

Aus der medizinischen Klinik II
für Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor. Prof. Dr. med. I. Eitel

**Analyse des Einflusses von Pathogenitätsfaktoren des
Bakteriums Staphylokokkus aureus auf die
Thrombozytenfunktion**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- **Aus der Sektion Medizin** –

Vorgelegt von
Johanna Templin
aus Tübingen

Lübeck
2026

Meinen Eltern

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Harald F. Langer

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dennis Nurjadi

Tag der mündlichen Prüfung: 28.04.2026

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 29.04.2026

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	INFEKTÖSE ENDOKARDITIS.....	5
1.1.1	ALLGEMEINES	5
1.1.2	PATHOGENESE DER INFEKTÖSEN ENDOKARDITIS	5
1.2	THROMBOZYTEN.....	8
1.2.1	ÜBERBLICK	8
1.2.2	ROLLE IN DER BLUTGERINNUNG	8
1.2.3	ROLLE IN IMMUNOLOGISCHEN PROZESSEN	9
1.2.4	INTERAKTIONEN MIT DEM KOMPLEMENTSYSTEM	10
1.3	STAPHYLOKOKKUS AUREUS	11
1.3.1	HÄMOLYSIN α	12
1.3.2	LIPOTEICHONSÄURE	14
1.3.3	INTERAKTION ZWISCHEN PATHOGENITÄTSFAKTOREN UND THROMBOZYT.....	16
1.4	ZIELE DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG.....	18
2	<u>METHODEN</u>	19
2.1	MATERIALGEWINN.....	19
2.1.1	HUMANES BLUT	19
2.1.2	VERWENDETE MAUSSTÄMME UND DEREN HALTUNG.....	19
2.1.3	THROMBOZYTENISOLATION	20
2.2	PROBENANALYSE	21
2.2.1	ELISA LESEGERÄT MICROPLATE READER 550.....	21
2.2.2	DURCHFLUSSZYTOMETRIE	22
2.2.3	MIKROSKOPIE.....	22
2.3	VERSUCHE	23
2.3.1.	VERSUCHE MIT HUMANEN THROMBOZYTEN	23

2.3.2	VERSUCHE MIT MURINEN THROMBOZYTEN	29
3.	<u>STATISTISCHE METHODEN</u>	31
4.	<u>RESULTATE</u>	32
4.1.	VERSUCHE MIT HÄMOLYSIN α AUF FIBRINOGEN	32
4.1.1.	UNTERSUCHUNG DER TOXISCHEN WIRKUNG VON HÄMOLYSIN α AUF HUMANE THROMBOZYTEN	32
4.1.2.	ADHÄSIONSVERHALTEN HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN α	34
4.1.3.	ADHÄSIONSVERHALTEN HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION VON FIBRINOGEN MIT HÄMOLYSIN α ..	35
4.1.4.	VERGLEICH DES ADHÄSIONSVERHALTENS HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN α AUF FIBRONECTIN UND KOLLAGEN	37
4.2.	VERSUCHE MIT LIPOTEICHONSÄURE AUF FIBRINOGEN	39
4.2.1.	UNTERSUCHUNG DER TOXISCHEN WIRKUNG VON LIPOTEICHONSÄURE AUF HUMANE THROMBOZYTEN	39
4.2.2.	ADHÄSIONSVERHALTEN HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE	40
4.2.3.	ADHÄSIONSVERHALTEN HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION VON FIBRINOGEN MIT LIPOTEICHONSÄURE.....	40
4.2.4.	VERGLEICH DES ADHÄSIONSVERHALTENS HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE AUF FIBRONECTIN UND KOLLAGEN	41
4.3.	VERSUCHE MIT KOMPLEMENTINHIBITOREN	43
4.3.1.	ROLLE VON C3A-/C5A-REZEPTORANTAGONISTEN BEI DER THROMBOZYTENADHÄSION UNTER HÄMOLYSIN- α -EXPOSITION	43
4.3.2.	ROLLE VON C3A-/C5A-REZEPTORANTAGONISTEN BEI DER THROMBOZYTENADHÄSION UNTER LIPOTEICHONSÄURE-EXPOSITION	44
4.3.3.	EINFLUSS VON COMPSTATIN AUF DIE HÄMOLYSIN- α -INDUZIERTER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG	45
4.3.4.	EINFLUSS VON COMPSTATIN AUF DIE LIPOTEICHONSÄURE-INDUZIERTER THROMBOZYTENAKTIVIERUNG	46
4.4.	VERSUCHE MIT MURINEN THROMBOZYTEN.....	48
4.4.1.	ADHÄSIONSVERHALTEN MURINER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN α	48
4.4.2.	ADHÄSIONSVERHALTEN MURINER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE	50
4.5.	MIKROSKOPISCHE KONTROLLE.....	51
5.	<u>DISKUSSION.....</u>	52

6.	ZUSAMMENFASSUNG	64
7.	LITERATURVERZEICHNIS	65
8.	ANHANG.....	74
8.1	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
8.2	MATERIALIEN.....	76
8.2.1	GERÄTE.....	76
8.2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	77
8.2.3	LÖSUNGEN, MEDIEN, REAGENZIEN, PROTEINE	78
8.2.4	PUFFER	79
8.2.5	VERSUCHSTIERE	80
8.3	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	81
9	DANKSAGUNG	83
10	LEBENS LAUF	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1 Einleitung

1.1 Infektiöse Endokarditis

1.1.1 Allgemeines

Eine gefürchtete Erkrankung des Herzens ist die Endokarditis. Auch intrathorakale Gefäße und intrakardiale Strukturen wie Herzklappen können betroffen sein (Horstkotte et al. 2004; Thiene & Basso 2006). Man unterscheidet die infektiöse von der nicht-infektiösen Endokarditis. Der Begriff Endokarditis umfasst auch endokardiomyokardiale Fibrosen, medikamentös induzierte Herzklappenveränderungen und Mischformen. Meist ist die infektiöse Endokarditis bakterieller Genese, seltener wird sie auch verursacht durch Pilzinfektionen. Die Inzidenz der infektiösen Endokarditis liegt in Westeuropa bei 3:100.000/Jahr und Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Einher mit der Erkrankung gehen unterschiedliche Symptome, wie „Fieber, Herzgeräusche, Bakteriämie, Splenomegalie und Embolien“ (Herold et al. 2021). Unbehandelt endet die Erkrankung oft letal, weshalb immer medikamentöse und teilweise auch operative Maßnahmen erforderlich sind. Darüber hinaus gibt es zahlreiche Indikationen für eine prophylaktische Behandlung mit Antibiotika zur Vorbeugung einer Endokarditis, zum Beispiel nach einer Herzoperation. In den letzten Jahren nahm der Anteil Antibiotika-resistenter Bakterienstämme zu, weshalb es in größtem Interesse ist, neben der Therapie mit Antibiotika alternative Medikamente einzusetzen (Que & Moreillon 2011). Zur Entwicklung anderer Therapiekonzepte ist es erforderlich, tiefer in die Pathophysiologie der infektiösen Endokarditis einzusteigen und Interaktionen mit Bakterien genauer zu betrachten.

