutante wird durch die vWF-Bindefähigkeit der MSCRAMMs überdeckt.

Bei der Anbindung von vWF an Koagulase-Deletionsmutanten gab es große Unterschiede zwischen den untersuchten Stämmen. Während die Deletionsmutante aus Newman nur 1/6 der vWF-Moleküle im Vergleich zum Elternstamm band, gab es zwischen der Deletionsmutante aus 8325-4 und dem Elternstamm keine Unterschiede. Eine mögliche Erklärung dieses Ergebnisses ist die Besonderheit von *S. aureus* Newman, keine FnBPs auf der Bakterienoberfläche zu tragen. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, können FnBPs vWF binden. Wenn diese nun fehlen, fehlen vWF-Bindungsstellen, die eine eventuelle vWF-Bindung durch Koagulase maskieren oder sterisch behindern.

Als letztes Adhäsionsprotein wurde Fibronektin in Bezug auf seine Bindung an die *S. aureus* MSCRAMM-Mutanten bzw. *S. carnosus* Stämme, die die Gene *fnbA* und *fnbB* heterolog exprimieren, untersucht.

Die Protein A-Deletionsmutante und auch die mit Protein A komplementierte Mutante aus dem Elternstamm *S. aureus* Newman zeigten das gleiche Verhalten für Fibronectin wie für Fibrinogen, TSP-1 und vWF: Fibronectin band in geringerer Zahl an die Protein A-Deletionsmutante und eine Komplementierung stellte die Bindefähigkeit für Fibronectin wieder her. Auch die Bindung von Fibronectin an die Protein A-defiziente Mutante aus dem Stamm *S. aureus* Cowan 1 war verringert im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm. Protein A ist also auch ein Fibronectin-bindendes Protein.

ClfA und ClfB konnten auch als Fibronectin-bindende Proteine identifiziert werden: Die Bindung an die ClfA-Deletionsmutante aus dem *S. aureus* Stamm 8325-4 war deutlich vermindert im Vergleich zum Elternstamm. Dagegen unterschied sich die Bindung von Fibronectin an die ClfA-defiziente Mutante nicht von der Bindung an den isogenen Wildtypstamm *S. aureus* Newman. Dieses Verhalten der ClfA-Mutante aus *S. aureus* Newman wurde auch schon für die Anbindung von TSP-1 und vWF beobachtet und wurde dort auch schon diskutiert. Die Bindung von Fibronectin an die ClfB-Mutanten aus *S. aureus* Newman war deutlich verringert im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm, und die ClfA/B-Deletionsmutante zeigte eine noch weitere, wenn auch nicht signifikante, Verringerung der Fibronectin-Bindung im Vergleich zur ClfB-Deletionsmutante.

Bei der Untersuchung der Fibronectin-Bindung an *S. carnosus* Stämme, die die Gene *fnbA* und *fnbB* heterolog exprimieren, zeigte sich, dass FnBPA ausreicht, um eine ähnliche Fibronectin-Bindefähigkeit zu entwickeln wie *S. aureus* Cowan 1. Andere Adhäsine scheinen für die Fibronectinbindung eine untergeordnete Rolle zu spielen. Um wirkliche Aussagen zur Bedeutung des FnBPA im Vergleich zu den anderen MSCRAMMs für die Fibronectinbindung zu machen, müsste aber geprüft werden, in welcher Adhäsine-Anzahl FnBPA auf der Oberfläche von *S. carnosus* TM300 (pFNBA4) ist und wie hoch die FnBPA-Anzahl im Vergleich dazu und im Vergleich zu den anderen, auch Fibronectin-bindenden MSCRAMMs auf *S. aureus* Stämmen ist. Diese Quantifizierung der Adhäsine ist aber bisher noch nicht erfolgt.

Durch FnBPB wurde Fibronectin in einem geringeren Maße gebunden. Das ist entweder dadurch erklärbar, dass FnBPA durch die B-Region eine Fibronectin-



bindende Region mehr hat als FnBPB oder wiederum dadurch, dass *S. carnosus* TM300 (pFNBB4) FnBPB nur auf einem geringen Level exprimiert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die wichtigen MSCRAMMs Protein A, ClfA, ClfB, FnBPA und FnBPB promiskuitiv sind. Sie können alle mehrere Adhäsionsproteine des Wirtes, wie Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronektin binden. Außerdem kann ein Adhäsionsprotein an verschiedene MSCRAMMs binden (Tabelle 4.1)

	Fibrinogen	TSP-1	vWF	Fibronektin
Protein A	X	X	X	X
ClfA	X	X	X	X
ClfB	X	X	X	X
FnBPA	X	X	X	X
FnBPB	X		X	X

**Tabelle 4.1: Die untersuchten MSCRAMMs und die Adhäsionsproteine, die sie binden können**

Bei den untersuchten SERAM waren die Ergebnisse nicht so eindeutig. Zwar zeigte die untersuchte Eap-Deletionsmutante keine Verringerung der Protein-Bindung im Vergleich zum Wildtyp, und auch die Koagulase-Deletionsmutanten zeigte nur eine Verringerung der vWF-Anbindung, aber es besteht die Möglichkeit, dass ein eventueller Einfluss von Eap und Koagulase auf die Protein-Bindefähigkeit von *S. aureus* durch den Einfluss der anderen Adhäsine maskiert wird. Einen Aufschluss darauf könnten eventuell z. B. *S. carnosus* Stämme bringen, die Eap oder Koagulase heterolog exprimieren. Diese Stämme standen aber zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Die Hauptadhäsionsrezeptoren in eukaryotischen Zellen, die Integrine, sind promiskuitiv. Dies erlaubt die Anpassung der eukaryotischen Zelladhäsion an die jeweiligen Umstände. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die untersuchten MSCRAMMs in der Eigenschaft der Promiskuität den Integrinen ähnlich sind. Zudem wird die Interaktion von ClfA und dem  $\alpha_{1b}\beta_3$ -Integrin mit Fibrinogen durch Metallionen reguliert (O'Connell *et al.*, 1998), und beide erkennen eine ähnliche Stelle im Fibrinogenmolekül, den C-Terminus der  $\gamma$ -Kette. Deshalb kann ClfA auch die

Fibrinogen-abhängige Plättchenaggregation inhibieren (McDevitt *et al.*, 1997). Die Ergebnisse dieser Arbeit zu Grunde legend, könnte es auch sein, dass ClfA auch die scherkraftabhängige Adhäsion von Plättchen an vWF und die vWF vermittelte Plättchenaggregation inhibieren kann, genauso wie auch die  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -TSP-1-Interaktion vermittelten Abläufe. Dies sollte im Anschluss an diese Arbeit untersucht werden.

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen zeigen, dass die Pathophysiologie der *S. aureus* Adhäsion und Invasion sehr komplex ist, da das Adhäsionsprotein des Wirtes selber auch wieder an verschiedene Integrinrezeptoren auf der Wirtszelloberfläche binden kann. Außerdem müssten für ein genaueres Verständnis der Adhäsion und Invasion die Bindungsaffinitäten und die Konzentrationen der verschiedenen Adhäsionsproteine unter verschiedenen Umständen, z. B. bei Abwesenheit oder Anwesenheit von aktivierten Plättchen, mit berücksichtigt werden.

So wie es auch von den Integrinen bekannt ist (Frelinger *et al.*, 1991), können nach Bindung eines Liganden die Bindungseigenschaften der *S. aureus*-Adhäsine durch Konformationsänderung beeinflusst werden. Dieses Phänomen ist z. B. für die FnBPs beschrieben worden und wird als LIBS („ligand-induced binding site“) bezeichnet (Speziale *et al.*, 1996). Vor Bindung von Fibronectin liegen die D-Domänen als „random coil“ vor, bei Bindung lagern sie sich zu einer  $\beta$ -Faltblattstruktur um (House-Pompeo *et al.*, 1996). Durch die Konformationsänderung der Adhäsine könnte die Spezifität der MSCRAMMs verändert oder erweitert werden. Die unterschiedlichen MSCRAMMs könnten sich auch gegenseitig in ihrer Bindefähigkeit beeinflussen, durch Konkurrenz um freien Platz zur Bindung eines Proteins, aber eventuell auch durch Konformationsänderungen, wenn Proteine gebunden werden. Es könnte auch sein, dass die MSCRAMMs, je nach gebundenem Liganden unterschiedliche Funktionen haben. Weitere Studien sind nötig, um zu prüfen, ob die Anbindung von Adhäsionsproteinen an MSCRAMMs die Integrinbindungsstellen innerhalb der Adhäsionsproteine freilegt. Die Brückenbildung von FnBP zu dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  durch Fibronectin ermöglicht den Bakterien die Invasion in Endothelzellen (Sinha *et al.*, 1999). Auch eine Aktivierung von humanen Endothelzellen durch FnBPs ist möglich (Heying *et al.*, 2007). FnBPs vermitteln auch die Aktivierung von humanen Plättchen durch Fibrinogen- und Fibronectin-Brücken zu dem  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin (Fitzgerald *et al.*, 2006). Es ist wahrscheinlich, dass noch mehr Protein-Brücken zwischen MSCRAMMs Integrinsignalgebung oder Integrinclusterung auslösen.

Da MSCRAMMs nicht auf *S. aureus* beschränkt sind, könnten die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse auch für andere pathogene gram-positive Bakterien gelten.

#### 4.4 Die Bedeutung einiger MSCRAMMs für die Bakterien-Plättchen-Assoziation

Die Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten geschieht, wie gesehen, über Brückenmoleküle wie Fibrin, TSP-1 oder Fibronectin, bzw. Clusterbildung aus diesen (Kap. 4.2). Auf der Bakterienseite binden die Adhäsionsproteine an Adhäsine (Kap. 4.3). Um zu prüfen, welchen Einfluss MSCRAMMs auf die Bakterien-Plättchen-Assoziation haben, wurden in durchflusszytometrischen Untersuchungen der Prozentsatz an Bakterien-positiven Plättchen bestimmt, die sich mit MSCRAMM-Deletionsmutanten bildeten, im Vergleich zum Wildtyp.

Zunächst wurde die Bedeutung von Protein A für die Thrombozyten-*S. aureus*-Assoziation untersucht. Obwohl für Protein A eine direkte Interaktion mit Plättchen über Plättchen gC1qR/p33 beschrieben ist (Nguyen *et al.*, 2000) und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die für die Untersuchung zu Verfügung stehenden Protein A-defizienten Stämme in einem geringeren Maße dazu fähig waren, Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin zu binden als die isogenen Wildtypstämme, konnten bei der Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden. Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, ist weniger Fibrinogen als Fibrin für die Vermittlung der *S. aureus*-Plättchen Assoziation wichtig. Es könnte also sein, dass Protein A Fibrinogen, aber nicht Fibrin binden kann, und deshalb nicht zu der Bakterien-Plättchen-Assoziation beiträgt. Es ist aber auch denkbar, dass der fehlende Einfluss von Protein A bei den Untersuchungen mit einem Protein-defizienten Stamm durch andere Adhäsine maskiert wurde. Für weitere Untersuchungen der Bedeutung von Protein A für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation wäre daher die Verwendung von z. B. Protein A exprimierenden *S. carnosus*-Stämmen sinnvoll, wie es auch bei der Untersuchung der Bedeutung von FnBPA und FnBPB (s.u.) geschehen ist.

Die ClfA defiziente Mutante aus *S. aureus* Newman bildete nach Aktivierung mit Thrombin oder nach Aktivierung mit ADP und Fibrinbildung durch Ancrod signifikant weniger Assoziante als der isogene Wildtypstamm. Die Versuche mit ClfA-

Deletionsmutanten (Kap. 4.3) haben gezeigt, dass ClfA Fibrinogen, TSP-1, vWF und auch Fibronectin binden kann, aber die ClfA-Mutante aus dem Wildtypstamm Newman zeigte nur bei Fibrinogen eine signifikant geringere Bindung als der Wildtypstamm. Dies lässt vermuten, dass für der Assoziation von Plättchen mit dieser Mutante insbesondere der Verlust der Möglichkeit einer Brückenbildung durch Fibrinogen bzw. Fibrin von Bedeutung ist. Bei der Assoziatbildung mit der ClfA-Mutante war eine Restinteraktion von *S. aureus* zu Plättchen zu beobachten. Dies lässt darauf schließen, dass auch andere Adhäsine für die Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten von großer Bedeutung sind.

Die bedeutende Rolle von ClfA in der Pathogenese einer *S. aureus* Endokarditis konnte durch Moreillon *et al.* (1995) belegt werden. Sie haben in einem Ratten-Endokarditis-Modell der Endokarditis festgestellt, dass Clf defiziente *S. aureus* Mutanten 50 % weniger Endokarditis auslösten als die Elternstämme. Eine Komplementierung der Mutante mit einer Kopie des *clf*-Wildtypgens stellte die Infektiosität wieder her. Einer der ersten Schritte in der Entwicklung einer endovaskulären Infektion ist die Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten. Das Ergebnis, dass ClfA darin involviert ist, unterstützt die Ergebnisse der Bedeutung von ClfA für die Entstehung einer *S. aureus* Endokarditis.

Während die Anbindung von *S. aureus* Newman aus der log-Wachstumsphase an Plättchen verringert war, so zeigte die ClfA-Mutante keine Verringerung oder sogar einen Anstieg der Anbindung in der log-Phase. Dies deutet darauf hin, dass die MSCRAMMs sich in ihrer Wirkung gegenseitig beeinflussen oder vielleicht sogar behindern können. ClfB ist ein Adhäsion, das hauptsächlich während der Wachstumsphase auf *S. aureus* zu finden ist. Für dieses Adhäsion konnten ähnliche Bindungspartner wie für ClfA festgestellt werden. Es wäre eventuell möglich, dass ein Fehlen von ClfA zulässt, dass ClfB die Aufgabe von ClfA mit übernimmt.

Die ClfA-Deletionsmutante aus 8325-4 zeigte keine verringerte Anbindung an Plättchen im Vergleich zum Elternstamm. Während *S. aureus* Newman als Clf-reicher Stamm bekannt ist, hat der Stamm 8325-4 eine verringerte Expression von Clf. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Stamm 8325-4 eine Deletion in der  $\sigma^B$ -kontrollierenden Phosphatase *rsbU* hat. Dadurch ist die  $\sigma^B$ -Funktion stark reduziert (Kullik *et al.*, 1998;

Giaochino *et al.*, 2001) Da  $\sigma^B$  unter anderem *clfA* und *fnbA* reguliert (Entenza *et al.*, 2005), ist die Expression von ClfA in 8325-4 verringert. Deshalb führt vermutlich eine weitere Verringerung der ClfA-Adhäsine auf der *S. aureus* Oberfläche bei der ClfA-Mutante nicht zu einer verringerten Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten. Die beobachtete Anzahl an *S. aureus*-Plättchen-Assoziaten ist vermutlich auf nicht-ClfA-abhängige Interaktionsmechanismen zurückzuführen.