1.1.2 Pathogenese der infektiösen Endokarditis

Während der Entstehung eines entzündlichen Prozesses am Herzen spielen viele verschiedene Faktoren eine Rolle. Weder die genaue Reihenfolge noch sämtlich beteiligte Bestandteile sind bisher vollständig geklärt (Liesenborghs et al. 2019). Zum genauen Verständnis der Prozesse ist die Kenntnis des anatomischen Schichtaufbaus unerlässlich (Abbildung 1). Die innerste Schicht ist das Endokard, gefolgt von der muskulären Schicht, dem Myokard. Außen befindet sich schützend das Epikard. Relevant für die Entstehung der Endokarditis sind die drei Schichten, in die sich das Endokard weiter gliedern lässt: Die Endothelschicht, das Stratum

subendotheliale und das Stratum myoelasticum (Lüllmann-Rauch & Asan 2019). Eine Theorie zur Pathogenese der Endokarditis nimmt an, dass zunächst eine endotheliale Läsion vorliegt (Thiene & Basso 2006). Diese entsteht etwa durch mechanischen Stress. Es gibt Prädilektionsstellen, an denen bevorzugt solche Läsionen entstehen können. Außerdem spielen bestehende Malformationen des Herzens eine Rolle, wie etwa eine hypertrophe Kardiomyopathie. An bestehenden Läsionen können vorbeifließende sterile Mikrothromben haften. Formal handelt es sich bei dieser Ablagerung bereits um eine thrombotische Vegetation (Lambertz et al. 2007). Kommt es nun durch verschiedene Ursachen, wie beispielsweise eine Infektion eines liegenden Katheters oder etwa durch intravenösen Drogenabusus, zur Ansiedlung von Bakterien im Blut, also einer Bakteriämie, besteht ein optimales Milieu für die Bakterien, um am Endokard zu adhären (Abbildung 2). Weitere wichtige Faktoren sind die generelle Fähigkeit des Erregers zur Adhäsion an thrombotisches Material, extrazelluläre Komponenten wie Fibrinogen oder Fibronectin, die am Adhäsionsprozess beteiligt sind, und außerdem das Verhalten der Thrombozyten in Gegenwart von Bakterien (Becker, DiBello & Lucas 1987). Diese genannten Mechanismen sollen in dieser Arbeit weiter untersucht werden. Außerdem sind im Gesamtprozess weitere Entzündungszellen, wie neutrophile Granulozyten, beteiligt, die durch Bildung von sogenannten „Neutrophil Extracellular Traps“ (NET), Netze aus extrazellulären Fasern und neutrophilen Granulozyten, zur Vegetationsbildung beitragen und Plättchenadhäsion und –aggregation verstärken können (Jung et al. 2015). Schließlich kann eine destruiende Vegetation am Herzen entstehen (Abbildung 2). Diese führt zu unterschiedlichen Folgeerscheinungen, wie Destruktionen der Klappensegel, Abszessbildungen und Behinderungen des Blutflusses. Je nach Lokalisation der Vegetation sind unterschiedliche Komplikationen zu erwarten (Steckelberg et al. 1991). Diese sind meist gravierend, weshalb es in großem Interesse ist, frühzeitig und effektiv zu therapieren.

Aufbau der Herzwand

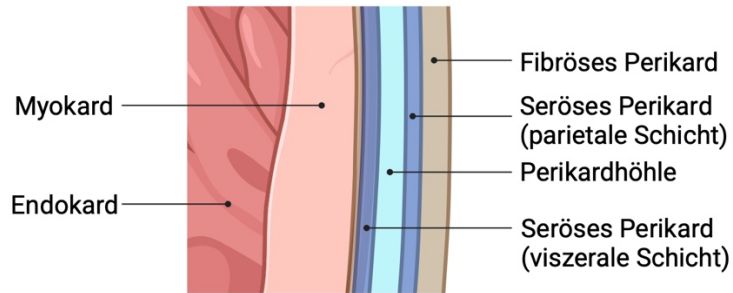


ABBILDUNG 1: SCHICHTAUFBAU DES HERZENS

Vereinfachte Darstellung der einzelnen Schichten der Herzwand von innen nach außen.

Abbildung erstellt mit Biorender.com.

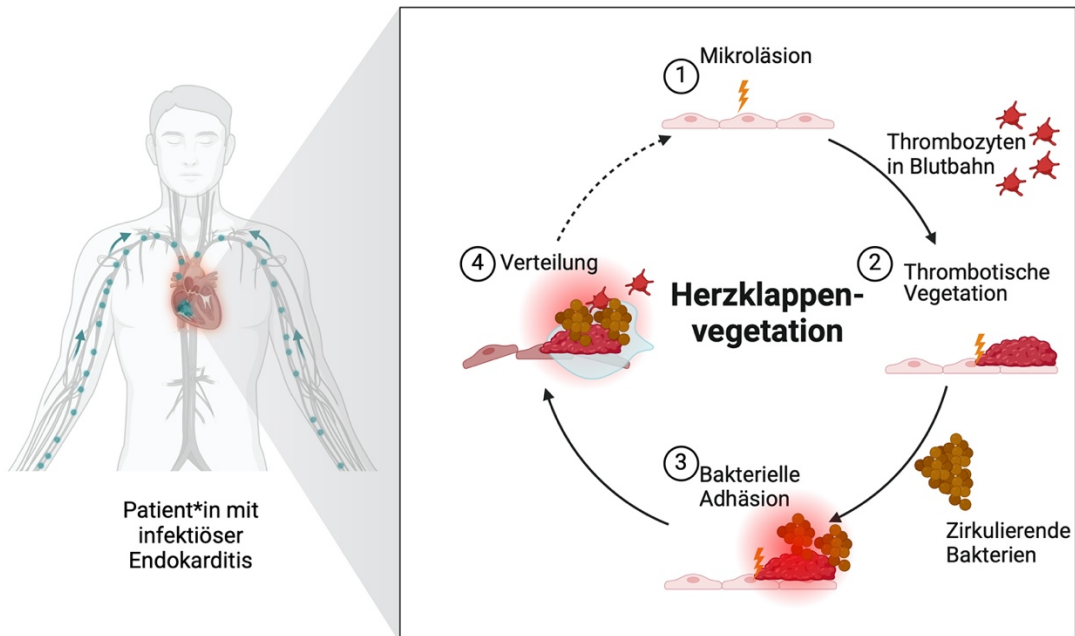


ABBILDUNG 2: ENTSTEHUNG EINER HERZKLAPPENVEGETATION

Durch äußere Einflüsse entstehen Mikroläsionen am Endothel. Zirkulierende Thrombozyten sowie Bakterien können an dieser Prädilektionsstelle adhären. Es kann zur weiteren Ausbreitung und Verteilung der Thrombozyten-Bakterien-Aggregate im Körper kommen.

Abbildung erstellt mit Biorender.com.

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Überblick

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellen, die durch Abschnürung aus Megakaryozyten entstehen. Diese stammen wiederum von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Ein äquivalenter Begriff ist Blutplättchen und im Folgenden sind die gleichen Zellen gemeint, wenn zwischen den Begriffen gewechselt wird. Der Mensch hat 150 000 – 300 000 Thrombozyten pro μl im Blut. Sie haben verschiedene Funktionen und sind essenziell für die Blutgerinnung (Behrends et al. 2021). Neben ihren Funktionen bei der Blutgerinnung spielen sie eine wichtige Rolle bei immunologischen Prozessen (Klinger & Jelkmann 2002), tragen zum Gewebeumbau bei und scheinen in arteriosklerotischen Vorgängen beteiligt zu sein (Sauter et al. 2018; Sauter et al. 2019).

1.2.2 Rolle in der Blutgerinnung

Eine wichtige und die wahrscheinlich bekannteste Funktion ist die Rolle im Blutgerinnungssystem. Der Gerinnungsprozess wird in die primäre und sekundäre Hämostase unterteilt. Thrombozyten spielen bei beiden Vorgängen eine große Rolle. Zum Verständnis der im folgenden Teil vorgestellten Untersuchungen, müssen verschiedene Begriffe differenziert werden, die an der primären Hämostase beteiligt sind. Diese läuft in unterschiedlichen Phasen ab, die aufeinander aufbauen. Zunächst erfolgt die Thrombozytenadhäsion. Das bedeutet, dass sich die Thrombozyten auf der subendothelialen Matrix des Gewebeschadens anlagern. Beteiligt sind hierbei unter anderem subendotheliale Bindegewebsfasern, wie etwa Kollagen, Fibronectin und Laminin, und der von-Willebrand-Faktor (vWF), der die freiliegende Matrix mit den Thrombozyten verbindet und an den vWF-Rezeptor (GPIb-IX-V-Rezeptorkomplex) auf Thrombozyten bindet. Darüber hinaus scheint außerdem Glykoprotein-IIb-IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin) und auch GP-VI bei der Plättchenadhäsion beteiligt zu sein (siehe Abbildung 3) (Moroi, Okuma & Jung 1992; Takahashi & Moroi 2001; Ni & Freedman 2003; Yang et al. 2006; Wang, Gallant & Ni 2016). Auf diesen Schritt folgt die Thrombozytenaktivierung, die vor allem durch den vWF und subendotheliales Kollagen ausgelöst wird. Es werden die in Thrombozyten gespeicherten δ -Granula freigesetzt, die ADP freisetzen, das über den ADP(P2Y₁₂)-Rezeptor auf anderen Thrombozyten zur weiteren Aktivierung führt. Es werden weitere Botenstoffe, wie Thromboxan A₂, freigesetzt. Außerdem sind die Stoffe Thrombin, PAF (Plättchen-

aktivierender Faktor) und Adrenalin zu nennen, die ebenfalls zur Aktivierung beitragen können. Nun kommt es zur Thrombozytenaggregation, bei der die Thrombozyten verklumpen und einen weißen Thrombus bilden. Dabei bilden sich Pseudopodien aus. Zudem relevant sind vor allem Fibrinogen aus dem Blutplasma und der Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten (GPIIb-IIIa-Rezeptor), durch den Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten entstehen. Diese Vorgänge führen dann zur sekundären Hämostase, die zum Verständnis dieser Arbeit jedoch nicht im Detail relevant ist. Sämtliche genannte Bestandteile spielen auch außerhalb der primären Hämostase in physiologischen und pathophysiologischen Abläufen eine Rolle und sind daher Gegenstand vieler Forschungsarbeiten (Moroi & Jung 1998; Romo et al. 1999; Frenette et al. 2000; Jurk et al. 2003; Cox, Kerrigan & Watson 2011).

1.2.3 Rolle in immunologischen Prozessen

In der vorliegenden Arbeit soll es aufgrund der durchgeführten Versuche vorrangig um Bakterien gehen, wenn von „Pathogenen“ gesprochen wird.

Neben bereits erwähnten Funktionen ist bekannt, dass Thrombozyten antimikrobielle Eigenschaften besitzen und daher in Pathogen-assoziierten Vorgängen, wie etwa der infektiösen Endokarditis, beteiligt sind. Umgekehrt scheint die Infektanfälligkeit bei Patienten mit geringerer Plättchenanzahl höher zu sein (Nørgaard et al. 2011). Plättchen haben Toll-like-Rezeptoren (TLR). Toll-like-Rezeptoren erkennen spezielle bakterielle Muster und der Organismus kann mit Abwehrmechanismen reagieren. Außerdem können Thrombozyten antimikrobielle Peptide, wie beispielsweise Defensine, die in α -Granula enthalten sind oder auch Chemokine freisetzen (Yeaman 2019). Teilweise wird ihnen sogar eine „überwachende“ Funktion hinsichtlich des Immunsystems zugeordnet, was auch wiederum auf das Vorhandensein bereits erwähnter Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zurückgeführt wird. TLRs scheinen darüber hinaus eine Rolle in kanzerogenen Vorgängen und Atherosklerose zu spielen. Daneben werden Thrombozyten weitere Interaktionen mit Immunzellen, wie mit dendritischen Zellen, Monozyten oder auch Lymphozyten, zugeschrieben. Dadurch kommt es zu immunmodulatorischen Vorgängen, wie Rekrutierung weiterer Immunzellen. Auch direkte Interaktionen von Thrombozyten mit Pathogenen konnten beobachtet werden. Durch eine direkte Bindung der Thrombozyten an Pathogene kann eine Elimination erfolgen oder die Ausbreitung der Pathogene im Organismus verhindert werden und die Immunantwort eingeleitet werden. Im Rahmen der Bakterien-Plättchen-

Interaktionen konnte außerdem festgestellt werden, dass die Plättchenadhäsion und -aggregation verändert werden. Je nach Bakterium scheint eher die Adhäsions- oder die Aggregationsreaktion betroffen zu sein. Die aufgezeigten Funktionen von Thrombozyten schützen den Organismus also vor äußeren Einflüssen und auch gegen Bakterien, wie etwa *Staphylokokkus aureus* (Wuescher, Takashima & Worth 2015; Li, Ni & Li 2020; Leeten et al. 2021).

Auf der anderen Seite tragen sie zur Bildung von Thromben bei, die Entzündungsreaktionen unterstützen können. Als Beispiel sei hier wieder die infektiöse Endokarditis erwähnt, bei der Herzklappenvegetationen zur Entstehung beitragen und dabei Thromben ein Milieu für Bakterien schaffen (Thiene & Basso 2006; Liesenborghs et al. 2019; Leeten et al. 2021). Es wird sogar von "Bakterien-Plättchen-Aggregaten" gesprochen, die in Herzklappenvegetationen beobachtet wurden, an die sich neutrophile Granulozyten anlagern können und die Vegetation weiter vergrößern durch Rekrutierung weiterer Zellen (Durack 1975; Herzberg 1996; Schubert et al. 2011; Kim et al. 2014). Um den genaueren immunologischen Mechanismen der Thrombozyten und deren Verhalten bei der Interaktion mit Bakterien nachzugehen, muss in diesem Bereich mehr geforscht werden. Diese Arbeit soll einen Beitrag dazu leisten.