Die Untersuchungen zu der Bedeutung der FnBPs in der Pathogenese einer infektiösen Endokarditis sind widersprüchlich. In einem Rattenmodell der Katheder-induzierten infektiösen Endokarditis konnten Flock *et al.* (1996) keine Unterschiede in der Infektiosität von zwei isogenen *S. aureus* Stämmen feststellen, die sich in der Fibronectin-Bindung unterschieden (es wurden der Stamm 8325-4 und die isogene *fnbA/fnbB* Doppelmutante Stamm DU5883 verwandt). Die Autoren nehmen an, dass andere Interaktionen das Fehlen der FnBPs kompensieren. Que *et al.* (2001) hingegen konnten nach Expression des *fnbA*-Gens in *Lactococcus lactis* eine deutliche Infektiosität der *fnbA*-exprimierenden Laktokokken in einem Ratten-Endokarditis-Modell feststellen. Auch in den Untersuchungen der Bedeutung der FnBPs für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation in dieser Arbeit konnten keine Unterschiede zwischen FnBP-defizienten *S. aureus* Stämmen und den Wildtypstämmen gesehen werden. Für weitere Experimente wurden *S. carnosus* Stämme verwendet, in welchen die Gene, die FnBPA und FnBPB codieren, heterolog exprimiert werden. Diese Stämme hatten zuvor auch eine deutliche Bindung von Fibrinogen, vWF und Fibronectin, und im Falle von *S. carnosus* (pFNBA4) auch von TSP-1 gezeigt (Kap. 4.3). Im PRP zeigten *S. carnosus* (pFNBA4) und *S. carnosus* (pFNBB4) eine deutlich gesteigerte Adhärenz an aktivierte Plättchen im Vergleich zum Wildtyp. Wurde dem PRP noch 200  $\mu\text{g/ml}$  Fibrinogen zugesetzt, wurde die Assoziatbildung bei beiden FnBP exprimierenden Stämmen gesteigert. Auch wenn der Unterschied in der Assoziatbildung zwischen beiden Stämmen nicht signifikant war, so lag die Assoziatbildungskurve von *S. carnosus* (pFNBB4) deutlich unter der von *S. carnosus* (pFNBA4). Ein Fibronectinzusatz ließ nur die Assoziatzahl von *S. carnosus* (pFNBA4) mit den aktivierten Thrombozyten leicht ansteigen. Dieses Ergebnis ist mit Hinblick auf die Bindungsexperimente mit Fibrinogen und Fibronectin nicht verwunderlich. Auch hier hatte der Stamm *S. carnosus* (pFNBB4) im Vergleich zu *S. carnosus* (pFNBA4) eine verringerte Anbindung der untersuchten Proteine gezeigt. Davon ausgehend, dass Fibronectin und auch Fibrin eine Brücke

zwischen *S. aureus* und den Thrombozyten bilden, führt eine verringerte Anbindung von Proteinen auch zu einer verringerten Anbindung an Plättchen. Dass im PRP die Assoziatbildung im Fall von *S. carnosus* (pFNBB4) nicht weiter durch exogenes Fibronektin gesteigert werden konnte, könnte auf die schon bestehende Fibronektinkonzentration im Plasma zurückzuführen sein. Das Fibronektin aus dem Plasma könnte schon die Bindungsstellen im FnBPB abgedeckt haben. Die in dieser Arbeit gemachten Bindungsexperimente von Fibronektin an *S. carnosus* TM300 (FNBB4) (Kap. 4.3) unterstützen diese Annahme. Schon bei 10 µg/ml Fibronektin kam die Fibronektin-Bindungskurve in eine Sättigung, die Plasmakonzentration beträgt aber 300 µg/ml Fibronektin.

Wurden gelfiltrierte Plättchen verwandt und die Assoziatbildung unter exogenen Fibrinogen- bzw. Fibronektinzusatz untersucht, war der Unterschied zwischen den *fnbA* und *fnbB* exprimierende Stämmen nicht mehr signifikant. Beide Stämme bildeten unter Fibrinogenzusatz mehr Assoziat als *S. carnosus* TM300, aber sie bildeten deutlich weniger Assoziat als *S. aureus* Cowan 1. Da *S. aureus* Cowan 1 auch über andere Adhäsine als die FnBPs Fibrinogen binden kann (z. B. über ClfA, ClfB oder Protein A), ist es nicht verwunderlich, dass nicht die gleiche Assoziationsrate erreicht wurde. Die Assoziationsrate nach Fibronektinzusatz lag nicht so hoch wie nach Fibrinogenzusatz, war aber zwischen *S. aureus* Cowan 1 und *S. carnosus* TM300 (pFNBA4) nicht signifikant verschieden, und auch *S. carnosus* TM300 (pFNBB4) bildete nur leicht weniger Assoziat mit den gelfiltrierten aktivierten Plättchen. Das deutet darauf hin, dass die FnBPs bei der Fibronektin vermittelten Assoziatbildung eine wichtige Aufgabe haben.

Es wurde auch die Fähigkeit der FnBPs untersucht, die Plättchenaggregation auszulösen. Hierbei gab es das erstaunliche Ergebnis, dass *S. carnosus* (pFNBA4) die Plättchenaggregation im PRP genauso auslösen kann wie *S. aureus* Cowan 1, *S. carnosus* (pFNBB4) dazu aber nicht in der Lage ist, genauso wenig wie *S. carnosus* TM300. Dieser Unterschied könnte auf die geringe Ähnlichkeit in der A-Domäne bei FnBPA und FnBPB zurückzuführen sein. Dadurch könnte es sein, dass FnBPA an einen bisher unbekanntem Plättchenrezeptor binden kann, der die Plättchenaggregation induzieren kann. FnBPB könnte nach dieser Hypothese nicht an den Rezeptor binden und deshalb die Aggregation nicht auslösen (Heilmann *et al.*, 2004). In einer neuen Arbeit konnten Fitzgerald *et al.* (2006) aber mit *Lactococcus lactis*, die *fnbA* bzw. *fnbB*

exprimieren, zeigen, dass beide FnBPs die Aggregation auslösen können, wobei der *fnbB* exprimierende Stamm die Plättchenaggregation nach einer längeren Verzögerungszeit auslöste als der *fnbA* exprimierende Stamm. Die Autoren vermuten, dass FnBPA als proaggregatorischer Faktor wirksamer ist als FnBPB, oder aber die Expression von FnBPB geringer als die von FnBPA war. Die in dieser Arbeit gemachten Ergebnisse könnten auch auf eine geringere Expression von FnBPB bei dem verwendeten Stamm zurückzuführen sein, so dass eventuell ein Schwellenwert nicht erreicht wurde, der nötig ist, um die Aggregation auszulösen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die FnBPs eine Bedeutung für die ersten Schritte in der Pathogenese einer infektiösen Endokarditis haben können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass für die ersten Schritte in der Pathogenese einer endovaskulären Infektion mehrere Adhäsine von Bedeutung sind. Da tierexperimentelle Studien gezeigt haben, dass z. B. CifA-defiziente Stämme weniger infektiös waren als der Wildtypstamm (Moreillon *et al.*, 1995), aber Studien mit *S. aureus* FnBP-Deletionsmutanten so einen Einfluss von FnBP nicht zeigen konnten (Flock *et al.*, 1996), ist zu vermuten, dass die Bedeutung der Adhäsine für die Entwicklung einer Endokarditis unterschiedlich gewichtet ist.

#### **4.5 Die Assoziation von Plättchen mit *Streptococcus pneumoniae***

*Streptococcus pneumoniae* ist ein Kommensale in gesunden Menschen, kann aber auch als humanpathogener Erreger Infektionen wie Otitis Media, Pneumonie oder Meningitis auslösen. So kann *S. pneumoniae* symptomlos den respiratorischen Trakt des Menschen besiedeln, aber vom Nasenrachenraum auch in die Lunge gelangen und den septischen Infektionsprozess auslösen.

Die Interaktion von *S. pneumoniae* mit Plättchen ist bisher gering untersucht. So ist hauptsächlich bekannt, dass *S. pneumoniae* Einfluss auf die Blutgerinnung hat und Plättchen in der Anwesenheit von Pneumokokken aggregieren (Guckian *et al.*, 1975). Für andere Streptokokken-Arten gibt es dagegen mehr Untersuchungen. So ist z. B. für *Streptococcus agalactiae* beschrieben, dass dieser Stamm ein Fibrinogen-bindendes Protein besitzt, welches die Plättchen-Aggregation vermutlich vermittelt. Dieses Protein zeigt viele Ähnlichkeiten zu den Oberflächenadhäsinen von anderen gram-positiven

Bakterien, wie ein LPXTG-Motiv, eine hydrophobe Transmembransequenz und einen intrazytoplasmatischen C-Terminus. Fibrinogen bindet an dieses Protein und auf der Plättchenseite vermutlich an GPIIb/IIIa (Pietrocola *et al.*, 2005). Früher war *Streptococcus sanguis* die häufigste Ursache für die infektiöse Endokarditis, bevor *S. aureus* diese „Rolle“ übernahm. *S. sanguis* kann direkt an Plättchen anbinden und diese aktivieren. Die Anbindung erfolgt an das GPIb (Plummer *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob *S. pneumoniae* an Plättchen binden kann, und ob dieser Anbindung ähnliche Mechanismen unterliegen wie der Anbindung von *S. aureus* an Plättchen. Es konnte gezeigt werden, dass ohne Aktivierung der Plättchen und ohne Fibrinbildung nahezu keine *S. pneumoniae*-Plättchen-Assoziate gebildet wurden. Nach Plättchenaktivierung und nach Fibrinbildung bildeten sich bei dem unbekapselten Stamm *S. pneumoniae* P37 Assoziate. Und nach Zusatz von 200 µg/ml exogenem Fibrinogens, das durch Thrombin zu Fibrin gespalten wurde, bildete auch der leicht bekapselte Stamm *S. pneumoniae* P51 Assoziate mit Plättchen. Auch der Zusatz von exogenem TSP-1 konnte nach Thrombinaktivierung die Assoziatzahl bei beiden Stämmen steigern. Ein synergistischer Effekt von TSP-1 und Fibrinogen-Zusatz war nur bei dem unbekapselten Stamm P37 zu sehen. Anstelle von Thrombin wurde die Assoziation von *S. pneumoniae* mit Plättchen auch nach ADP-Aktivierung der Plättchen und Fibrinogen-Spaltung durch Ancrod untersucht. Erst nach Aktivierung der Plättchen und der Fibrinbildung stieg die Zahl der Bakterien-positiven Plättchen. Wie bei der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation konnte so auch bei der *S. pneumoniae*-Thrombozyten-Assoziation der Nachweis erbracht werden, dass nicht Fibrinogen sondern Fibrin der Vermittler der Bindung von Pneumokokken an Plättchen ist. Eine Interaktion zwischen Pneumokokken und Plättchen konnte bei dem stark bekapselten Stamm D39 nicht gefunden werden. Das bedeutet, dass die Polysaccharidkapsel die Anbindung von Pneumokokken an Plättchen verhindert. Als hauptsächlicher Virulenzfaktor für *S. pneumoniae* wird die Bildung einer Kapsel angesehen. Diese Kapsel verhindert weitestgehend die Phagozytose; kapsellose Stämme werden hingegen durch Phagozyten schnell abgetötet. Von *S. aureus* ist bekannt, dass eine Bindung von *S. aureus* an Plättchen zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen kann, und es dadurch zu einer Freisetzung antibakterieller Substanzen (PMPs) kommt (Yeaman *et al.*, 1997). Auch bei der Bindung der Pneumokokken an Plättchen könnten PMPs freigesetzt werden, durch die die Pneumokokken abgetötet werden. Das könnte



auch eine Ursache dafür sein, dass unbekapselte Stämme nicht virulent werden im Gegensatz zu bekapselten Stämmen, die keine Freisetzung der PMPs auslösen.

In dieser Arbeit wurden zwei sehr unterschiedliche Bakteriengattungen innerhalb der gram-positiven Bakterien gefunden, *S. aureus* und *S. pneumoniae*, deren Interaktion mit Thrombozyten der gleiche Mechanismus unterliegt: Assoziation mit aktivierten Plättchen und nach Fibrinbildung, TSP-1 hat auch eine Assoziat-vermittelnde Funktion. Dieser Mechanismus der Bakterien-Plättchen-Assoziation könnte auch für die Interaktion von anderen gram-positiven Bakterien mit ihrem Wirt generell von Bedeutung sein.

#### **4.6 Syndecan-1 und Sydecan-4 sind Vermittler der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation**

Syndecane sind omnipräsente Komponenten der Plasmamembran von Zellen. Es sind Transmembranproteine. Sie besitzen eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine einfach durchspannende transmembrane Domäne und eine extrazelluläre Domäne mit einem Anbindungsort für drei bis fünf Heparansulfat- oder Chondroitinsulfat-Ketten. Die Heparansulfat-Kette ermöglicht die Interaktion mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen. Auch eine Bindung von TSP-1 an Syndecane ist bekannt (Naganuma *et al.*, 2004). Wie in dieser Arbeit und von Niemann *et al.* (2004) beschrieben, hat TSP-1 eine wichtige Bedeutung für die Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen. Außerdem ist bekannt, dass *S. aureus* auch direkt Heparansulfat binden kann (Liang *et al.*, 1992). Es konnte auch eine Interaktion zwischen *S. aureus* und intestinalen Epithelium festgestellt werden, die von Heparansulfat-Proteoglykanen vermittelt wird. Insbesondere wurde dabei die Rolle des Heparansulfat-Proteoglykans Syndecan-1 hervorgehoben (Hess *et al.*, 2006). Um zu prüfen, ob Syndecane, die auch auf aktivierten Thrombozyten vorkommen, eine Rolle in der *S. aureus*-Plättchen-Interaktion spielen, wurden die Plättchen von Syndecan-1 und Syndecan-4 knock out Mäusen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass die Assoziation von *S. aureus* mit Syndecan-1 und auch mit Syndecan-4 defizienten Plättchen verringert war im Vergleich zu der Assoziation von *S. aureus* mit den Plättchen von Wildtyp-Mäusen. Syndecane vermitteln also die Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten. Die Anbindung von *S. aureus* an die Syndecane könnte entweder über TSP-1 erfolgen oder aber direkt über ein Heparansulfat bindendes Oberflächenprotein von *S. aureus* (Liang *et al.*, 1995), oder über beide Wege.

Die Assoziationsrate zwischen Syndecan-defizienten Thrombozyten und *S. aureus* war bei den Versuchen mit dem *S. aureus* Stamm Cowan 1 nicht so stark erniedrigt wie bei den Versuchen mit *S. aureus* Newman. Die Ursache hierfür könnte in der unterschiedlichen Adhäsinszusammensetzung auf der Oberfläche von *S. aureus* zu finden sein. So könnte es z. B. sein, dass *S. aureus* Cowan 1 nicht die Fähigkeit hat, Heparansulfat direkt zu binden und die Anbindung von diesem *S. aureus* Stamm an die Thrombozyten verläuft über andere Wege. Dann würde ein Fehlen der Syndecane nicht so stark ins Gewicht fallen, wie bei einem *S. aureus* Stamm, der direkt an die Heparansulfate binden kann.

Die Versuche zu der Bedeutung der Syndecane für die Anbindung von *S. aureus* an Thrombozyten in dieser Arbeit sind noch sehr vorläufig. Um bessere Aussagen zu Gründen für die Unterschiede zwischen den beiden untersuchten *S. aureus* Stämmen zu machen, wären noch weitere Experimente nötig, z. B. mit anderen *S. aureus* Wildtypstämmen und auch mit MSCRAMM-defizienten Stämmen. Auch der Versuch der Inhibierung einer Heparansulfat-Bindung auf der *S. aureus* Seite, z. B. mit Heparin, könnte Aufschlüsse auf den Syndecan-vermittelten Mechanismus der Interaktion von *S. aureus* mit Plättchen geben.