1.2.4 Interaktionen mit dem Komplementsystem

Das Komplementsystem gehört zum angeborenen Immunsystem und setzt sich aus neun verschiedenen Komplementfaktoren (C1-9) zusammen, die sich in einer kaskadenartigen Reihenfolge aktivieren und eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen spielen. Im Laufe der Komplementkaskade können die Faktoren weiter gespalten werden. Die Spaltprodukte, wie etwa C3a und C3b, erfüllen unterschiedliche Funktionen und induzieren Entzündungsmediatoren bzw. führen zur weiteren Aktivierung der Kaskade. Das Komplementsystem trägt insgesamt zur Lyse von Pathogenen, zur Markierung dieser und zur Aktivierung von Leukozyten bei und kann die Gefäßpermeabilität steigern (Behrends et al. 2021). Primär ist es daher im Kontext immunologischer Vorgänge bekannt. In einigen Arbeiten konnte jedoch bereits ein Zusammenhang zwischen Thrombozyten und dem Komplementsystem hergestellt werden. Komplementfaktoren binden an Komplementrezeptoren, die auf unterschiedlichen Zellen exprimiert werden. So bindet beispielsweise der Komplementfaktor C3a an den C3a-Rezeptor (C3aR), der auf Thrombozyten

gefunden werden konnte. Thrombozyten zeigen ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten, je nachdem, ob der Rezeptor vorhanden ist (Hof et al. 2004; Sauter et al. 2018). Auch die Aggregation scheint beeinflusst zu werden. So wurde ein Anstieg der Aggregation nach Co-Stimulation mit ADP und C3a beobachtet im Vergleich zur Probe ohne C3a. Auch in der Gerinnungskaskade scheint C3aR eine Rolle zu spielen. Es konnte eine verlängerte Blutungszeit bei Fehlen des Rezeptors in C3aR/--Mäusen bzw. bei Fehlen des Komplementrezeptors C3 beobachtet werden (Gushiken et al. 2009; Sauter et al. 2019). Außerdem konnte eine weitere Arbeit zeigen, dass Thrombozyten in Zusammenhang mit dem Komplementsystem zum Transport hämatogen übertragener Bakterien zu dendritischen Zellen beitragen, durch die die adaptive Immunantwort eingeleitet wird. Andererseits umgehen die Bakterien dabei körpereigene Phagozyten, wodurch die unspezifische Immunabwehr an Bedeutung verliert (Verschoor et al. 2011). Auch bei weiteren kardiologischen Erkrankungen, wie der inflammatorischen Kardiomyopathie, liegt die Vermutung nahe, dass die Expression von C3aR schützend vor einem ernsteren kardialen Ereignis sein könnte (Mueller et al. 2018). Offensichtlich sind also Prozesse zwischen Thrombozyten, dem Komplementsystem und Pathogenen vorhanden, weshalb in dieser Arbeit auch Interaktionen mit dem Komplementsystem untersucht werden. Dabei soll neben dem Komplementfaktor C3, beziehungsweise dem C3a-Rezeptor, auch der C5a-Rezeptor Erwähnung finden.

1.3 Staphylokokkus aureus

Eines der bedeutendsten und weit verbreitetsten Bakterien überhaupt ist Staphylokokkus aureus. Das Bakterium bietet ein breites Spektrum unterschiedlich schwerwiegender Infektionen, kommt ubiquitär vor und betrifft ambulant und auch nosokomial erworbene Infektionen (Maguire et al. 1996). Es bildet durch unterschiedliche Mechanismen Resistenzen und liegt im Interesse bei der Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen. Ein schwerwiegendes Krankheitsbild, das häufig auf Staphylokokkus aureus zurückzuführen ist, ist die bereits vorgestellte infektiöse Endokarditis (Daga et al. 2011). Man geht davon aus, dass das Bakterium viele verschiedene Mechanismen besitzt, um sich im Organismus auszubreiten und dem Immunsystem zumindest teilweise entkommen kann. Besonders interessant für diese Arbeit ist außerdem, dass das Bakterium Plättchenadhäsion und -aggregation beeinflussen zu scheint und Bakterium-Plättchen-Aggregate in Herzklappenvegetationen zu

finden sind (Jung et al. 2015). Im Folgenden werden zwei Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums im Detail vorgestellt, die mit an der Entstehung der Endokarditis beteiligt sein könnten.

1.3.1 Hämolysin α

Staphylokokkus aureus sezerniert zahlreiche Toxine. Diese führen unter anderem zu Gewebeschäden am betroffenen Organismus und erleichtern die Ausbreitung des Pathogens im Organismus. Sie werden (bei kultureller Anzucht) bevorzugt nach der exponentiellen und während der stationären Phase im bakteriellen Vermehrungszyklus gebildet (Cheung et al. 1994; Divyakolu et al. 2019). Ein wichtiges, aber noch nicht vollständig verstandenes Toxin, ist das Exotoxin Hämolysin α . Ein Synonym dafür ist α -Toxin und im Folgenden werden beide Begriffe verwendet. Bereits seit 1800 waren Forscher:innen an Toxinen von Staphylokokkus aureus interessiert. Namensgebend war damals die Eigenschaft des Toxins, Erythrozyten zu lysieren und somit Hämolyse zu betreiben. Nach und nach stellte man aber fest, dass das Toxin ein wesentlich breiteres Spektrum an Mechanismen im Wirtsorganismus erfüllt (Berube & Wardenburg 2013). In der vorliegenden Arbeit soll besonders der Interaktion des Toxins mit humanen und murinen Thrombozyten Beachtung geschenkt werden. Dabei liegt der Fokus auf dem Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach Toxinkontakt und es soll darüber hinaus in Erwägung gezogen werden, ob das Komplementsystem den Adhäsionsprozess beeinflussen könnte. Nach aktuellem Wissensstand scheint hinsichtlich der infektiösen Endokarditis auch ein Zusammenhang zu Toxin-bildendem Staphylokokkus aureus zu bestehen (Schubert et al. 2011).

Zum Verständnis von Hämolysin α lohnt sich die kurze Auseinandersetzung mit der charakteristischen Form, die ihm destruirende Eigenschaften verleiht. Der Bauplan dafür findet sich auf dem Bakterienchromosom (Brown & Pattee 1980). Hämolysin α ist ein wasserlösliches Heptamer aus 293 Aminosäuren mit beta-Faltblatt-Struktur. Es besteht aus drei Strukturanteilen (Cap-/Rim-/Stem-Anteil), deren Zusammenspiel den Kontakt mit der Zellmembran und die Porenbildung ermöglicht. Dadurch strömen unkontrolliert kleine Moleküle und Elektrolyte, wie etwa Calcium oder Kalium, in die betroffene Wirtszelle hinein oder aus ihr hinaus und bringen dadurch die zelluläre Homöostase aus dem Gleichgewicht (Berube & Wardenburg 2013; Hoven et al. 2019). Relevant sind dabei Rezeptoren auf der Zellmembran, ohne die die Bindung der Membran so nicht möglich wäre. In der Literatur ist