### **4.7 Beeinflussung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* durch Antikörper gegen Staphylokinase**

Staphylokokken binden nicht nur an Thrombozyten, sondern *S. aureus* ist auch in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren und die Sekretion der Granulainhaltsstoffe herbeizuführen. Dadurch können weitere Thrombozyten aktiviert werden, die wiederum nun *S. aureus* besser binden können als nichtaktivierte Plättchen. Deshalb führt die Aktivierung von Thrombozyten durch *S. aureus* zu einer Verstärkung des Pathomechanismus endovaskulärer Infektionen. Wie in der Dissertation von Nicola Spehr aus unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde, lassen sich aber nicht die Blutplättchen von allen Blutspendern durch *S. aureus* aktivieren (Spehr, 2001). Die Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* erwies sich als personenspezifisches Merkmal. Blockierungsexperimente mit einem den FcRIIA-Rezeptor inhibierenden Antikörperfragment zeigten, dass die Plättchenaktivierung über diesen IgG Rezeptor vermittelt wird. Dieser Rezeptor wird über ein einzelnes Gen kodiert. Durch eine Punktmutation an Position 131 kommt es zum Austausch der Aminosäuren Arginin durch Histidin, was zum Entstehen der drei Genotypen FcRIIA-Arg/Arg, FcRIIA-His/His

und FcR1IA-Arg/His führt. Personen, deren Plättchen sich durch *S. aureus* aktivieren ließen, wiesen fast alle den Genotyp FcR1IA-His/His131 auf. Der His/His-Genotyp hat eine hohe Bindefähigkeit für humanes IgG2 und IgG3, im Gegensatz zu dem Arg/Arg-Genotyp (Warmerdam *et al.*, 1991; Parren *et al.*, 1992). Es wäre möglich, dass der Kontakt des Organismus mit *S. aureus* zu der Bildung von Antikörpern führt. *S. aureus* könnte nun über die Bindung dieser Immunglobuline an den FcR1IA-Rezeptor der Plättchen anbinden und diese aktivieren, wobei die Bindung aufgrund der hohen Affinität zu Immunglobulinen bei Personen mit His/His-Genotyp verstärkt auftreten würde. Bei der Entstehung der Heparin-induzierten-Thrombozytopenie (HIT) ist ein vergleichbarer Vorgang bekannt. Dabei kommt es nach Anwendung von Heparin zur Bildung heparin-induzierter IgG. Diese bilden mit Heparin und Plättchenfaktor 4 einen Komplex. Über die Bindung dieses Komplexes an den FcR1IA-Rezeptor kommt es zu der Aktivierung der Plättchen (Greinacher *et al.*, 1994; Kelton *et al.*, 1994). 2005 haben Loughman *et al.* ein Modell vorgestellt, in dem spezifisch gegen die C1fA A-Domäne gerichtete Antikörper an den FcR1IA-Rezeptor der Plättchen binden und außerdem Fibrinogen eine Brücke zwischen C1fA von *S. aureus* und dem GPIIb/IIIa der Plättchen bildet. Diese Interaktionen führen zu einer Signalkaskade, die zu der Aktivierung der Plättchen führt. Als weiteres haben Fitzgerald *et al.* (2006) ein Modell der Thrombozytenaktivierung durch *S. aureus* entwickelt, bei dem Fibronectin und Fibrinogen eine Brücke zwischen *S. aureus* FnBP und Plättchen GPIIb/IIIa bilden und außerdem Antikörper gegen FnBPs an den FcR1IA-Rezeptor binden. Auch diese Vorgänge führen zu einer Aktivierung der Plättchen. Beide Modelle setzen eine Beteiligung von GPIIb/IIIa voraus. Wie Spehr (2001) zeigen konnte, sind aber auch GPIIb/IIIa defiziente Plättchen durch *S. aureus* aktivierbar, so dass es auch Wege der Plättchenaktivierung ohne Beteiligung des GPIIb/IIIa geben muss.

Während Streptokinase die Plättchenaggregation auslösen kann, ist Staphylokinase (SAK) alleine nicht dazu in der Lage (Abdelouahed *et al.*, 1997). Es ist bekannt, dass in der Aktivierung der Plättchen durch Streptokinase die Anbindung von Antistreptokinase-Antikörpern an den FcR1II-Rezeptor involviert ist (Lebrazi *et al.*, 1995). Von McRedmond *et al.* (2000) wurde überlegt, dass Streptokinase und Streptokinase-Antikörper einen Komplex bilden, der an den FcR1IIa-Rezeptor bindet, und damit die Aktivierung der Plättchen auf ähnlichen Abläufen beruht wie bei der Entstehung einer HIT. Dieser Mechanismus der Aktivierung ist eventuell auf Staphylokinase zu übertragen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Antikörper gegen SAK einen Einfluss auf die

Aktivierbarkeit von Plättchen durch *S. aureus* haben. Dazu wurden Kaninchen mit SAK immunisiert und geprüft, ob sich die Kaninchenplättchen nach Antikörperbildung gegen SAK besser aktivieren lassen als vor SAK-Behandlung der Tiere. Dazu wurde den Kaninchen direkt vor und eine Woche nach „boostern“ mit SAK Blut entnommen, die Thrombozyten mit *S. aureus* inkubiert, und eine eventuelle Veränderung der Aktivierbarkeit der Thrombozyten durch *S. aureus* mit Hilfe eines PE-markierten Antikörpers gegen CD62P durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass zumindest die Plättchen von einem Kaninchen nach SAK-Gabe aktivierbar waren. Das andere Kaninchen reagierte dagegen nicht mit Aktivierbarkeit der Thrombozyten auf den Antikörperkonzentrationsanstieg. Die aktivierten Plättchen zeigten im Vergleich zu ADP-aktivierten Plättchen nur eine geringe Aktivierung. Da sich die Plättchen von Kaninchen 2 nach Immunisierung mit SAK aktivieren ließen, kann vermutet werden, dass SAK-Antikörper zusammen mit SAK eventuell an den FcR2-Rezeptor binden und zusammen mit *S. aureus* eine Aktivierung der Plättchen bewirken. Da nach Aktivierung von Plättchen mikrobizidale Substanzen abgegeben werden könnte eine vorherige Immunisierung mit Staphylokinase dazu führen, dass der Körper die antimikrobielle Wirkung der Thrombozyten verstärkt nutzen kann.

### 4.8 Die Bindung von *S. aureus* an Endothelzellen (HMEC-1)

*S. aureus* kann besser endovaskuläres Gewebe besiedeln und in dieses einwandern als andere Bakterienarten (Ogawa *et al.*, 1985). Innerhalb der Endothelzellen können die Bakterien geschützt vor dem Immunsystem des Wirtes und Antibiotika persistieren und sich vermehren. Für die Anbindung und die Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen *in vitro* wurden schon einige Mechanismen beschrieben. So kann *S. aureus* über eine Fibronektin-Brücke zwischen *S. aureus* FnBP und dem Integrin  $\alpha_5\beta_1$  anbinden. *S. aureus* wird dann vollständig internalisiert. Dieser Prozess wird durch F-Aktin-Neuanordnung angetrieben (Sinha und Herrmann, 2005).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Fibrinogen, Fibrin, TSP-1 und Plättchen auf die Anbindung bzw. die Invasion von *S. aureus* an bzw. in Endothelzellen untersucht. Es wurde dazu eine Methode verwandt, die die Verfolgung der Bindung und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie erlaubte. Dafür wurden die in „24-well“-Platten wachsenden HMEC-1 mit FITC-markierten *S. aureus* koinkubiert und, nach Entfernen der nichtgebundenen Bakterien durch Waschen der

Zellen, mit Hilfe von Accutase abgelöst. Eine Bestimmung der Endothelzellen mit nur invadierten Bakterien konnte durch eine vorherige Behandlung der Endothelzellen mit Lysostaphin erfolgen. Lysostaphin lysierte die extrazellulären Bakterien. Die bakterien-positiven Endothelzellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

Es konnte in dieser Dissertation die Arbeit von anderen Autoren (Sinha *et al.*, 1999) bestätigt werden, dass die *S. aureus* Adhärenz und Invasion dosis-abhängig ist, d.h. mit steigendem *S. aureus*-Endothelzellverhältnis stieg auch die Anzahl der Bakterien-positiven Endothelzellen. Es zeigte sich dabei, dass *S. aureus* Cowan 1 viel stärker adhären und invasiv war als *S. aureus* Newman. Dies kann damit begründet werden, dass bei *S. aureus* Newman die für die Internalisierung wichtigen FnBPs nicht auf der Bakterienoberfläche verankert werden können und daher nicht als Adhäsine und Invasine dienen können (Grundmeier *et al.*, 2004). Trotz der fehlenden FnBPs bei *S. aureus* Newman konnte ein dosis-abhängiger Anstieg der Bakterien-positiven Endothelzellen gemessen werden. Die FnBPs sind also wichtig für die Invasion von Endothelzellen, aber es gibt noch andere Mechanismen. Da der Stamm *S. carnosus*, der keine Adhäsine aufweist, nahezu gar nicht an Endothelzellen anband, ist es sehr wahrscheinlich, dass weitere Adhäsine dabei von Bedeutung sind. So konnte gezeigt werden, dass an die Bakterienoberfläche zurückgebundenes Eap die Internalisierung von *S. aureus* in Fibroblasten und Epithelzellen fördert (Haggar *et al.*, 2003), und es ist gut möglich, dass Eap auch die Internalisierung von *S. aureus* in Endothelzellen vermittelt.

Die deutlichen Unterschiede in der Adhärenz und auch in der Invasion zwischen *S. aureus* Newman und *S. aureus* Cowan 1 konnten in dieser Arbeit auch mit einer fluoreszenzmikroskopischen Methode deutlich gezeigt werden.

Es wurde auch die Zeitabhängigkeit der Adhärenz und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen untersucht. Dazu wurden die Endothelzellen 0-150 min mit *S. aureus* Cowan 1 inkubiert. Die Anzahl der Bakterien-positiven Endothelzellen erreichte bei Betrachtung der adhären und invasiven Zellen nach 60 min nahezu eine Sättigung. Die Anzahl an Bakterien-positiven HMEC-1 mit intrazellulären *S. aureus* war nach einstündiger Inkubationszeit nicht mehr signifikant verschieden von der Anzahl der Bakterien-positiven HMEC-1 mit adhären und invasiven *S. aureus*, so dass davon ausgegangen werden kann, dass nahezu alle Bakterien invasiv waren. Mit diesen Ergebnissen wurden die Ergebnisse von Sinha *et al.* (1999) bestätigt, die auch eine

Zeitabhängigkeit der Adhärenz und Invasion festgestellt hatten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnten Sinha und Kollegen bei lebenden Bakterien auch nach zweistündiger Inkubationszeit noch eine deutliche Steigerung der invasiven *S. aureus* feststellen. Die Unterschiede könnten einerseits auf unterschiedliche Endothelzellen zurückzuführen sein („293-Zellen“ bei den Versuchen von Sinha *et al.*, HMEC-1 in den Versuchen dieser Arbeit), andererseits wurden die Endothelzellen von Sinha *et al.* vor dem eigentlichen Versuchsbeginn auf 4°C für 4 h gekühlt, um den schon zugefügten Bakterien zu ermöglichen, auf die Endothelzellschicht zu sedimentieren. Auch das gewählte Verhältnis von Bakterien zu Endothelzellen war deutlich höher in dieser Arbeit (15 Bakterien pro Endothelzelle im Vergleich zu 250 *S. aureus* pro Endothelzelle). Vermutlich ist der letztgenannte Unterschied von ausschlaggebender Bedeutung für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der von Sinha *et al.*

Für die Assoziation von *S. aureus* mit Plättchen konnten in dieser Arbeit die besondere Bedeutung von Fibrin herausgestellt werden. Um zu prüfen, ob Fibrin oder Fibrinogen auch für die Adhäsion von *S. aureus* an/in Endothelzellen von Bedeutung ist, wurden die Endothelzellen mit Fibrinogen bzw. Fibrinogen und Ancrod für 30 min vorinkubiert und anschließend dann für weitere 60 min zusätzlich *mit S. aureus* Newman oder *S. aureus* Cowan 1 koinkubiert. Durch Fibrinogen oder Fibrin konnten bei beiden Stämmen keine Veränderung der Adhärenz oder Invasion von *S. aureus* festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zu der Arbeit von Shenkman *et al.* (2000), in der davon berichtet wird, dass Fibrinogen die Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen vermittelt. Es wurden aber bei Shenkman *et al.* die Endothelzellen zuvor mit Thrombin aktiviert. In den Versuchen dieser Arbeit geschah dieses nicht, aber eine leichte Aktivierung durch Waschschriffe ist nicht auszuschließen. Außerdem waren die Fibrinogenkonzentrationen bei Shenkman *et al.* viel höher gewählt, wobei sie aber schon einen Anstieg der Adhärenz bei 250 µg/ml Fibrinogen sahen, einer ähnlichen Konzentration, die auch in den Versuchen dieser Arbeit gewählt wurde. Es wäre aber auch möglich, dass durch unterschiedliche Endothelzellen (HUVECs bei Shenkman *et al.*, HMEC-1 in dieser Arbeit) oder durch unterschiedliche *S. aureus* Stämme (*S. aureus* ATCC 29213 bei Shenkman *et al.*, *S. aureus* Cowan 1 und *S. aureus* Newman in dieser Studie) Unterschiede in dem Einfluss von Fibrinogen entstehen.

Bei der Plättchen-*S. aureus*-Assoziation konnten durch TSP-1-Zusatz eine Steigerung der Assoziationszahl erzielt werden. Es sollte auch der Einfluss von TSP-1 auf die Anbindung und der Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen geprüft werden. Durch TSP-1 wurde die Adhärenz und die Invasion von *S. aureus* Cowan 1 nicht gesteigert, bei dem schlecht an Endothelzellen bindenden und adhärenzstarken Stamm *S. aureus* Newman wurde dagegen die Adhärenz gesteigert, nicht aber die Invasion. Dies konnte zusätzlich auch durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen belegt werden. In einer Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zusammen mit der Arbeitsgruppe von Sven Hammerschmidt, Würzburg, konnte gezeigt werden, dass wirtsgebundenes TSP-1 die Anbindung von *Streptococcus pneumoniae* und auch andere gram-positive Bakterien, wie *S. pyogenes* und auch *S. aureus* an humane Endothel- und Epithelzelllinien vermittelt. Dabei erfüllt Peptidoglykan auf der Bakterienoberfläche die Rolle des Adhäsins und TSP-1 bildet die Brücke zwischen den gram-positiven Bakterien und der Wirtszelle (Rennemeier *et al.*, 2007).

*S. aureus* bindet bei einer endovaskulären Infektion an Thrombozyten. Um zu prüfen, ob die Plättchen auch die Adhäsion oder die Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen begünstigen, wurden HMEC-1 mit Plättchen, Plättchen und Fibrinogen, oder Plättchen und Fibrin (aus Fibrinogen durch Ancrod gespalten) vorinkubiert und dann mit *S. aureus* zusätzlich koinkubiert. Wurden die Endothelzellen mit Plättchen inkubiert, so erhöhten diese nicht die Anzahl an Bakterien-positiven HMEC. Diese Beobachtung stimmt überein mit Shenkman *et al.*, 2000. Wurden aber die Endothelzellen mit Plättchen und Fibrinogen behandelt, so stieg bei *S. aureus* Newman die Anzahl der adhärenzstarken *S. aureus* signifikant an, bei *S. aureus* Cowan 1 veränderte sich die Anzahl der Bakterien-positiven HMEC-1 nicht. Durch Fibrinbildung wurde die Anzahl an adhärenzstarken und invasiven *S. aureus* Newman nicht weiter erhöht, aber bei der Betrachtung der Endothelzellen mit invadierten *S. aureus* Newman konnte ein signifikanter Anstieg beobachtet werden. Das bedeutet, dass Plättchen und Fibrin die Invasion von *S. aureus* in Endothelzellen verstärken können.