größtenteils von ADAM10 die Rede, wobei aber angenommen wird, dass andere Rezeptoren ebenfalls eine Rolle spielen könnten (Wilke & Wardenburg 2010; Divyakolu et al. 2019). Erwähnung findet hierbei α -5- β -1-Integrin (ein Fibronectin-Rezeptor) und weitere Integrine (Schubert et al. 2011). Von größter Bedeutung scheint aber ADAM10 zu sein. ADAM10 ist eine Zink-abhängige Metalloprotease und auf vielen verschiedenen Zellen zu finden. Die Interaktion mit ADAM10 führt zur Reduktion der Barrierefunktion der Membran. Des Weiteren kann Hämolyisin α in höheren Konzentrationen die Zelle über alternative Mechanismen schädigen. Die geschieht beispielsweise durch die Interaktion mit Phosphocholin, einem Bestandteil einiger Phospholipide, die wiederum auf der Zellmembran zu finden sind. In der Konsequenz lässt sich festhalten, dass nach der Interaktion der Wirtszellen mit dem Toxin lytische Vorgänge an der Zellmembran bis hin zur Apoptose, Interaktionen zwischen Zellen, die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen sowie weitere destruirende Eigenschaften des Toxins beobachtet werden (Hildebrand, Pohl & Bhakdi 1991; Suttorp, Buerke & Tannert-Otto 1992; Onogawa 2002; Prévost et al. 2006; Kraemer et al. 2012). Die toxischen Eigenschaften können sich gegen unterschiedliche menschliche und tierische Zellen richten, wobei jedoch noch nicht alle vulnerablen Zellen bekannt sind. Außerdem unterscheidet sich die Anfälligkeit gegenüber Hämolyisin α der Zelle von Zelltyp zu Zelltyp. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass eine höhere Konzentration an Toxinen erforderlich ist, um Granulozyten zu schaden, im Vergleich zu Lymphozyten, deren Zellen bereits bei geringeren Konzentrationen lysieren. Das ist unter anderem auf die unterschiedliche Expression passender Rezeptoren zurückzuführen (Bhakdi & Trantum-Jensen 1991; Liang & Ji 2007; Berube & Wardenburg 2013). Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Annahme, dass Hämolyisin α auch Thrombozyten in ihrer Gestalt und Funktion, Aggregation und Aktivierung beeinflusst und eine Rolle bei Endokarditiden oder Sepsis spielen kann (Schubert et al. 2011; Berube & Wardenburg 2013; Divyakolu et al. 2019; Li et al. 2020). Dabei scheint die Konzentration des Toxins eine wichtige Rolle zu spielen. Thrombozyten verhalten sich anders bei sublytischen Konzentrationen als bei zytolytischen Konzentrationen (Siegel & Cohen 1964; Leeten et al. 2021). Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Fibrinogen, das im Endokard oder in der Gefäßwand vorkommt, sind auch am Adhäsionsvorgang beteiligt. Die vorliegenden Versuche wurden mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix durchgeführt. Im Rahmen einer weiterführenden Analyse soll dem

Einfluss des Pathogenitätsfaktors auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten tiefergehend nachgegangen werden.

1.3.2 Lipoteichonsäure

Bakterien sind umhüllt von einer Zellwand, die sie gegen die Außenwelt schützt. *Staphylococcus aureus* ist ein grampositives Bakterium. Die Zellwand grampositiver Bakterien setzt sich aus einer innen gelegenen Zellmembran und einer außen gelegenen Peptidoglykanschicht zusammen. Diese Peptidoglykanschicht enthält unterschiedliche zusätzliche Bestandteile, wie Proteine, Lipo- und Glykopeptide. Außerdem gibt es Teichonsäuren, die in der Peptidoglykanschicht verankert sind und verschiedene Rollen beim Schutz des Bakteriums gegen die Außenwelt spielen und somit wichtig bei pathophysiologischen Prozessen im menschlichen Organismus im Falle einer Infektion sind. Diese sind kovalent mit der Peptidoglykanschicht verankert und bilden lange Polymere (Rajagopal & Walker 2015). Eine dieser Teichonsäuren ist die Lipoteichonsäure. Im Folgenden soll diese genauer betrachtet werden. Lipoteichonsäure ist meist aus einer Polyglycerol-Phosphat-Kette aufgebaut und verbunden mit einem Glykolipid in der Membran (Brown, Santa Maria Jr. & Walker 2013; Rajagopal & Walker 2015). Verschiedene Modifikationen der Lipoteichonsäure, wie etwa die Glykosylierung oder Reaktionen mit D-Alanin-Estern, unterstützen das Bakterium bei unterschiedlichen Aufgaben, wie zum Beispiel bei der Adhäsion an Oberflächen oder der Zellteilung. Außerdem spielt die Säure eine Rolle bei Infektionen und fungiert als Pathogenitätsfaktor. Das bedeutet, dass die Immunantwort durch sie moduliert wird oder das Komplementsystem aktiviert wird (Fiedel & Jackson 1978; Loos, Clas & Fischer 1986; Rajagopal & Walker 2015). Nach Xia et al. schützt sie das Bakterium gegen die Außenwelt und reguliert relevante Zellfunktionen, wie Enzymaktivitäten (Xia, Kohler & Peschel 2010). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf den Wechselwirkungen zwischen Pathogenitätsfaktoren von *Staphylococcus aureus*, Thrombozyten und der extrazellulären Matrix. Viele Arbeiten untersuchten bereits Lipoteichonsäure aus unterschiedlichen Bakterien. Eine Arbeit zeigt relevante Fakten zu Lipoteichonsäure auf, die von *Lactobacillus plantarum* gewonnen wurde (Kim et al. 2014). Andere wiederum untersuchten Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* als entscheidender Mediator in verschiedenen infektiologischen Prozessen abseits von Interaktionen mit Blutplättchen. So scheint sie etwa bei der atopischen Dermatitis eine Rolle zu spielen (Travers et al. 2010), zur Biofilmbildung