Die Plättchen in diesem Versuchsansatz wurden nicht aktiviert, aber eine Aktivierung aufgrund der Inkubation mit den Endothelzellen und/oder den Bakterien sowie der Inkubationszeit (insgesamt 1 1/2 h) ist wahrscheinlich. Wurden die Plättchen noch zusätzlich mit ADP aktiviert, so führte dies zu einer weiteren Steigerung der Adhärenz und in besonderem Maße auch der Invasion. *S. aureus* kann also an aktivierte

Plättchen über (vermutlich) Fibrin (siehe Kap. 4.2) anbinden. Die aktivierten Plättchen binden wiederum über eine Fibrinogenbrücke zwischen z. B. ICAM-1 auf der Endothelzelle und dem Plättchen GPIIb/IIIa an die Endothelzellen (Bombeli *et al.*, 1998). Diese Anbindung könnte zu einer Internalisierung von *S. aureus* in die Endothelzellen führen. Auch wenn Shenkman *et al.* keinen Einfluss von Plättchen auf die Adhärenz von *S. aureus* an das Endothel sehen konnten, so zeigten sie aber, dass eine Inhibierung von ICAM-1 die Adhärenz von *S. aureus* stark senkte. Dies deutet auf eine Beteiligung von ICAM-1 an den beschriebenen Vorgängen hin.

Eine Inkubation der HMEC-1 mit Plättchen und TSP-1 führte, genauso wie die alleinige Inkubation der HMEC-1 mit TSP-1, zu einem Anstieg der Adhärenz, während ein signifikanter Einfluss auf die Invasion nicht beobachtet werden konnte. Die Vorinkubation der HMEC-1 mit Plättchen, TSP-1, Ancrod und ADP führte nach Inkubation mit *S. aureus* Newman zu einem leichten Anstieg der Bakterien-positiven Endothelzellen. Eventuell wurde durch Aktivierung der Plättchen Fibrinogen frei, welches zusammen mit den Plättchen die Anbindung von *S. aureus* an die Endothelzellen begünstigte. In einem weiteren Versuchsansatz konnte ein synergistischer Effekt von Plättchen, Fibrinogen und TSP-1 insbesondere auf die Invasion von *S. aureus* in Endothelzellen beobachtet werden. Weitere Aktivierung der Plättchen oder Fibrinbildung führte zu keiner weiteren Steigerung der Adhärenz oder der Invasion.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Mechanismen, die der Anbindung von *S. aureus* an Plättchen zu Grunde liegen, nicht für die Anbindung und Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen von Bedeutung sind, sondern hier andere Interaktionen wichtig sind. Da Thrombozyten die Anbindung und auch die Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen begünstigen, könnte aber vielleicht die Hemmung der *S. aureus*-Thrombozyten-Interaktion auch einen hemmenden Effekt auf die Invasion von *S. aureus* in das Endothel haben.



## 5. Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu Bindung von Adhäsionsproteinen an *S. aureus*, der Interaktion von *S. aureus* mit Plättchen und der Interaktion von *S. aureus* mit dem Endothel unter Einbeziehung des Einflusses von Thrombozyten eröffnen weitere Aufgaben bzw. neue Fragestellungen.

In dieser Arbeit wurden die spezifische Bindung plasmatischer Adhäsionsproteine in der flüssigen Phase an *S. aureus* mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Methode untersucht. Zwischen den untersuchten *S. aureus* Stämmen gab es, abhängig von den Adhäsionsproteinen, Unterschiede in der Proteinbindung. Für weitere Arbeiten wäre eine genauere Charakterisierung der *S. aureus* Stämme mit Kenntnis der Adhäsinszusammensetzung auf der Oberfläche von großer Wichtigkeit, um die Unterschiede besser erklären zu können. Des Weiteren wurde nur eine Auswahl an Adhäsionsproteinen bearbeitet. Es wäre interessant, diese Untersuchungen mit weiteren Adhäsionsproteinen wie Vitronektin durchzuführen. Auch Versuche zur möglichen Hemmung der Bindung der Adhäsionsproteinen, z. B. durch Peptidoglykan, könnte Aufschluss auf molekulare Mechanismen, die der Bindung zu Grunde liegen, geben.

Für die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation wurde die Bedeutung von Fibrin anstelle von Fibrinogen als vermittelndes Protein herausgestellt. Auch die Assoziat-vermittelnde Bedeutung von Fibronektin und TSP-1 wurde betrachtet. Um Aussagen über die Rolle von TSP-1 zu machen, wurde exogenes TSP-1 den Versuchsansätzen mit Plättchen zugesetzt. Der Anstieg der Assoziatzahlen nach TSP-1-Zusatz war signifikant, aber nicht groß, vermutlich weil die Plättchen selber nach Aktivierung große Mengen TSP-1 freisetzen. Um die Rolle von TSP-1 genauer bestimmen zu können, müssten die Versuche noch einmal mit Thrombozyten von Gray-Platelet-Patienten, denen die TSP-1 Sekretion fehlt, wiederholt werden.

Für die Assoziation von Plättchen mit *S. aureus* ist nicht nur die Fibrinbildung, sondern auch die Aktivierung der Plättchen nötig. Beides geschieht durch Thrombin. Um endovaskuläre Infektionen, die durch *S. aureus* verursacht werden, zu verhindern oder zu behandeln, wäre eventuell eine Kombination von direkten Thrombin-Hemmern und Antibiotika effektiv, da Thrombin-Hemmer gleichzeitig die Bildung von Fibrin aus

Fibrinogen und die Aktivierung von Plättchen, mit Sezernierung von TSP-1, unterbinden. Dies müsste in Tiermodellen getestet werden.

Die Bedeutung der Fibrinbildung und der Aktivierung der Plättchen für die Assoziation von Bakterien mit Plättchen, sowie der Einfluss von TSP-1, wurde in dieser Arbeit nicht nur für *S. aureus* sondern auch für *Streptococcus pneumoniae* gezeigt. In weiterführenden Studien soll geprüft werden, ob dieser Mechanismus der Bakterien-Plättchen-Assoziation auch für die Interaktion von anderen gram-positiven Bakterien mit ihrem Wirt von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit wurde dargestellt, dass die wichtigsten MSCRAMMs, ClfA, ClfB, FNBP, Protein A in Bezug auf ihre Bindungsfähigkeiten von Adhäsionsproteinen ein promiskuitives Verhalten zeigen, d. h. sie können alle mehrere Adhäsionsproteine des Wirtes, wie Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin, binden. Außerdem kann ein Adhäsionsprotein an verschiedene MSCRAMMs binden. Damit sind die Adhäsine in der Eigenschaft der Promiskuität den Hauptadhäsionsrezeptoren in eukaryotischen Zellen, den Integrinen, ähnlich. Diese Eigenschaft erlaubt den Integrinen die Anpassung der eukaryotischen Zelladhäsion an die jeweiligen Umstände.

In weiterführenden Arbeiten soll geprüft werden, ob die unterschiedlichen MSCRAMMs unterschiedliche Funktionen haben, je nachdem, welches der gebundene Ligand ist. Es müssten dabei auch die Bindungsaffinitäten und die Konzentrationen der verschiedenen Adhäsionsproteine unter verschiedenen Umständen, z. B. bei Abwesenheit oder Anwesenheit von aktivierten Plättchen, mit berücksichtigt werden. Als ersten Schritt in diese Richtung sind im Anschluss an diese Arbeit Plasmonresonanzuntersuchungen mit reinen, rekombinanten MSCRAMMs und ihren Adhäsionsproteinen geplant.

ClfA kann die Fibrinogen-abhängige Plättchenaggregation inhibieren, da das  $\alpha_{11b}\beta_3$ -Integrin und ClfA beide eine ähnliche Stelle im Fibrinogenmolekül erkennen. Es wäre von Interesse zu untersuchen, ob ClfA auch die scherkraftabhängige Adhäsion von Plättchen an vWF und die vWF vermittelte Plättchenaggregation inhibieren kann, genauso wie auch die  $\alpha_{11b}\beta_3$ -TSP-1-Interaktion vermittelten Abläufe.

Die MSCRAMMs sind nicht auf *S. aureus* beschränkt, aus dem Grunde sollte in nachfolgenden Arbeiten auch geprüft werden, ob die MSCRAMMs anderer gram-positive Bakterien auch ein promiskuitives Verhalten zeigen.

Die Untersuchungen der Proteinbindung an Staphylokoagulase- und Eap-Deletionsmutanten zeigte in der Regel keine Bedeutung dieser Adhäsine für die Bindung von Fibrinogen, TSP-1, vWF oder Fibronectin. Es ist aber auch möglich, dass z. B. die MSCRAMMs die Einflüsse von Koagulase und Eap überdecken. Um einen Einfluss der anderen Adhäsine auszuschließen, wäre es in einer weiteren Studie deshalb notwendig, z. B. Koagulase bzw. Eap exprimierenden *S. carnosus*- Stämmen zu verwenden, wie es auch bei der Untersuchung der Bedeutung von FnBPA und FnBPB geschehen ist. Auch die Bedeutung der einzelnen MSCRAMMs für die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation, getrennt von den anderen MSCRAMMs, müsste mit verschiedenen Adhesin-exprimierenden *S. carnosus*- oder *Lactococcus lactis* Stämmen noch einmal untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde die Assoziat-vermittelnde Bedeutung von TSP-1 gezeigt. TSP-1 kann an Syndecane binden, die auch auf den Thrombozyten vorkommen. Es wurde mit Hilfe von Syndecan-1 und Syndecan-4 knock out Mäusen gezeigt, dass Syndecane die Anbindung von *S. aureus* an Plättchen vermitteln. Dabei konnte aber noch nicht geklärt werden, ob die Bindung von *S. aureus* über TSP-1 erfolgt, oder aber direkt über ein Heparansulfat bindendes Oberflächenprotein von *S. aureus*. Aufschluss darüber könnten Versuche ergeben, die Heparin-Sulfat-Bindung auf der *S. aureus* Seite zu hemmen. Auch Versuchen mit weiteren *S. aureus* Wildtypstämmen und auch MSCRAMM-Mutanten von *S. aureus* sind nötig, um weitere Informationen über die Interaktion zwischen *S. aureus* und den Syndecanen zu erlangen. Schließlich sind auch Studien im Tiermodell notwendig, um zu prüfen, ob Syndecane auch in vivo bei der Entwicklung einer infektiösen Endokarditis von Bedeutung sind.

Staphylokokken können nicht nur an Thrombozyten binden, sondern diese auch aktivieren. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Kaninchen-Plättchen, zumindest von einem Kaninchen, nach Immunisierung mit SAK sich durch *S. aureus* besser aktivieren ließen als vor Antikörperbildung. Dies lässt vermuten, dass SAK-Antikörper zusammen mit SAK eventuell an den FcRII-Rezeptor binden und zusammen mit *S. aureus* eine Aktivierung der Plättchen bewirken. In einer weiteren Studie sollen mehr Kaninchen mit Staphylokinase immunisiert werden, um die Hypothese mit einer größeren Datenmenge zu stützen oder zu widerlegen. Außerdem sind auch

Untersuchungen zu der Aktivierbarkeit der Plättchen von Patienten mit einer *S. aureus* bedingten Infektion für weitere Aussagen notwendig.

Bei der Untersuchung der *S. aureus*-Endothelinteraktion konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten die Adhärenz und auch die Invasion von *S. aureus* an/in Endothelzellen steigern können. Um zu klären, ob die Thrombozyten bei dem Internalisierungsvorgang mit in die Endothelzellen aufgenommen werden, schließen sich Untersuchungen mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie zu dieser Fragestellung an diese Dissertation an. TSP-1 steigerte die Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen, genauso Plättchen zusammen mit Fibrinogen oder Fibrin. Plättchen zusammen mit Fibrin steigerten auch die Invasion von *S. aureus* in Endothelzellen. In weiteren Untersuchungen zur *S. aureus*-Endothelzellinteraktion wäre es interessant, den Einfluss von anderen Adhäsionsproteinen wie vWF und Fibronectin im Zusammenspiel mit Thrombozyten zu untersuchen. Es müsste dabei auch geprüft werden, ob Peptidoglykan auf *S. aureus* nicht nur für die Anbindung von *S. aureus* an Endothelzellen über TSP-1 von Bedeutung ist, sondern auch für andere Anbindungswege. Schließlich müsste auch der Aktivierungszustand der Endothelzellen in die Untersuchungen mit einbezogen werden und die Endothelzellen dafür aktiviert werden (z. B. durch Thrombin, TNF- $\alpha$ , Histamin...). Außerdem sollten auch Versuche mit anderen Endothelzelllinien und auch Epithelzelllinien (HBMEC, HUVECs) durchgeführt werden, um über mögliche Unterschiede zwischen den Endothel- bzw. Epithelzellen Rückschlüsse auf Mechanismen der *S. aureus*-Endothelzellinteraktion zu ziehen.

## 6. Zusammenfassung

*Staphylococcus aureus* ist ein wichtiger Krankheitserreger bei intravaskulären Infektionen wie der infektiösen Endokarditis. In der Pathogenese endovaskulärer Infektionen ist die Anbindung an das Wirtsgewebe der erste wichtige Schritt. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Aufklärung des Adhäsionsmechanismus von *Staphylococcus aureus* an Thrombozyten und Endothelzellen durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei sowohl auf die Identifizierung der für die Interaktion relevanten Rezeptoren auf der bakteriellen Seite, als auch auf die Untersuchung von Plasmaproteinen als Brückenmoleküle gelegt.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die vier plasmatischen Adhäsionsproteine Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronektin in der flüssigen Phase konzentrationsabhängig an *S. aureus* binden und dass diese Bindung auch nahezu oder vollständig eine Sättigung erreicht. Die Adhäsionsproteine können dabei miteinander konkurrieren.

Die Untersuchungen zur Bindung von *S. aureus* an Plättchen zeigten, dass nicht Fibrinogen, sondern Fibrin der Vermittler der *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation ist. Auch TSP-1 und Fibronektin haben einen Assoziat-fördernden Einfluss. Die Bakterien banden dabei vornehmlich an aktivierte Plättchen. Es konnte ein hypothetisches Modell entwickelt werden, in dem Fibrin, TSP-1 und Fibronektin auf der Oberfläche der aktivierten Plättchen große Bindungs-Cluster bilden, die eine starke Bindung von *S. aureus* an Thrombozyten ermöglichen. Auch für die durch *S. aureus* ausgelöste Plättchenaggregation ist die Bildung von löslichem Fibrin ein Schlüsselmechanismus.

Die Assoziat-vermittelnde Rolle von Fibrin und die Notwendigkeit der Plättchenaktivierung ist nicht nur auf *S. aureus* beschränkt, sondern konnte auch für die Assoziation von unbekapselten oder leicht bekapselten *Streptococcus pneumoniae*-Stämmen mit Thrombozyten gezeigt werden

Nachdem die Bedeutung der Plasmaproteine als Brückenmoleküle herausgestellt wurde, galt in dieser Arbeit den Adhäsinen auf *S. aureus*, die Plasmaproteine binden können, ein großes Interesse. Für die Interaktion von *S. aureus* mit dem Wirtsgewebe ist bekannt, dass der MSCRAMM-Familie der Staphylokokken-Oberflächen-Proteine eine wichtige Bedeutung zukommt. Es sind Proteine mit einem homologen Aufbau, die adhäsive Matrixmoleküle wie Kollagen, Fibrinogen oder TSP-1 binden. Die wichtigsten

MSCRAMMs sind Protein A, ClfA, ClfB, FnBPA und FnBPB. Bindungsversuche mit löslichen Adhäsionsproteinen (Fibrinogen, TSP-1, vWF und Fibronectin) an *S. aureus* MSCRAMM-Deletionsmutanten bzw. an *fnbA* und *fnbB* exprimierende *Staphylococcus carnosus* Stämme zeigten, dass die untersuchten MSCRAMMs promiskuitiv sind: ein MSCRAMM konnte mehrere Adhäsionsproteine binden und ein Adhäsionsprotein an mehrere MSCRAMMs. In der Eigenschaft der Promiskuität sind die MSCRAMMs den Integrinen der Eukaryonten ähnlich.

Mit Hilfe von ClfA-Deletionsmutanten und *fnbA* und *fnbB* exprimierenden *S. carnosus* Stämmen konnte auch gezeigt werden, dass ClfA, FnBPA und FnBPB in die *S. aureus*-Thrombozyten-Assoziation involviert sind.

In der Plasmamembran von Plättchen kommen Syndecane vor. Dies sind Transmembranproteine, deren Heparansulfat-Ketten Interaktionen mit verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen, so auch TSP-1, ermöglichen. Im Rahmen dieser Dissertation konnte mit Hilfe von Syndecan-1- und Syndecan-4-knock-out Mäusen gezeigt werden, dass Syndecane die *S. aureus*-Plättchen-Assoziation vermitteln.

*S. aureus* kann nicht nur an Plättchen anbinden, sondern diese auch aktivieren. Es wurde in dieser Arbeit der Vermutung nachgegangen, dass Staphylokinase mit Staphylokinase-Antikörpern einen Komplex bildet, der an den FcR11a-Rezeptor bindet und dadurch die Plättchen aktiviert. Es konnte dazu gezeigt werden, dass sich Kaninchenplättchen nach Immunisierung mit Staphylokinase durch *S. aureus* besser aktivieren ließen als vor der Antikörperbildung.

Als letzter Teil der Arbeit wurde die *S. aureus*-Endothelinteraktion untersucht. *S. aureus* kann besser in endovaskuläres Gewebe einwandern als andere Bakterienarten. Um einen Einblick in den Mechanismus der *S. aureus*-Endothelinteraktion zu erlangen, wurde der Einfluss von Fibrinogen, Fibrin, TSP-1 und Plättchen auf die Anbindung von *S. aureus* an und die Invasion in Endothelzellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TSP-1 die Adhärenz von *S. aureus* an Endothelzellen steigert, ebenso steigern Plättchen zusammen mit Fibrinogen oder Fibrin die Adhärenz. Plättchen zusammen mit Fibrin steigerten auch die Invasion von *S. aureus* in Endothelzellen.

## 7. Summary

*Staphylococcus aureus* is a highly virulent pathogen and a frequent cause of endovascular infections, such as infective endocarditis. Microbial adhesion to host tissue is the initial critical event in the establishment of bacterial infections. In this dissertation the mechanisms underlying the adhesion of *S. aureus* to platelets and to endothelial cells were examined. Special attention was focused on the identification of receptors on *S. aureus* that are important for the interaction and on the examination of plasma proteins acting as bridging molecules.

It was shown in this study that the four adhesion proteins fibrinogen, TSP-1, vWF and fibronectin bound to *S. aureus* in solution in a concentration dependent manner and that this binding was almost or completely saturable. The adhesion proteins can compete against each other for the binding.

Studies to examine the binding of *S. aureus* to platelets showed that not fibrinogen, but soluble fibrin is the main mediator of platelet-*S. aureus*-association. TSP-1 and fibronectin enhanced the associate formation as well. Bacteria primarily bound to activated platelets. A hypothetical model was developed in which fibrin, TSP-1 and fibronectin form large binding clusters at the surface of activated platelets to promote strong adhesion of *S. aureus*. Formation of soluble fibrin is the key mechanism for platelet aggregation induced by *S. aureus* as well.

The associate-mediating function of fibrin and the necessity of platelet activation is not limited to *S. aureus*, but was also shown for *Streptococcus pneumoniae*-platelet-association.

Having exposed the importance of plasma proteins as bridging molecules, the interest was directed towards the plasma protein binding adhesins of *S. aureus*. In the interaction of *S. aureus* with host tissue, it is known that the MSCRAMM-family of staphylococcal surface proteins is of major importance. These proteins have a homologous structure and bind adhesive matrix molecules like collagen, fibrinogen or TSP-1. The major MSCRAMMs are protein A, ClfA, ClfB, FnBPA and FnBPB. Using *S. aureus* MSCRAMM mutants and complemented mutants as well as *S. carnosus* that heterologously expressed *fnbA* or *fnbB*, it was shown that the studied MSCRAMMs are

promiscuous. All of them bound fibrinogen, TSP-1, vWF and fibronectin. In this respect, the major MSCRAMMs resemble integrins of eucaryotic cells, as one integrin can bind several different ligands and one particular ligand may be recognized by several integrins.

By using ClfA deficient *S. aureus* mutants and *S. carnosus* strains expressing *fnbA* or *fnbB* it was also shown that ClfA, FnBPA and FnBPB are involved in *S. aureus*-platelet-association.

Syndecans are found in the plasma membrane of platelets. They are transmembrane proteins and their heparan sulfate chains allow for interaction with different extracellular matrix proteins, among them TSP-1. Using syndecan-1 and syndecan-4 knock out mice, it was shown that syndecans mediate binding of *S. aureus* to platelets.

*S. aureus* is not only able to bind to platelets, but is also able to activate them. In this study it was checked on the assumption that staphylokinase forms a complex with staphylokinase-antibodies which bind to the FcRIIa-receptor and thereby activates the platelets. It was shown that rabbit platelets became activated by *S. aureus* easier after immunization than before antibody generation.

In the last part of this thesis the *S. aureus*-endothelial cell-interaction was studied. *S. aureus* is known to colonise and invade endovascular tissue better than other bacterial species. To get an insight into the mechanisms underlying the processes of *S. aureus*-endothelial cell interaction, the influence of fibrinogen, fibrin, TSP-1 and platelets on the interaction was studied. It was shown that TSP-1 as well as platelets combined with fibrinogen or fibrin enhances the adherence of *S. aureus* to endothelial cells. Moreover, platelets in combination with fibrin enhanced the invasion of endothelial cells.



## 8. Literaturverzeichnis

- Abdelouahed, M., Hatmi, M., Helft, G., Emadi, S., Elalamy, I., & Samama, M.M. (1997). Comparative effects of recombinant staphylokinase and streptokinase on platelet aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(5), 815-817.
- Adams, J.C. (2001). Thrombospondins: Multifunctional regulators of cell interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 25-51.
- Arvand, M., Bhakdi, S., Dahlback, B., & Preissner, K.T. (1990). Staphylococcus-Aureus Alpha-Toxin Attack on Human Platelets Promotes Assembly of the Prothrombinase Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 265(24), 14377-14381.
- Arya, M., Anvari, B., Romo, G.M., Cruz, M.A., Dong, J.F., McIntire, L.V., Moake, J.L., & Lopez, J.A. (2002). Ultralarge multimers of von Willebrand factor form spontaneous high-strength bonds with the platelet glycoprotein Ib-IX complex: studies using optical tweezers. *Blood*, 99(11), 3971-3977.
- Asch, A.S., Barnwell, J., Silverstein, R.L., & Nachman, R.L. (1987). Isolation of the Thrombospondin Membrane-Receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 79(4), 1054-1061.
- Athanasopoulos, A.N., Economopoulou, M., Orlova, V.V., Sobke, A., Schneider, D., Weber, H., Augustin, H.G., Eming, S.A., Schubert, U., Linn, T., Nawroth, P.P., Hussain, M.A., Hammes, H.P., Herrmann, M., Preissner, K.T., & Chavakis, T. (2006). The extracellular adherence protein (Eap) of Staphylococcus aureus inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood*, 107(7), 2720-2727.
- Baenziger, N.L., Brodie, G.N., & Majerus, P.W. (1971). Thrombin-Sensitive Protein of Human Platelet Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(1), 240-243.
- Bale, M.D., Westrick, L.G., & Mosher, D.F. (1985). Incorporation of Thrombospondin Into Fibrin Clots. *Journal of Biological Chemistry*, 260(12), 7502-7508.
- Bayer, A.S., Sullam, P.M., Ramos, M., Li, C., Cheung, A.L., & Yeaman, M.R. (1995). Staphylococcus-Aureus Induces Platelet-Aggregation Via A Fibrinogen-Dependent Mechanism Which Is Independent of Principal Platelet Glycoprotein Ib/IIa Fibrinogen-Binding Domains. *Infection and Immunity*, 63(9), 3634-3641.
- Berndt, M.C., Du, X.P., & Booth, W.J. (1988). Ristocetin-Dependent Reconstitution of Binding of Vonwillebrand-Factor to Purified Human-Platelet Membrane Glycoprotein Ib-Ix Complex. *Biochemistry*, 27(2), 633-640.
- Bjerketorp, J., Jacobsson, K., & Frykberg, L. (2004). The von Willebrand factor-binding protein (vWbp) of Staphylococcus aureus is a coagulase. *Fems Microbiology Letters*, 234(2), 309-314.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93-99.

- Boden, M.K. & Flock, J.I. (1989). Fibrinogen-Binding Protein/Clumping Factor from *Staphylococcus-Aureus*. *Infection and Immunity*, 57(8), 2358-2363.
- Bombeli, T., Schwartz, B.R., & Harlan, J.M. (1998). Adhesion of activated platelets to endothelial cells: Evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha(v)beta(3) integrin, and GPIb alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 187(3), 329-339.
- Booth, N.A. (1999). Fibrinolysis and thrombosis. *Baillieres Best Practice & Research Clinical Haematology*, 12(3), 423-433.
- Born, G.V.R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 196, 927-928.
- Bornstein, P. (2001). Thrombospondins as extracellular modulators of cell function. *Journal of Clinical Investigation*, 107(8), 929-934.
- Bouchard, B.A. & Tracy, P.B. (2001). Platelets, leukocytes, and coagulation. *Current Opinion in Hematology*, 8(5), 263-269.
- Brass, L.F. (2003). Thrombin and platelet activation. *Chest*, 124(3), 18S-25S.
- Carter, P., Bedouelle, H., & Winter, G. (1985). Improved Oligonucleotide Site-Directed Mutagenesis Using M13 Vectors. *Nucleic Acids Research*, 13(12), 4431-4443.
- Chavakis, T., Hussain, M., Kanse, S.M., Peters, G., Bretzel, R.G., Flock, J.I., Herrmann, M., & Preissner, K.T. (2002). *Staphylococcus aureus* extracellular adherence protein serves as anti-inflammatory factor by inhibiting the recruitment of host leukocytes. *Nature Medicine*, 8(7), 687-693.
- Chavakis, T., Wiechmann, K., Preissner, K.T., & Herrmann, M. (2005). *Staphylococcus aureus* interactions with the endothelium - The role of bacterial "Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules" (SERAM) in disturbing host defense systems. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(2), 278-285.
- Cheung, A.L. & Fischetti, V.A. (1990). The Role of Fibrinogen in *Staphylococcal* Adherence to Catheters *In vitro*. *Journal of Infectious Diseases*, 161(6), 1177-1186.
- Cheung, A.L., Krishnan, M., Jaffe, E.A., & Fischetti, V.A. (1991). Fibrinogen Acts As A Bridging Molecule in the Adherence of *Staphylococcus-Aureus* to Cultured Human Endothelial-Cells. *Journal of Clinical Investigation*, 87(6), 2236-2245.
- Cheung, A.L., Koomey, J.M., Butler, C.A., Projan, S.J., & Fischetti, V.A. (1992). Regulation of Exoprotein Expression in *Staphylococcus-Aureus* by A Locus (Sar) Distinct from Agr. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(14), 6462-6466.
- Chien, Y.T. & Cheung, A.L. (1998). Molecular interactions between two global regulators, sar and agr, in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2645-2652.

- Cho, J.H. & Mosher, D.F. (2006). Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood*, 107(9), 3555-3563.
- Chung, J., Gao, A.G., & Frazier, W.A. (1997). Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin  $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ . *Journal of Biological Chemistry*, 272(23), 14740-14746.
- Climo, M.W., Ehlert, K., & Archer, G.L. (2001). Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1431-1437.
- Corbett, S.A., Lee, L., Wilson, C.L., & Schwarzbauer, J.E. (1997). Covalent cross-linking of fibronectin to fibrin is required for maximal cell adhesion to a fibronectin-fibrin matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 272(40), 24999-25005.
- Dhawan, V.K., Yeaman, M.R., Cheung, A.L., Kim, E., Sullam, P.M., & Bayer, A.S. (1997). Phenotypic resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in vitro is correlated with enhanced virulence in experimental endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity*, 65(8), 3293-3299.
- Dickinson, R.B., Nagel, J.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Proctor, R.A., & Couper, S.L. (1995). Quantitative Comparison of Clumping Factor-Mediated and Coagulase-Mediated *Staphylococcus aureus* Adhesion to Surface-Bound Fibrinogen Under Flow. *Infection and Immunity*, 63(8), 3143-3150.
- Doolittle, R.F., Watt, K.W.K., Cottrell, B.A., Strong, D.D., & Riley, M. (1979). Amino-Acid Sequence of the Alpha-Chain of Human-Fibrinogen. *Nature*, 280(5722), 464-468.
- Dorahy, D.J., Thorne, R.F., Fecondo, J.V., & Burns, G.F. (1997). Stimulation of platelet activation and aggregation by a carboxyl-terminal peptide from thrombospondin binding to the integrin-associated protein receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 1323-1330.
- Downer, R., Roche, F., Park, P.W., Mecham, R.P., & Foster, T.J. (2002). The elastin-binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) is expressed at the cell surface as an integral membrane protein and not as a cell wall-associated protein. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 243-250.
- Dziewanowska, K., Patti, J.M., Deobald, C.F., Bayles, K.W., Trumble, W.R., & Bohach, G.A. (1999). Fibronectin binding protein and host cell tyrosine kinase are required for internalization of *Staphylococcus aureus* by epithelial cells. *Infection and Immunity*, 67(9), 4673-4678.
- Eidhin, D.N., Perkins, S., Francois, P., Vaudaux, P., Höök, M., & Foster, T.J. (1998). Clumping factor B (ClfB), a new surface-located fibrinogen-binding adhesin of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 30(2), 245-257.
- Engvall, E. & Perlmann, P. (1971). Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) Quantitative Assay of Immunoglobulin-G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-879.

- Entenza, J.M., Moreillon, P., Senn, M.M., Kormanec, J., Dunman, P.M., Berger-Bachi, B., Projan, S., & Bischoff, M. (2005). Role of sigma(B) in the expression of Staphylococcus aureus cell wall adhesins ClfA and FnbA and contribution to infectivity in a rat model of experimental endocarditis. *Infection and Immunity*, 73(2), 990-998.
- Espersen, F. & Clemmensen, I. (1982). Isolation of A Fibronectin-Binding Protein from Staphylococcus-Aureus. *Infection and Immunity*, 37(2), 526-531.
- Espersen, F. (1985). Complement Activation by Clumping Factor and Protein A from Staphylococcus-Aureus Strain E-2371. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica Section C-Immunology*, 93(2), 59-64.
- Faraday, N., Goldschmidtclermont, P., Dise, K., & Bray, P.F. (1994). Quantitation of Soluble Fibrinogen Binding to Platelets by Fluorescence-Activated Flow-Cytometry. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 123(5), 728-740.
- Fitzgerald, J.R., Loughman, A., Keane, F., Brennan, M., Knobel, M., Higgins, J., Visai, L., Speziale, P., Cox, D., & Foster, T.J. (2006). Fibronectin-binding proteins of Staphylococcus aureus mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the Fc gamma RIIa receptor. *Molecular Microbiology*, 59(1), 212-230.
- Flock, J.I., Hienz, S.A., Heimdahl, A., & Schennings, T. (1996). Reconsideration of the role of fibronectin binding in endocarditis caused by Staphylococcus aureus. *Infection and Immunity*, 64(5), 1876-1878.
- Flock, M. & Flock, J.I. (2001). Rebinding of extracellular adherence protein Eap to Staphylococcus aureus can occur through a surface-bound neutral phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 183(13), 3999-4003.
- Forsgren, A., Svedjelund, A., & Wigzell, H. (1976). Lymphocyte Stimulation by Protein-A of Staphylococcus-Aureus. *European Journal of Immunology*, 6(3), 207-213.
- Fowler, T., Wann, E.R., Joh, D., Johansson, S.A., Foster, T.J., & Höök, M. (2000). Cellular invasion by Staphylococcus aureus involves a fibronectin bridge between the bacterial fibronectin-binding MSCRAMMs and host cell beta 1 integrins. *European Journal of Cell Biology*, 79(10), 672-679.
- Fowler, V.G., McIntyre, L.M., Yeaman, M.R., Peterson, G.E., Reller, L.B., Corey, G.R., Wray, D., & Bayer, A.S. (2000). In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein in isolates of Staphylococcus aureus from endocarditis patients correlates with an intravascular device source. *Journal of Infectious Diseases*, 182(4), 1251-1254.
- Fowler, V.G., Miro, J.M., Hoen, B., Cabell, C.H., Abrutyn, E., Rubinstein, E., Corey, G.R., Spelman, D., Bradley, S.F., Barsic, B., Pappas, P.A., Anstrom, K.J., Wray, D., Fortes, C.Q., Anguera, I., Athan, E., Jones, P., van der Meer, J.T.M., Elliott, T.S.J., Levine, D.P., & Bayer, A.S. (2005). Staphylococcus aureus endocarditis - A consequence of medical progress. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 293(24), 3012-3021.