beizutragen (Gross et al. 2001; Fedtke et al. 2007; Ahn et al. 2018) oder auch mit anderen Zellen zu interagieren (Wu et al. 2011). Ein in der Literatur noch recht unbeachteter Aspekt ist das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten in Anwesenheit von Lipoteichonsäure des Bakteriums *Staphylokokkus aureus*. Lipoteichonsäure konnte bereits mit einem veränderten Adhäsionsverhalten von Bakterien auf Blutgerinnseln in Verbindung gebracht werden (Chugh et al. 1990). Weitere Arbeiten haben gezeigt, dass auch die Thrombozytenaktivierung und -aggregation, zwei eng mit der Thrombozytenadhäsion verknüpfte Prozesse, vermindert sind. Die dosisabhängige Inhibition der Plättchenaktivierung zieht die Annahme nach sich, dass weniger Entzündungsmediatoren freigesetzt werden könnten und Lipoteichonsäure somit zur Immunevasion beiträgt und somit Abwehrmechanismen des Immunsystems umgehen könnte (Xia et al. 2010; Wu et al. 2011; Li et al. 2020). Eine der genannten Studien bezog sich vorrangig auf Veränderungen zwischen Interaktionen von Plättchen und Monozyten, die als Vertreter für andere Körperzellen dienen (Wu et al. 2011). Neben diesen Interaktionen ist daher die Interaktion zwischen Thrombozyten und der extrazellulären Matrix unter dem Einfluss von Lipoteichonsäure recht unerforscht und von Interesse. In anderen Studien konnten Strukturen auf unterschiedlichen menschlichen Zellen herausgefunden werden, an denen eine Interaktion mit Lipoteichonsäure möglich ist. Aufzuführen ist zum Beispiel eine erhöhte Expression des Plättchen-aktivierenden-Faktor-Rezeptors (PAF-Rezeptor), Toll-like-Rezeptoren und CD14 bei Monozyten in Anwesenheit von Lipoteichonsäure von *Staphylokokkus aureus*. Der PAF-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor Er bindet PAF und wird in verschiedenen Zellen exprimiert. Er bewirkt verschiedene Funktionen wie Plättchenaggregation und wirkt regulierend in infektiösen Prozessen. So kann er bakterielle Infektionen bremsen oder bei Überexpression auch erhöhte Anfälligkeit des Organismus bewirken (Hourton et al. 2001; Kim et al. 2014). Toll-like-Rezeptoren erkennen spezielle bakterielle Muster und der Organismus kann mit antiinflammatorischen Prozessen reagieren. CD14 spielt eine Rolle im unspezifischen Immunsystem. Eine weitere Studie beschreibt LTA ebenfalls als möglichen Liganden des PAF-Rezeptors und des TL-4-Rezeptors. Es werden auch Interaktionen mit TLR2 beschrieben (Zhang et al. 2005; Knapp et al. 2008). Darüber hinaus scheint in Epithelzellen auch die oben beschriebene Metalloprotease ADAM10 an Interaktionen mit LTA beteiligt zu sein (Lemjabbar & Basbaum 2002). Es wird also deutlich, dass es unterschiedliche Ergebnisse und Vorstellungen über die Rolle der LTA gibt. Diese sind aus vielen unterschiedlichen Ansatzpunkten entstanden und müssen in Anbetracht der

Fragestellung dieser Arbeit gefiltert werden. Es bleiben Fragen offen zur Thrombozytenadhäsion in Anwesenheit von Lipoteichonsäure, der Rolle der extrazellulären Matrix und zu Hintergründen dieses Prozesses. Diesen soll im Folgenden zumindest teilweise nachgegangen werden.

1.3.3 Interaktion zwischen Pathogenitätsfaktoren und Thrombozyt

Staphylokokkus aureus hat verschiedene Pathogenitätsfaktoren. Näher untersucht wurden die oben erläuterte Lipoteichonsäure und das Toxin Hämolysin α . Interaktionen zwischen Thrombozyt und diesen sind schematisch vereinfacht unten farblich dargestellt (siehe Abbildung 3). Die gezeigten Vorgänge sind theoretisch denkbar.

Hämolysin α bindet an den ADAM10-Rezeptor, eine Zink-abhängige Metalloprotease, der auf Thrombozyten zu finden ist. Es ist möglich, dass daneben weitere Rezeptoren für Wechselwirkungen verantwortlich sind.

Lipoteichonsäure bindet vermutlich an mehrere Rezeptoren. Nicht geklärt ist die Ausstattung von Plättchen mit diesen Rezeptoren. Dazu gehören nach derzeitigem Kenntnisstand der Plättchen-Aktivator-Faktor-Rezeptor (PAF-R), möglicherweise die Oberflächenproteine CD36 oder CD14 und verschiedene Toll-like-Rezeptoren (TLR). Plättchen exprimieren am ehesten TLR-2, -4 und -9. Es ist denkbar, dass CD14 aber eher als Co-Rezeptor fungiert. Zwischen der Expression von TLR-4 bzw. PAF-R und der Stärke der Inflammation in Mäuselungen konnten Zusammenhänge gezeigt werden (Chugh et al. 1990; Zhang et al. 2005; Aslam et al. 2006; Seo, Kim & Nahm 2006; Knapp et al. 2008; Berube & Wardenburg 2013; Waller et al. 2013; Powers et al. 2015; Divyakolu et al. 2019; Abhilasha et al. 2021).

Des Weiteren sind zur Veranschaulichung der Interaktionen von Thrombozyten mit Fibrinogen und Kollagen verschiedene Rezeptoren dargestellt, die bei der Plättchenaggregation und -adhäsion von Relevanz sind. Es ist denkbar, dass neben Fibrinogen Hämolysin α an α IIb β 3 bindet und dies die Plättchenaggregation induziert (Schubert et al. 2011). Genauso ist GPIIb/IIIa ein für die Plättchenaktivierung wichtiger Rezeptor, der Fibrinogen bindet. Bakterienproteine können teilweise direkt binden (Petersen et al. 2010; Daga et al. 2011; Sauter et al. 2018). Ein interessanter Aspekt ist die variierende Expression der Rezeptoren, die für Hämolysin α empfänglich sind. Berube et al. beschrieben in einer Veröffentlichung die Expression von ADAM10 und wiesen auf die entsprechend größere oder auch geringere Empfänglichkeit der

Zellen für das Toxin hin. Dem ist hinzuzufügen, dass sie nicht die Rezeptoreigenschaften explizit auf Plättchen untersuchten (Berube & Wardenburg 2013).

Außerdem wurden Versuche durchgeführt, bei denen potentielle Interaktionen zwischen den Komplementfaktor-Rezeptoren C5aR und C3aR und den genannten Pathogenitätsfaktoren untersucht wurden.