- Frelinger,A.L., Du,X.P., Plow,E.F., & Ginsberg,M.H. (1991). Monoclonal-Antibodies to Ligand-Occupied Conformers of Integrin Alpha-IIb-Beta-3 (Glycoprotein-IIb-IIIa) Alter Receptor Affinity, Specificity, and Function. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17106-17111.
- Friedrich,R., Panizzi,P., Fuentes-Prior,P., Richter,K., Verhamme,I., Anderson,P.J., Kawabata,S.I., Huber,R., Bode,W., & Bock,P.E. (2003). Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. *Nature*, 425(6957), 535-539.
- Furlan,M. (1996). von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Annals of Hematology*, 72(6), 341-348.
- Gachet,C. (2001). ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1), 222-232.
- Gartner,T.K. & Bennett,J.S. (1985). The Tetrapeptide Analog of the Cell Attachment Site of Fibronectin Inhibits Platelet-Aggregation and Fibrinogen Binding. *Thrombosis and Haemostasis*, 54(1), 230.
- Gawarz,M. (1999). *Das Blutplättchen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 14.
- George,N.P., Wei,Q., Shin,P.K., Konstantopoulos,K., & Ross,J.M. (2006). Staphylococcus aureus Adhesion via Spa, ClfA, and SdrCDE to Immobilized Platelets Demonstrates Shear-Dependent Behavior. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26(10), 2394-2400.
- Giachino,P., Engelmann,S., & Bischoff,M. (2001). sigma(B) activity depends on RsbU in Staphylococcus aureus. *Journal of Bacteriology*, 183(6), 1843-1852.
- Giraud,A.T., Raspanti,C.G., Calzolari,A., & Nagel,R. (1994). Characterization of A Tn551-Mutant of Staphylococcus-Aureus Defective in the Production of Several Exoproteins. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(8), 677-681.
- Gomez,M.I., Lee,A., Reddy,B., Muir,A., Soong,G., Pitt,A., Cheung,A., & Prince,A. (2004). Staphylococcus aureus protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. *Nature Medicine*, 10(8), 842-848.
- Gomez,M.I., O'Seaghdha,M., Magargee,M., Foster,T.J., & Prince,A.S. (2006). Staphylococcus aureus protein A activates TNFR1 signaling through conserved IgG binding domains. *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), 20190-20196.
- Greinacher,A., Potzsch,B., Amiral,J., Dummel,V., Eichner,A., & Muellereckhardt,C. (1994). Heparin-Associated Thrombocytopenia - Isolation of the Antibody and Characterization of A Multimolecular Pf4-Heparin Complex As the Major Antigen. *Thrombosis and Haemostasis*, 71(2), 247-251.
- Guckian,J.C. (1975). Effect of Pneumococci on Blood-Clotting, Platelets, and Polymorphonuclear Leukocytes. *Infection and Immunity*, 12(4), 910-918.

- Haggar,A., Hussain,M., Lonnie,H., Herrmann,M., Norrby-Teglund,A., & Flock,J.I. (2003). Extracellular adherence protein from *Staphylococcus aureus* enhances internalization into eukaryotic cells. *Infection and Immunity*, 71(5), 2310-2317.
- Hansen,U., Hussain,M., Villone,D., Herrmann,M., Robenek,H., Peters,G., Sinha,B., & Bruckner,P. (2006). The anchorless adhesin Eap (extracellular adherence protein) from *Staphylococcus aureus* selectively recognizes extracellular matrix aggregates but binds promiscuously to monomeric matrix macromolecules. *Matrix Biology*, 25(4), 252-260.
- Harraghy,N., Kormanec,J., Wolz,C., Homerova,D., Goerke,C., Ohlsen,K., Oazi,S., Hill,P., & Herrmann,M. (2005). Sae is essential for expression of the staphylococcal adhesins Eap and Emp. *Microbiology-Sgm*, 151, 1789-1800.
- Hartleib,J., Kohler,N., Dickinson,R.B., Chhatwal,G.S., Sixma,J.J., Hartford,O.M., Foster,T.J., Peters,G., Kehrel,B.E., & Herrmann,M. (2000). Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood*, 96(6), 2149-2156.
- Hawiger,J., Hammond,D.K., Timmons,S., & Budzynski,A.Z. (1978). Interaction of Human Fibrinogen with *Staphylococci* - Presence of A Binding Region on Normal and Abnormal Fibrinogen Variants and Fibrinogen Derivatives. *Blood*, 51(5), 799-812.
- Hawiger,J., Timmons,S., Strong,D.D., Cottrell,B.A., Riley,M., & Doolittle,R.F. (1982). Identification of A Region of Human-Fibrinogen Interacting with Staphylococcal Clumping Factor. *Biochemistry*, 21(6), 1407-1413.
- Hawiger,J., Timmons,S., Kloczewiak,M., Strong,D.D., & Doolittle,R.F. (1982). Gamma-Chain and Alpha-Chain of Human-Fibrinogen Possess Sites Reactive with Human-Platelet Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 79(6), 2068-2071.
- Heilmann,C., Herrmann,M., Kehrel,B.E., & Peters,G. (2002). Platelet-binding domains in 2 fibrinogen-binding proteins of *Staphylococcus aureus* identified by phage display. *Journal of Infectious Diseases*, 186(1), 32-39.
- Heilmann,C., Niemann,S., Sinha,B., Herrmann,M., Kehrel,B.E., & Peters,G. (2004). *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein (FnBP)-mediated adherence to platelets, and aggregation of platelets induced by FnBPA but not by FnBPB. *Journal of Infectious Diseases*, 190(2), 321-329.
- Helisch,A. & Ware,J.A. (1999). Therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), 772-780.
- Herrick,S., Blanc-Brude,O., Gray,A., & Laurent,G. (1999). Fibrinogen. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(7), 741-746.
- Herrmann,M., Vaudaux,P.E., Pittet,D., Auckenthaler,R., Lew,P.D., Schumacherperdreau,F., Peters,G., & Waldvogel,F.A. (1988). Fibronectin, Fibrinogen, and Laminin Act As Mediators of Adherence of Clinical

- Staphylococcal Isolates to Foreign Material. *Journal of Infectious Diseases*, 158(4), 693-701.
- Herrmann, M., Jaconi, M.E.E., Dahlgren, C., Waldvogel, F.A., Stendahl, O., & Lew, D.P. (1990). Neutrophil bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* adherent on biological surfaces. Surface-bound extracellular matrix proteins activate intracellular killing by oxygen-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Clinical Investigation*, 86(3), 942-951.
- Herrmann, M., Suchard, S.J., Boxer, L.A., Waldvogel, F.A., & Lew, P.D. (1991). Thrombospondin Binds to *Staphylococcus-Aureus* and Promotes Staphylococcal Adherence to Surfaces. *Infection and Immunity*, 59(1), 279-288.
- Herrmann, M., Lai, Q.J., Albrecht, R.M., Mosher, D.F., & Proctor, R.A. (1993). Adhesion of *Staphylococcus-Aureus* to Surface-Bound Platelets - Role of Fibrinogen Fibrin and Platelet Integrins. *Journal of Infectious Diseases*, 167(2), 312-322.
- Herrmann, M., Hartleib, J., Kehrel, B., Montgomery, R.R., Sixma, J.J., & Peters, G. (1997). Interaction of von Willebrand factor with *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases*, 176(4), 984-991.
- Hess, D.J., Henry-Stanley, M.J., Erlandsen, S.L., & Wells, C.L. (2006). Heparan sulfate proteoglycans mediate *Staphylococcus aureus* interactions with intestinal epithelium. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(3), 133-141.
- Heying, R., van de Gevel, J., Que, Y.-A., Moreillon, P., & Beekhuizen, H. (2007). Fibronectin-binding proteins and clumping factor A in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: FnBPA is sufficient to activate human endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis*, 97, 617-626.
- Homandberg, G.A. & Kramerbjerke, J. (1987). Thrombospondin Binds to Amino-Terminal Fragments of Plasma Fibronectin. *Thrombosis Research*, 48(3), 329-335.
- House-Pompeo, K., Xu, Y., Joh, D., Speziale, P., & Höök, M. (1996). Conformational changes in the fibronectin binding MSCRAMMs are induced by ligand binding. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1379-1384.
- Hussain, M., Haggar, A., Heilmann, C., Peters, G., Flock, J.I., & Herrmann, M. (2002). Insertional inactivation of eap in *Staphylococcus aureus* strain Newman confers reduced staphylococcal binding to fibroblasts. *Infection and Immunity*, 70(6), 2933-2940.
- Hynes, R.O. & Yamada, K.M. (1982). Fibronectins - Multifunctional Modular Glycoproteins. *Journal of Cell Biology*, 95(2), 369-377.
- Ingnas, M., Johansson, S.G.O., & Bennich, H.H. (1980). Interaction of Human Polyclonal Ige and Igg from Different Species with Protein-A from *Staphylococcus-Aureus* - Demonstration of Protein-A-Reactive Sites Located in the Fab'2 Fragment of Human-Igg. *Scandinavian Journal of Immunology*, 12(1), 23-31.
- Jaffe, E.A., Hoyer, L.W., & Nachman, R.L. (1974). Synthesis of Vonwillebrand Factor by Cultured Human Endothelial Cells. *Journal of Clinical Investigation*, 53(6), A36.

- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., Leung, L.L.K., Doyle, M.J., Mckeownlongo, P.J., & Mosher, D.F. (1983). Cultured Human-Fibroblasts Synthesize and Secrete Thrombospondin and Incorporate It Into Extracellular-Matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*, 80(4), 998-1002.
- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., & Falcone, D.J. (1985). Monocytes and Macrophages Synthesize and Secrete Thrombospondin. *Blood*, 65(1), 79-84.
- Johansson, S., Svineng, G., Wennerberg, K., Armulik, A., & Lohikangas, L. (1997). Fibronectin-Integrin Interactions. *Frontiers in Bioscience*, 2, 126-146.
- Joh, D., Speziale, P., Gurusiddappa, S., Manor, J., & Höök, M. (1998). Multiple specificities of the staphylococcal and streptococcal fibronectin-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules. *European Journal of Biochemistry*, 258(2), 897-905.
- Jönsson, K., Signas, C., Muller, H.P., & Lindberg, M. (1991). 2 Different Genes Encode Fibronectin Binding-Proteins in *Staphylococcus-Aureus* - the Complete Nucleotide-Sequence and Characterization of the 2Nd Gene. *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 1041-1048.
- Jönsson, K., McDevitt, D., McGavin, M.H., Patti, J.M., & Höök, M. (1995). *Staphylococcus-Aureus* Expresses A Major Histocompatibility Complex Class-II Analog. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37), 21457-21460.
- Jurk, K., Clemetson, K.J., de Groot, P.G., Brodde, M.F., Steiner, M., Savion, N., Varon, D., Sixma, J.J., Van Aken, H., & Kehrel, B.E. (2003). Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb Journal*, 17(9), 1490-1492.
- Jurk, K. & Kehrel, B.E. (2005a). Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars in Thrombosis and Haemostasis*, 31(4), 381-392.
- Jurk, K. & Kehrel, B.E. (2005b). Platelets and the new comprehension of haemostasis. *Haemostaseologie*, 25(1), 39-49.
- Jurk, K. & Kehrel, B.E. (2007). Inherited and acquired disorders of platelet function. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 34(1), 6-19.
- Karczewski, J., Knudsen, K.A., Smith, L., Murphy, A., Rothman, V.L., & Tuszynski, G.P. (1989). The Interaction of Thrombospondin with Platelet Glycoprotein GpIIb-IIIa. *Journal of Biological Chemistry*, 264(35), 21322-21326.
- Kawabata, S., Morita, T., Iwanaga, S., & Igarashi, H. (1985). Enzymatic-Properties of Staphylothrombin, An Active Molecular-Complex Formed Between Staphylocoagulase and Human-Prothrombin. *Journal of Biochemistry*, 98(6), 1603-1614.
- Kehrel, B.E. (2003). Blutplättchen: Biochemie und Physiologie. *Hämostaseologie*, 4, 149-158.



- Kehrel, B.E. & Jurk, K. (2004). Platelets at the interface between hemostasis and innate immunity. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 31, 379-386.
- Kehrel, B., Kronenberg, A., Schwippert, B., Niesingbresch, D., Niehues, U., Tschöpe, D., Vandeloos, J., & Clemetson, K.J. (1991). Thrombospondin Binds Normally to Glycoprotein-IIIb Deficient Platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 179(2), 985-991.
- Kehrel, B., Flicker, E., Wigbels, B., Osterfeld, M., Vandeloos, J., & Luscher, E.F. (1996). Thrombospondin measured in whole blood - An indicator of platelet activation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 7(2), 202-205.
- Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K.J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C.G., Farndale, R.W., Okuma, M., & Barnes, M.J. (1998). Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: It recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*, 91(2), 491-499.
- Kelton, J.G., Smith, J.W., Warkentin, T.E., Hayward, C.P.M., Denomme, G.A., & Horsewood, P. (1994). Immunoglobulin-G from Patients with Heparin-Induced Thrombocytopenia Binds to A Complex of Heparin and Platelet Factor-4. *Blood*, 83(11), 3232-3239.
- Kerdudou, S., Laschke, M.W., Sinha, B., Preissner, K.T., Menger, M.D., & Herrmann, M. (2006). Fibronectin binding proteins contribute to the adherence of *Staphylococcus aureus* to intact endothelium in vivo. *Thrombosis and Haemostasis*, 96(2), 183-189.
- Kloczewiak, M., Timmons, S., Lukas, T.J., & Hawiger, J. (1984). Platelet Receptor Recognition Site on Human-Fibrinogen - Synthesis and Structure-Function Relationship of Peptides Corresponding to the Carboxy-Terminal Segment of the Gamma-Chain. *Biochemistry*, 23(8), 1767-1774.
- Kloos, W.E. & Bannerman, T.L. (1994). Update on Clinical-Significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1), 117-140.
- Koedam, J.A., Meijers, J.C.M., Sixma, J.J., & Bouma, B.N. (1988). Inactivation of Human Factor-VIII by Activated Protein-C - Cofactor Activity of Protein-S and Protective Effect of Vonwillebrand-Factor. *Journal of Clinical Investigation*, 82(4), 1236-1243.
- Koedam, J.A., Hamer, R.J., Beeservisser, N.H., Bouma, B.N., & Sixma, J.J. (1990). The Effect of Vonwillebrand-Factor on Activation of Factor-VIII by Factor-Xa. *European Journal of Biochemistry*, 189(2), 229-234.
- Koo, S.P., Yeaman, M.R., & Bayer, A.S. (1996). Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein is influenced by microenvironment and target cell growth phase. *Infection and Immunity*, 64(9), 3758-3764.
- Koo, S.P., Bayer, A.S., Kagan, B.L., & Yeaman, M.R. (1999). Membrane permeabilization by thrombin-induced platelet microbicidal protein 1 is modulated by

- transmembrane voltage polarity and magnitude. *Infection and Immunity*, 67(5), 2475-2481.
- Kullik,I., Giachino,P., & Fuchs,T. (1998). Deletion of the alternative sigma factor sigma(B) in *Staphylococcus aureus* reveals its function as a global regulator of virulence genes. *Journal of Bacteriology*, 180(18), 4814-4820.
- Kupferwasser,L.I., Yeaman,M.R., Shapiro,S.M., Nast,C.C., & Bayer,A.S. (2002). In vitro susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis - Microbiological, histopathologic, and echocardiographic analyses. *Circulation*, 105(6), 746-752.
- Kuusela,P. (1978). Fibronectin Binds to *Staphylococcus Aureus*. *Nature*, 276(5689), 718-720.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Lähteenmäki,K., Kuusela,P., & Korhonen,T.K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(5), 531-552.
- Lahav,J., Lawler,J., & Gimbrone,M.A. (1984). Thrombospondin Interactions with Fibronectin and Fibrinogen - Mutual Inhibition in Binding. *European Journal of Biochemistry*, 145(1), 151-156.
- Lahav,J., Jurk,K., Hess,O., Barnes,M.J., Farndale,R.W., Luboshitz,J., & Kehrel,B.E. (2002). Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood*, 100(7): 2472-2478.
- Lebrazi,J., Helft,G., Abdelouahed,M., Elalamy,I., Mirshahi,M., Samama,M.M., & Lecompte,T. (1995). Human Antistreptokinase Antibodies Induce Platelet-Aggregation in An Fc Receptor (Cd32) Dependent Manner. *Thrombosis and Haemostasis*, 74(3), 938-942.
- Liang,O.D., Ascencio,F., Fransson,L.A., & Wadstrom,T. (1992). Binding of Heparan-Sulfate to *Staphylococcus-Aureus*. *Infection and Immunity*, 60(3), 899-906.
- Liang,O.D., Janingmar,F., & Wadstrom,T. (1995). Isolation and Characterization of A Vitronectin-Binding Surface Protein from *Staphylococcus-Aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1250(1), 110-116.
- Lofdahl,S., Guss,B., Uhlen,M., Philipson,L., & Lindberg,M. (1983). Gene for *Staphylococcal Protein-A*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* , 80(3), 697-701.
- Loughman,A., Fitzgerald,J.R., Brennan,M.P., Higgins,J., Downer,R., Cox,D., & Foster,T.J. (2005). Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Molecular Microbiology*, 57(3), 804-818.

- Lowy, F.D. (1998). Medical progress - Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
- Lowy, F.D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265-1273.
- Lüscher, E.F. & Weber, S. (1993). The Formation of the Hemostatic Plug - A Special Case of Platelet-Aggregation - An Experiment and A Survey of the Literature. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(2), 234-237.
- Majack, R.A., Cook, S.C., & Bornstein, P. (1986). Control of Smooth-Muscle Cell-Growth by Components of the Extracellular-Matrix - Autocrine Role for Thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(23), 9050-9054.
- Massey, R.C., Kantzanou, M.N., Fowler, T., Day, N.P.J., Schofield, K., Wann, E.R., Berendt, A.R., Höök, M., & Peacock, S.J. (2001). Fibronectin-binding protein A of Staphylococcus aureus has multiple, substituting, binding regions that mediate adherence to fibronectin and invasion of endothelial cells. *Cellular Microbiology*, 3(12), 839-851.
- Mazmanian, S.K., Hung, I.T., & Schneewind, O. (2001). Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of Staphylococcus aureus. *Molecular Microbiology*, 40(5), 1049-1057.
- McDevitt, D., Vaudaux, P., & Foster, T.J. (1992). Genetic-Evidence That Bound Coagulase of Staphylococcus-Aureus Is Not Clumping Factor. *Infection and Immunity*, 60(4), 1514-1523.
- McDevitt, D., Francois, P., Vaudaux, P., & Foster, T.J. (1994). Molecular Characterization of the Clumping Factor (Fibrinogen Receptor) of Staphylococcus-Aureus. *Molecular Microbiology*, 11(2), 237-248.
- McDevitt, D., Nanavaty, T., House-Pompeo, K., Bell, E., Turner, N., McIntire, L., Foster, T., & Höök, M. (1997). Characterization of the interaction between the Staphylococcus aureus clumping factor (ClfA) and fibrinogen. *European Journal of Biochemistry*, 247(1), 416-424.
- McGavin, M.H., Krajewskapietrasik, D., Ryden, C., & Höök, M. (1993). Identification of A Staphylococcus-Aureus Extracellular Matrix-Binding Protein with Broad Specificity. *Infection and Immunity*, 61(6), 2479-2485.
- McRedmond, J.P., Harriott, P., Walker, B., & Fitzgerald, D.J. (2000). Streptokinase-induced platelet activation involves antistreptokinase antibodies and cleavage of protease-activated receptor-1. *Blood*, 95(4), 1301-1308.
- Michelson, A.D., & Shattil, S.J. (1996). The use of flow cytometry to study platelet activation. In: Watson, S.P., Authi, K.S. (eds.). *Platelets. A practical approach*. IRL Press, Oxford, New York, Tokyo, 111-129.
- Meyer, D. & Girma, J.P. (1993). Von-Willebrand-Factor - Structure and Function. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(1), 99-104.

- Miano, J.M., Vlastic, N., Tota, R.R., & Stemerman, M.B. (1993). Smooth-Muscle Cell Immediate-Early Gene and Growth-Factor Activation Follows Vascular Injury - A Putative In Vivo Mechanism for Autocrine Growth. *Arteriosclerosis and Thrombosis*, 13(2), 211-219.
- Michelson, A.D. (1994). Platelet Activation by Thrombin Can be Directly Measured in Whole-Blood Through the Use of the Peptide Gprp and Flow-Cytometry - Methods and Clinical-Applications. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, 5(1), 121-131.
- Michelson, A.D. (1996). Flow cytometry: A clinical test of platelet function. *Blood*, 87(12), 4925-4936.
- Moks, T., Abrahmsen, L., Nilsson, B., Hellman, U., Sjoquist, J., & Uhlen, M. (1986). Staphylococcal Protein-A Consists of 5 Igg-Binding Domains. *European Journal of Biochemistry*, 156(3), 637-643.
- Monroe, D., Hoffman, M., & Roberts, H.R. (2002). Platelets and thrombin generation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 22(9), 1381-1389.
- Moreillon, P., Entenza, J.M., Francioli, P., McDevitt, D., Foster, T.J., Francois, P., & Vaudaux, P. (1995). Role of Staphylococcus-Aureus Coagulase and Clumping Factor in Pathogenesis of Experimental Endocarditis. *Infection and Immunity*, 63(12), 4738-4743.
- Moreillon, P., Que, Y.A., & Bayer, A.S. (2002). Pathogenesis of streptococcal and staphylococcal endocarditis. *Infectious Disease Clinics of North America*, 16(2), 297-+.
- Morgenstern, E. (1998). The pathway of exocytosis in human platelets. *Blood*, 92(6), 2191-2192.
- Morgenstern, E. (1999). Morphologie der Thrombozyten. In Müller-Berghaus G, Pötzsch B.: *Hämostaseologie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1-14.
- Moroi, M., Jung, S.M., Shinmyozu, K., Tomiyama, Y., Ordinas, A., & DiazRicart, M. (1996). Analysis of platelet adhesion to a collagen-coated surface under flow conditions: The involvement of glycoprotein VI in the platelet adhesion. *Blood*, 88(6), 2081-2092.
- Mosesson, M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3(8), 1894-1904.
- Mosher, D.F., Doyle, M.J., & Jaffe, E.A. (1982). Synthesis and Secretion of Thrombospondin by Cultured Human-Endothelial Cells. *Journal of Cell Biology*, 93(2), 343-348.
- Much, H. (1908). Ueber eine Vorstufe des Fibrinfermentes in Kulturen von Staphylokokkus aureus. *Biochemische Zeitschrift*, 14, 143-155.
- Naganuma, H., Satoh, E., Asahara, T., Amagasaki, K., Watanabe, A., Satoh, H., Kuroda, K., Zhang, L., & Nukui, H. (2004). Quantification of thrombospondin-1 secretion and

- expression of alpha v beta 3 and alpha 3 beta 1 integrins and syndecan-1 as cell-surface receptors for thrombospondin-1 in malignant glioma cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 70(3), 309-317.
- Nguyen,T., Ghebrehiwet,B., & Peerschke,E.I.B. (2000). Staphylococcus aureus protein A recognizes platelet gC1qR/p33: a novel mechanism for staphylococcal interactions with platelets. *Infection and Immunity*, 68(4), 2061-2068.
- Nicolau,D.P., Marangos,M.N., Nightingale,C.H., & Quintiliani,R. (1995). Influence of Aspirin on Development and Treatment of Experimental Staphylococcus-Aureus Endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(8), 1748-1751.
- Nicolau,D.P., Tessier,P.R., & Nightingale,C.H. (1999). Beneficial effect of combination antiplatelet therapy on the development of experimental Staphylococcus aureus endocarditis. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 11(2), 159-161.
- Niemann,S., Spehr,N., Van Aken,H., Morgenstern,E., Peters,G., Herrmann,M., & Kehrel,B.E. (2004). Soluble fibrin is the main mediator of Staphylococcus aureus adhesion to platelets. *Circulation*, 110(2), 193-200.
- Novick,R. (1967). Properties of A Cryptic High-Frequency Transducing Phage in Staphylococcus Aureus. *Virology*, 33(1), 155-&.
- O'Brien,L.M., Walsh,E.J., Massey,R.C., Peacock,S.J., & Foster,T.J. (2002). Staphylococcus aureus clumping factor B (ClfB) promotes adherence to human type I cytokeratin 10: implications for nasal colonization. *Cellular Microbiology*, 4(11), 759-770.
- O'Connell,D.P., Nanavaty,T., McDevitt,D., Gurusiddappa,S., Höök,M., & Foster,T.J. (1998). The fibrinogen-binding MSCRAMM (clumping factor) of Staphylococcus aureus has a Ca<sup>2+</sup>-dependent inhibitory site. *Journal of Biological Chemistry*, 273(12), 6821-6829.
- O'Seaghda,M., van Schooten,C.J., Kerrigan,S.W., Emsley,J., Silverman,G.J., Cox,D., Lenting,P.J., & Foster,T.J. (2006). Staphylococcus aureus protein A binding to von Willebrand factor A1 domain is mediated by conserved IgG binding regions. *Febs Journal*, 273(21), 4831-4841.
- O'Brien,L., Kerrigan,S.W., Kaw,G., Hogan,M., Penades,J., Litt,D., Fitzgerald,D.J., Foster,T.J., & Cox,D. (2002). Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by Staphylococcus aureus: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Molecular Microbiology*, 44(4), 1033-1044.
- Ogawa,S.K., Yurberg,E.R., Hatcher,V.B., Levitt,M.A., & Lowy,F.D. (1985). Bacterial Adherence to Human-Endothelial Cells-Invitro. *Infection and Immunity*, 50(1), 218-224.
- Örem,C., Celik,S., Örem,A., Calapoglu,M., & Erdöl,C. (2002). Increased plasma fibronectin levels in patients with acute myocardial infarction complicated with left ventricular thrombus. *Thrombosis Research*, 105(1), 37-41.

- Palma, M., Hagggar, A., & Flock, J.I. (1999). Adherence of *Staphylococcus aureus* is enhanced by an endogenous secreted protein with broad binding activity. *Journal of Bacteriology*, 181(9), 2840-2845.
- Pankov, R. & Yamada, K.M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861-3863.
- Parren, P.W.H.I., Warmerdam, P.A.M., Boeijs, L.C.M., Arts, J., Westerdaal, N.A.C., Vlug, A., Capel, P.J.A., Aarden, L.A., & Vandewinkel, J.G.J. (1992). On the Interaction of Igg Subclasses with the Low Affinity Fc-Gamma-Riia (Cd32) on Human Monocytes, Neutrophils, and Platelets - Analysis of A Functional Polymorphism to Human Igg2. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), 1537-1546.
- Patel, A.H., Nowlan, P., Weavers, E.D., & Foster, T. (1987). Virulence of Protein-A-Deficient and Alpha-Toxin-Deficient Mutants of *Staphylococcus-Aureus* Isolated by Allele Replacement. *Infection and Immunity*, 55(12), 3103-3110.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGavin, M.J., & Höök, M. (1994). Mscramm-Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annual Review of Microbiology*, 48, 585-617.
- Pawar, P., Shin, P.K., Mousa, S.A., Ross, J.M., & Konstantopoulos, K. (2004). Fluid shear regulates the kinetics and receptor specificity of *Staphylococcus aureus* binding to activated platelets. *Journal of Immunology*, 173(2), 1258-1265.
- Peacock, S.J., Foster, T.J., Cameron, B.J., & Berendt, A.R. (1999). Bacterial fibronectin-binding proteins and endothelial cell surface fibronectin mediate adherence of *Staphylococcus aureus* to resting human endothelial cells. *Microbiology-Uk*, 145, 3477-3486.
- Peerschke, E.I.B., Reid, K.B.M., & Ghebrehiwet, B. (1994). Identification of A Novel 33-Kda C1Q-Binding Site on Human Blood-Platelets. *Journal of Immunology*, 152(12), 5896-5901.
- Peterson, P.K., Verhoef, J., Sabath, L.D., & Quie, P.G. (1977). Effect of Protein-A on *Staphylococcal* Opsonization. *Infection and Immunity*, 15(3), 760-764.
- Phonimdaeng, P., O'Reilly, M., Nowlan, P., Bramley, A.J., & Foster, T.J. (1990). The Coagulase of *Staphylococcus-Aureus* 8325-4 - Sequence-Analysis and Virulence of Site-Specific Coagulase-Deficient Mutants. *Molecular Microbiology*, 4(3), 393-404.
- Pietrocola, G., Schubert, A., Visai, L., Torti, M., Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., Reinscheid, D.J., & Speziale, P. (2005). FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. *Blood*, 105(3), 1052-1059.
- Plow, E.F., Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., Marguerie, G., & Ginsberg, M.H. (1987). Arginyl-Glycyl-Aspartic Acid Sequences and Fibrinogen Binding to Platelets. *Blood*, 70(1), 110-115.