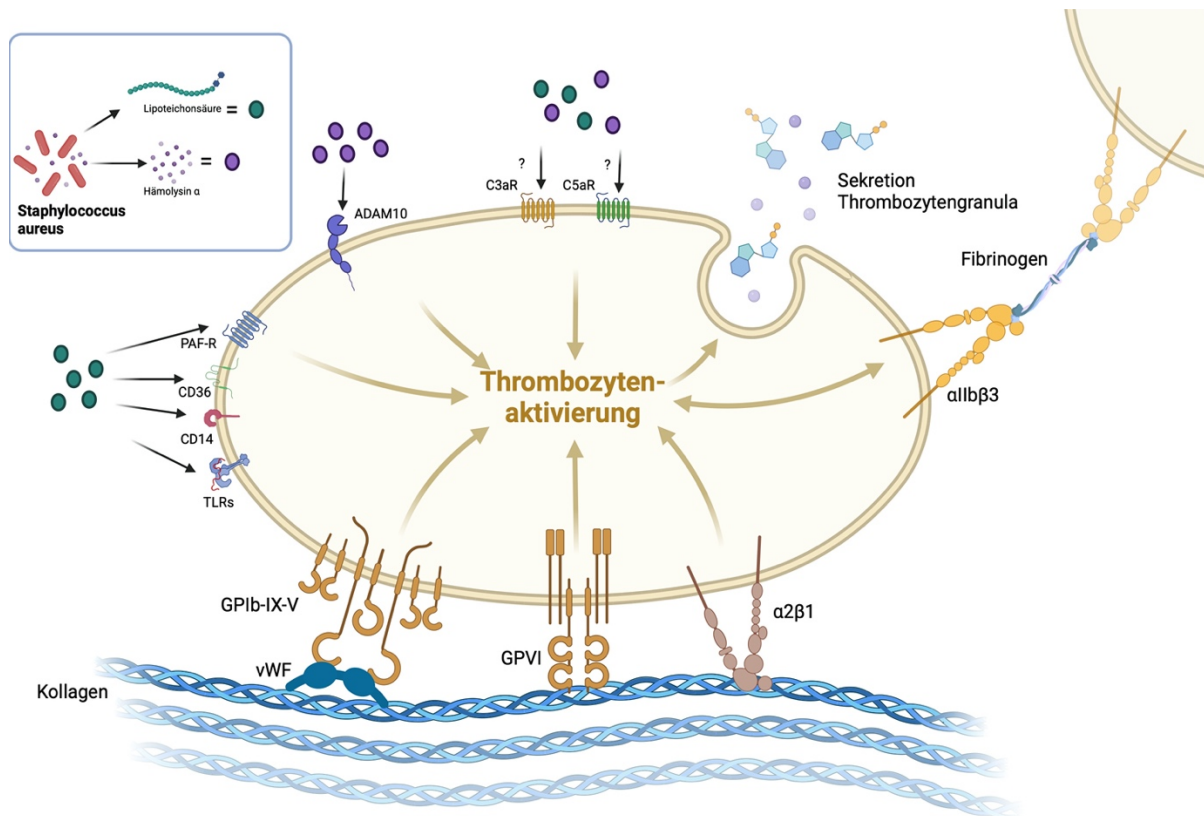


ABBILDUNG 3: INTERAKTION EINES THROMBOZYTEN MIT LIPOTEICHONSÄURE UND HÄMOLYSIN α

Die Abbildung zeigt Vorgänge auf subendotheliales Kollagen, die durch Gewebeschäden in Gang gesetzt werden. Im Falle einer bakteriellen Infektion sind die Pathogenitätsfaktoren Lipoteichonsäure und Hämolyisin α in der Blutbahn und hier vereinfacht farbig dargestellt. Lipoteichonsäure bindet vermutlich an den Plättchen-aktivierenden-Rezeptor (PAF-R), CD36, CD14 und Toll-like-Rezeptoren (TLRs). Diese sind auf Thrombozyten zu finden. Hämolyisin α bindet an die Metalloprotease ADAM 10, die auch auf der Thrombozytenoberfläche vorkommt. Daraus resultieren veränderte Eigenschaften der Thrombozyten, wie beispielsweise ihr Aggregationsverhalten. Es ist fraglich, ob die Pathogenitätsfaktoren auch die Komplementrezeptoren C3aR bzw. C5aR zur Interaktion mit den Thrombozyten nutzen (siehe roter Rahmen).

Abbildung erstellt mit Biorender.com.

1.4 Ziele der Arbeit und Fragestellung

Vorrangiges Ziel der Arbeit war es, die beiden vorgestellten Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums *Staphylokokkus aureus*, Hämolyisin α und Lipoteichonsäure, im Hinblick auf die Interaktion zwischen Thrombozyten und Bestandteilen der extrazellulären Matrix näher zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Adhäsionsreaktion gelegt. Im Diskussionsteil wird der aktuelle Stand der Wissenschaft mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in Beziehung gesetzt. Mögliche Rezeptoren, Reaktionswege und Wechselwirkungen mit anderen Komponenten des Immunsystems, wie etwa Komplementfaktoren, sollen untersucht werden. Schlussendlich wird der Bogen zur infektiösen Endokarditis gespannt und diskutiert, ob die vorgestellten Ergebnisse neue Erkenntnisse zur Pathophysiologie beitragen.

2 Methoden

2.1 Materialgewinn

2.1.1 Humanes Blut

Es wurde kein Blut von Patient:innen verwendet. Gesunde „Volunteers“ spendeten Blut für die in vitro Versuche. Hervorzuheben ist, dass der Großteil des Blutes, auch für die Entwicklung des Versuchsaufbaus, von mir persönlich stammte. Die Entnahme wurde von einem ärztlichen Kollegen aus dem Team durchgeführt. Vor jeder Blutentnahme wurde ein mündliches Einverständnis eingeholt.

2.1.2 Verwendete Mausstämme und deren Haltung

Unter Beachtung der NIH-Guidelines 2016 (National Institutes of Health 2015) und der Tierschutz-Versuchstierverordnung (TierSchVersV) nach Genehmigung durch das Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt, Natur und Digitalisierung des Landes Schleswig-Holstein unter dem Aktenzeichen: V242-53192/2020(76-9/20) und V242 67043/2020 76-9/20 genehmigt.

Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse gleichermaßen verwendet, die in kleineren Gruppen von zwei bis vier Tieren in offener Käfighaltung bei Ad-libitum-Fütterung lebten. Die Mäuse wurden bei einer Temperatur von 20-22°C, einer Luftfeuchtigkeit von 40-60% und einem etwa zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus in der Gemeinsamen Tierhaltung in Lübeck gehalten. Die Versuche wurden frühestens ab einem Alter von 6-8 Wochen durchgeführt.

Ursprünglich wurden die C5aR1^{-/-}-Mäuse (genauer: C.129S4(B6)-C5ar1^{tm1Cge}/J) von Dr. C. Gerard Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA, USA) bezogen. Sie wurden und in der eigenen Tierhaltung weiter gezüchtet.

Die für die beschriebenen Experimente verwendeten Knockout- und transgenen Mäuse hatten alle den genetischen Hintergrund C57BL/6. Aus diesem Grund wurden in sämtlichen beschriebenen Versuchen C57BL/6-Mäuse als Kontrolltiere eingesetzt. Die Kontrollpopulation wurde ursprünglich aus den „Jackson Laboratories“ bezogen, dann aber in der eigenen Tierhaltung weitergezüchtet.

Defiziente Mäuse für den Komplement-Rezeptor C5aR1 (kurz C5aR1^{-/-}) können das Anaphylatoxin C5a, das während der Ausbildung einer Immunantwort entsteht, nicht mehr

binden. Ob das eine Änderung im Adhäsionsverhalten von murinen Thrombozyten spielt, soll in dieser Arbeit beleuchtet werden. Alle Mäuse waren klinisch gesund und züchteten normal.

2.1.3 Thrombozytenisolation

2.1.3.1 Humane Thrombozyten

Es erfolgte die Blutentnahme an freiwilligen gesunden Spender:innen mit einer durchschnittlichen Anzahl an Thrombozyten im Blut von 150-400 000/ μ l Blut (Herold et al. 2021). Je 1,5 ml Acid-Citrat-Dextrose (ACD; 12,5 g Na₃-Citrat; 6,82 g Zitronensäure; 10 g Glucose in 500 ml Aqua dest.) auf 10 ml Vollblut wurden zur Vermeidung der Gerinnung unter sterilen Bedingungen beigesetzt. Nach der Entnahme erfolgte zeitnah die Zentrifugation des Vollblutes für 20 min (200 g) bei Raumtemperatur. Plättchenreiches Plasma wurde abgenommen, mit Tyrodes-Puffer mit einem pH von 6,5 (HEPES 2,5 mM; NaCl 150 mM, KCl 1mM, NaCO₃) aufgefüllt und erneut für 10 min (800 g) zentrifugiert. Der Überstand wurde über der entstandenen Plaque abgenommen, diese anschließend mit Tyrodes 6,5 (100 μ l) aufgelöst und es wurde zur Neutralisation die gleiche Menge Tyrodes 7,4 dazugegeben. Danach konnten die Thrombozyten mittels Sysmex Cell Counter gezählt werden.