- Plummer, C., Wu, H., Kerrigan, S.W., Meade, G., Cox, D., & Douglas, C.W.I. (2005). A serine-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb. *British Journal of Haematology*, 129(1), 101-109.
- Projan, S.J., & Novick, R.P. (1997). The molecular basis in pathogenicity. In Crossley, K.B. and Archer, G.L.: *The Staphylococci in Human disease*, Churchill Livingstone, New York, 55-82.
- Que, Y.A., Francois, P., Haefliger, J.A., Entenza, J.M., Vaudaux, P., & Moreillon, P. (2001). Reassessing the role of *Staphylococcus aureus* clumping factor and fibronectin-binding protein by expression in *Lactococcus lactis*. *Infection and Immunity*, 69(10), 6296-6302.
- Que, Y.A., Haefliger, J.A., Piroth, L., Francois, P., Widmer, E., Entenza, J.M., Sinha, B., Herrmann, M., Francioli, P., Vaudaux, P., & Moreillon, P. (2005). Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *Journal of Experimental Medicine*, 201(10), 1627-1635.
- Raugi, G.J., Mumby, S.M., Abbottbrown, D., & Bornstein, P. (1982). Thrombospondin - Synthesis and Secretion by Cells in Culture. *Journal of Cell Biology*, 95(1), 351-354.
- Rennemeier, C., Hammerschmidt, S., Niemann, S., Inamura, S., Zähringer, U. & Kehrel B.E. (2007). Thrombospondin-1 promotes cellular adherence of Gram-positive pathogens via recognition of peptidoglycan. *The FASEB Journal*, 21(12), 3118-3132.
- Recsei, P., Kreiswirth, B., O'Reilly, M., Schlievert, P., Gruss, A., & Novick, R.P. (1986). Regulation of Exoprotein Gene-Expression in *Staphylococcus-Aureus* by Agr. *Molecular & General Genetics*, 202(1), 58-61.
- Roben, P.W., Salem, A.N., & Silverman, G.J. (1995). V(H)3 Family Antibodies Bind Domain-D of Staphylococcal Protein-A. *Journal of Immunology*, 154(12), 6437-6445.
- Roberts, H.R., Hoffman, M., & Monroe, D.M. (2006). A cell-based model of thrombin generation. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 32, 32-38.
- Roche, F.M., Downer, R., Keane, F., Speziale, P., Park, P.W., & Foster, T.J. (2004). The N-terminal A domain of fibronectin-binding proteins A and B promotes adhesion of *Staphylococcus aureus* to elastin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38433-38440.
- Ruggeri, Z.M., Dent, J.A., & Saldivar, E. (1999). Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*, 94(1), 172-178.
- Ruggeri, Z.M. (1999). Structure and function of von Willebrand factor. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(2), 576-584.
- Ruggeri, Z.M. (2003). Von Willebrand factor. *Current Opinion in Hematology*, 10(2), 142-149.

- Sadler, J.E. (1998). Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 395-424.
- Saglio, S.D. & Slayter, H.S. (1982). Use of A Radioimmunoassay to Quantify Thrombospondin. *Blood*, 59(1), 162-166.
- Sakai, H., Goto, S., Kim, J.Y., Aoki, N., Abe, S., Ichikawa, N., Yoshida, M., Nagaoka, Y., & Handa, S. (2000). Plasma concentration of von Willebrand factor in acute myocardial infarction. *Thrombosis and Haemostasis*, 84(2), 204-209.
- Sakariassen, K.S., Bolhuis, P.A., & Sixma, J.J. (1979). Human-Blood Platelet-Adhesion to Artery Subendothelium Is Mediated by Factor-VIII-Vonwillebrand Factor Bound to the Subendothelium. *Nature*, 279(5714), 636-638.
- Savage, B. & Ruggeri, Z.M. (1991). Selective Recognition of Adhesive Sites in Surface-Bound Fibrinogen by Glycoprotein-IIb-IIIa on Nonactivated Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11227-11233.
- Savage, B., Shattil, S.J., & Ruggeri, Z.M. (1992). Modulation of Platelet-Function Through Adhesion Receptors - A Dual Role for Glycoprotein-IIb-IIIa (Integrin-Alpha(IIb)Beta(3) Mediated by Fibrinogen and Glycoprotein-Ib-Von-Willebrand Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 267(16), 11300-11306.
- Sawai, T., Tomono, K., Yanagihara, K., Yamamoto, Y., Kaku, M., Hirakata, Y., Koga, H., Tashiro, T., & Kohno, S. (1997). Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injection of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infection and Immunity*, 65(2), 466-471.
- Scandura, J.M. & Walsh, P.N. (1996). Factor X bound to the surface of activated human platelets is preferentially activated by platelet-bound factor IXa. *Biochemistry*, 35(27), 8903-8913.
- Schleifer, K.H. & Fischer, U. (1982). Description of A New Species of the Genus *Staphylococcus* - *Staphylococcus-Carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(2), 153-156.
- Schneewind, O., Fowler, A., & Faull, K.F. (1995). Structure of the Cell-Wall Anchor of Surface-Proteins in *Staphylococcus-Aureus*. *Science*, 268(5207), 103-106.
- Schwarz-Linek, U., Höök, M., & Potts, J.R. (2004). The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Molecular Microbiology*, 52(3), 631-641.
- Scott, J.P., Montgomery, R.R., & Retzinger, G.S. (1991). Dimeric Ristocetin Flocculates Proteins, Binds to Platelets, and Mediates Vonwillebrand Factor-Dependent Agglutination of Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8149-8155.
- Shenkman, B., Rubinstein, E., Tamarin, I., Dardik, R., Savion, N., & Varon, D. (2000). *Staphylococcus aureus* adherence to thrombin-treated endothelial cells is mediated by fibrinogen but not by platelets. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 135(1), 43-51.



- Sinha,B., Francois,P.P., Nusse,O., Foti,M., Hartford,O.M., Vaudaux,P., Foster,T.J., Lew,D.P., Herrmann,M., & Krause,K.H. (1999). Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha(5)beta(1). *Cellular Microbiology*, 1(2), 101-117.
- Sinha,B., Francois,P., Que,Y.A., Hussain,M., Heilmann,C., Moreillon,P., Lew,D., Krause,K.H., Peters,G., & Herrmann,M. (2000). Heterologously expressed Staphylococcus aureus fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and Immunity*, 68(12), 6871-6878.
- Sinha,B. & Herrmann,M. (2005). Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *Thrombosis and Haemostasis*, 94(2), 266-277.
- Smith,P.K., Krohn,R.I., Hermanson,G.T., Mallia,A.K., Gartner,F.H., Provenzano,M.D., Fujimoto,E.K., Goeke,N.M., Olson,B.J., & Klenk,D.C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Spehr, N. (2001). Interaktion von Staphylokokken mit Thrombozyten in der Pathogenese endovaskulärer Infektionen: Zell- und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Speziale,P., Joh,D., Visai,L., Bozzini,S., HousePompeo,K., Lindberg,M., & Höök,M. (1996). A monoclonal antibody enhances ligand binding of fibronectin MSCRAMM (adhesin) from Streptococcus dysgalactiae. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1371-1378.
- Sporn,L.A., Chavin,S.I., Marder,V.J., & Wagner,D.D. (1985). Biosynthesis of Von Willebrand Protein by Human Megakaryocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 76(3), 1102-1106.
- Sporn,L.A., Marder,V.J., & Wagner,D.D. (1986). Inducible Secretion of Large, Biologically Potent Von-Willebrand-Factor Multimers. *Cell*, 46(2), 185-190.
- Stutzmann Meier,P., Entenza,J.M., Vaudaux,P., Francioli,P., Glauser,M.P., & Moreillon,P. (2001). Study of Staphylococcus aureus pathogenic genes by transfer and expression in the less virulent organism Streptococcus goldonii. *Infection and Immunity*, 69(2), 657-664.
- Sullam,P.M., Drake,T.A., & Sande,M.A. (1985). Pathogenesis of Endocarditis. *American Journal of Medicine*, 78(6B), 110-115.
- Sullam,P.M. (1994). Host-Pathogen Interactions in the Development of Bacterial-Endocarditis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 7(3), 304-309.
- Sullam,P.M., Bayer,A.S., Foss,W.M., & Cheung,A.L. (1996). Diminished platelet binding in vitro by Staphylococcus aureus is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infection and Immunity*, 64(12), 4915-4921.

- Tuszynski, G.P., Srivastava, S., Switalska, H.I., Holt, J.C., Cierniewski, C.S., & Niewiarowski, S. (1985). The Interaction of Human-Platelet Thrombospondin with Fibrinogen - Thrombospondin Purification and Specificity of Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 260(22), 2240-2245.
- Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L., & Lindberg, M. (1984). Complete Sequence of the Staphylococcal Gene Encoding Protein-A - A Gene Evolved Through Multiple Duplications. *Journal of Biological Chemistry*, 259(3), 1695-1702.
- Varstela, E. (1998). Personal follow-up of 100 aortic valve replacement patients for 1081 patient years. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae*, 87(3), 205-212.
- Vaudaux, P.E., Francois, P., Proctor, R.A., McDevitt, D., Foster, T.J., Albrecht, R.M., Lew, D.P., Wabers, H., & Cooper, S.L. (1995). Use of Adhesion-Defective Mutants of *Staphylococcus aureus* to Define the Role of Specific Plasma-Proteins in Promoting Bacterial Adhesion to Canine Arteriovenous Shunts (Vol 63, Pg 585, 1995). *Infection and Immunity*, 63(8), 3239.
- Veltrop, M.H.A.M., Beekhuizen, H., & Thompson, J. (1999). Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. *Infection and Immunity*, 67(11), 6130-6138.
- von Eiff, C., Becker, K., Machka, K., Stammer, H. & Peters, G. (2001). Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *New England Journal of Medicine*, 344(1), 11-16.
- Walsh, E.J., O'Brien, L.M., Liang, X.W., Höök, M., & Foster, T.J. (2004). Clumping factor B, a fibrinogen-binding MSCRAMM (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) adhesin of *Staphylococcus aureus*, also binds to the tail region of type I cytokeratin 10. *Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 50691-50699.
- Wann, E.R., Gurusiddappa, S., & Höök, M. (2000). The fibronectin-binding MSCRAMM FnbpA of *Staphylococcus aureus* is a bifunctional protein that also binds to fibrinogen. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13863-13871.
- Warmerdam, P.A.M., Vandewinkel, J.G.J., Vlug, A., Westerdal, N.A.C., & Capel, P.J.A. (1991). A Single Amino-Acid in the 2Nd Ig-Like Domain of the Human Fc-Gamma Receptor-1 Is Critical for Human IgG2 Binding. *Journal of Immunology*, 147(4), 1338-1343.
- Wiechelman, K.J., Braun, R.D., & Fitzpatrick, J.D. (1988). Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay - Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Analytical Biochemistry*, 175(1), 231-237.
- Wolff, R., Plow, E.F., & Ginsberg, M.H. (1986). Interaction of Thrombospondin with Resting and Stimulated Human-Platelets. *Journal of Biological Chemistry*, 261(15), 6840-6846.

- Wolz,C., Pohlmann-Dietze,P., Steinhuber,A., Chien,Y.T., Manna,A., van Wamel,W., & Cheung,A. (2000). Agr-independent regulation of fibronectin-binding protein(s) by the regulatory locus sar in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 36(1), 230-243.
- Wu,K.K. & Thiagarajan,P. (1996). Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annual Review of Medicine*, 47, 315-331.
- Xia,Z., Wong,T., Liu,Q., KasirerFriede,A., Brown,E., & Frojmovic,M.M. (1996). Optimally functional fluorescein isothiocyanate-labelled fibrinogen for quantitative studies of binding to activated platelets and platelet aggregation. *British Journal of Haematology*, 93(1), 204-214.
- Xiong,Y.Q., Bayer,A.S., & Yeaman,M.R. (2002). Inhibition of intracellular macromolecular synthesis in *staphylococcus aureus* by thrombin-induced platelet microbicidal proteins. *Journal of Infectious Diseases*, 185(3), 348-356.
- Yeaman,M.R., Tang,Y.Q., Shen,A.J., Bayer,A.S., & Selsted,M.E. (1997). Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infection and Immunity*, 65(3), 1023-1031.
- Yeaman,M.R., Bayer,A.S., Koo,S.P., Foss,W., & Sullam,P.M. (1998). Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 178-187.



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Wünnenberg, Institut für Zoologie, Kiel, danke ich herzlich für die Betreuung im Fachbereich Biologie, für seine Unterstützung und für sein Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. B. Kehrel, Experimentelle und Klinische Hämostaseologie, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Münster, für die Stellung des interessanten Themas, für ihre intensive Betreuung, die stets engagierten und hilfreichen Diskussionen im experimentellen und theoretischen Bereich und für ihren Beistand bei allen Problemen.

Frau PD. Dr. rer. nat. C. Heilmann und Dr. rer. nat. Claudia Neumann, Medizinische Mikrobiologie, Münster, danke ich für alle Hilfen bei mikrobiologischen Fragestellungen.

Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen in der Medizinischen Mikrobiologie, Münster, insbesondere I. Bleiziffer, K. Broschwig, S. Deiwick, A. Eggemann, C. Fehrmann, N. Hirschhausen, D. Kuhn, K. Schörmann, G. Seidel und S. Weber danke ich für die Vorbereitung der *S. aureus* Übernachtskulturen, ihrer Hilfe bei mikrobiologischen Problemen und all die freundlichen Gespräche.

Herrn Prof. Dr. S. Hammerschmidt, Max von Pettenkofer-Institut, München, und Dr. rer. nat. C. Rennemeier, Universitäts-Frauenklinik Würzburg, beide ehemals Zentrum für Infektionsforschung, Würzburg, danke ich für die Einführung in die Methode der Infektion von Endothelzellen mit *S. aureus* mit anschließender Doppelimmunfluoreszenzfärbung, außerdem für die Bereitstellung von *S. pneumoniae* Stämmen.

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für Experimentelle und Klinische Hämostaseologie der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin für das herzliche Arbeitsklima, die bereitwillige Hilfe bei fachbezogenen und fachübergreifenden Problemen und all die vielen Blutspenden. Insbesondere danke ich Frau A. Bertling, Frau K. Herken, Frau Dr. med. A. G. Herminghaus, Frau M. Horn, Frau Dr. rer. nat. K. Jurk, Frau U. Niehues, Frau T. Pohlkamp, Frau S. Schäfers, Frau A. Schulte, Herrn Dr. rer. nat. M. F. Brodde

Daniel, ich danke Dir, dass Du immer an meiner Seite bist und mich während der Promotionszeit so sehr unterstützt hast. Akascha, Dir danke ich, dass du es mir immer wieder verzeihen hast, wenn ich mich im Arbeitszimmer eingeschlossen habe, statt mit Dir zu spielen oder zu schmusen. Henri, bei Dir entschuldige ich mich, dass Du schon in meinem Bauch den Stress mit dem Zusammenschreiben der Arbeit zu spüren bekommen hast und das Stillkissen oftmals mit Artikeln oder Lehrbüchern teilen musstest.

## Lebenslauf

Name: Silke Niemann, geb. Engelbert

geboren: 31.8.1973 in Osnabrück

Eltern: Horst Engelbert  
Ursula Engelbert, geb. Lausmann

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Schulausbildung: 1980 – 1984, Grundschule, Wallenhorst  
1984 – 1986, Orientierungsstufe Thomas-Morus-Schule, Osnabrück  
1986 – 1993, Gymnasium Angelaschule, Osnabrück

Schulabschluss: 1993, Abitur

Auslandsaufenthalt: September 1993 – Juni 1994, England

Hochschulstudium: Oktober 1994 – September 2000, Biologie, Diplom  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,  
12 Semester

Oktober 1996, Diplom-Biologen-Vorprüfung  
17. August 2000: Diplom-Biologen-Prüfung

Tätigkeiten: Stellen als studentische Hilfskraft zur  
Betreuung von Studierenden in botanischen  
Grundkursen und in meeresökologischen  
Untersuchungen an der Christian-Albrechts-  
Universität zu Kiel

seit Oktober 2000, wissenschaftliche Mitarbeiterin  
in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und  
operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum  
Münster, Experimentelle und Klinische  
Hämostaseologie

Hagen a.T.W.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ebenfalls versichere ich, dass die Arbeit nach Form und Inhalt, abgesehen von der Beratung durch Frau Prof. Kehrel, meiner Betreuerin, und durch Herrn Prof. Wünnenberg, meinem Doktorvater, meine eigene Arbeit ist. Sie ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden. Sie wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Dies ist mein einziges und bisher erstes Promotionsverfahren.

Hagen a.T.W.

Silke Niemann