2.1.3.2 Murine Thrombozyten

Es erfolgte die Blutentnahme an Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Mäusen im retrobulbären Venenplexus mittels einer geeigneten heparinisierten Glaskapillare. Da zur Durchführung der Versuche eine größere Menge an murinem Blut benötigt wurde, erfolgte eine finale Blutentnahme von Versuchstieren, die bei weiteren Projekten der Arbeitsgruppe bereits eingesetzt worden waren und deren Tod dadurch zu rechtfertigen war. Dazu wurden die Tiere durch einen finalen Blutentzug in Narkose (durch intraperitoneale Gabe von Xylazin-Hydrochlorid (16mg/kg KG i.p.) und Ketamin-Hydrochlorid (100 mg/kg KG i.p.) (Injektionsvolumen ca. 250 μ l, maximal 10ml/kg KG) getötet und das Blut weiterverwendet. Pro Tier konnten optimalerweise ca. 2 ml Blut gewonnen werden. Zur Thrombozytenisolation wurde Tyrodes-Puffer 7,4 hergestellt (HEPES 2,5 mM; NaCl 150 mM, KCl 1mM, NaCO₃) und auf 37°C vorgewärmt. In Eppendorf-Gefäße mit 1,5 ml Fassungsvermögen wurden 300 μ l ACD (12,5 g Na₃-Citrat; 6,82 g Zitronensäure; 10 g Glucose in 500 ml Aqua dest.) unter sterilen Bedingungen zur Verhinderung der Gerinnung hineingegeben. Die Gefäße wurden auf 1,5 ml mit murinem Blut aufgefüllt. Danach wurde das Blut für 5 Min. bei Raumtemperatur zentrifugiert (1800). Bei allen Zentrifugationsschritten war die Bremse ausgeschaltet. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit ca. 200 μ l Tyrodes 7,4 aufgefüllt.

Es folgte ein erneutes Zentrifugieren bei Raumtemperatur für 6 Min. (800 g). Der entstandene Überstand wird als plättchenreiches Plasma bezeichnet und wurde vorsichtig mit einer feinen Pipette abgenommen und in ein neues Gefäß gegeben. Der Rest des Plasmas aus vergangem Schritt wurde wieder mit 200 µl Tyrodes 7,4 aufgefüllt und erneut bei Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert (800 g). Der hierbei entstandene Überschuss wurde zum bereits abgefüllten plättchenreichen Plasma gegeben. Nun folgte der letzte Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur für 5 Min. (2600 g). Der Überstand wurde rasch verworfen und das entstandene Pellet am Grunde des Gefäßes mit ca. 150 µl Tyrodes 7,4 vorsichtig aufgelöst. Danach konnten die Thrombozyten mittels Sysmex Cell Counter gezählt werden.

2.2 Probenanalyse

2.2.1 ELISA Lesegerät Microplate Reader 550

Der „ELISA Lesegerät Microplate Reader 550“ wurde für den Großteil der durchgeführten Versuche verwendet. Es handelt sich um ein Messgerät, mit dem man chemische Reaktionen mittels messbaren optischen Signalen nachweisen kann und somit eine genaue Probenanalyse erhält. Dazu werden die Proben auf eine sogenannte Wells-Platte pipettiert und eine chemische Reaktion hervorgerufen. Für die vorliegende Arbeit wurden 96-Wells-Platten verwendet. Außerdem wird eine chemische Verbindung zum Anfärben benötigt. In dieser Arbeit wurde die Thrombozytenadhäsion auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix, wie etwa Fibrinogen, gemessen. Für den Assay wurde P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer genutzt und schließlich zweimolare Natronlauge hinzugefügt, wodurch die Reaktion beendet wurde. P-Nitrophenylphosphat ist ein Chromogen, das enzymatisch durch die saure Phosphatase in gelbes P-Nitrophenol umgesetzt wird und oft beim ELISA-Verfahren Verwendung findet. Das Enzym saure Phosphatase wird unabhängig vom Aktivierungszustand der Thrombozyten freigesetzt, sodass sich der Versuchsaufbau optimal für den Nachweis von Thrombozyten eignet. Die Aktivität der sauren Phosphatase ist ein sensitiver Marker für die Anzahl der vorhandenen Thrombozyten. Sobald die Reaktion im Gange ist, werden Lichtsignale emittiert und wieder detektiert, die in Form von sehr genauen Messwerten wiedergegeben werden. Da je nach Anzahl der Thrombozyten, und somit auch der sauren Phosphatase, auf der Wells-Platte eine unterschiedliche Lichtabsorption stattfindet, kann in diesem Falle die unterschiedliche Thrombozytenadhäsion auf der Oberfläche differenziert werden. Nicht adhärierte Thrombozyten wurden abgewaschen. In

der vorliegenden Versuchsreihe wurde eine Wellenlänge von 405 nm verwendet und bei jedem Versuch wurde zu Beginn ein Leerwert ohne Substrate gemessen, der anschließend vom Ergebnis subtrahiert wurde, um vergleichbare Resultate zu erhalten. Durch diese Methode können kleinste Unterschiede der Reaktionen sehr gut angegeben und prozentual ermittelt werden. Der Versuchsaufbau ist im unteren Abschnitt detaillierter geschildert

(Bellavite et al. 1994; <http://www.sigmaaldrich.com/>(Zugriff:19.06.2024); <https://www.bmglabtech.com/de/microplate-reader/>(Zugriff: 17.06.2024)).

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um einzelne Zellen oder nur Zellstrukturen zu detektieren. Diese fließen dazu an einem Lichtstrahl oder einer elektrischen Spannung vorbei. Mithilfe der Streulichtmessung kann die einzelne Zelle bezüglich ihrer Größe und Zusammensetzung untersucht werden. Man differenziert bei der Streulichtmessung das Vorwärtstreulicht (Forward Scatter), welches die Beugung des Lichts im flachen Winkel und somit die Zellgröße darstellt, von dem Seitwärtstreulicht (Side Scatter). Letzteres spiegelt die Brechung des Lichts im rechten Winkel wider. Es ist abhängig von der Zusammensetzung der Zelle (Sauter 2019).

Zur genaueren Analyse werden die zu erfassenden Strukturen mittels Streulicht- und Fluoreszenzsignalen nach Bindung an einen fluoreszenzmarkierten Stoff gemessen und können dann mittels Laserstrahl detektiert werden. Oftmals werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, deren Eigenschaften bekannt sind und gesuchte Oberflächenantigene binden (Valet 2003; Bratosin et al. 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurde dieses Verfahren genutzt, um die Quantität lebendiger Thrombozyten zu bestimmen. Das genauere Vorgehen ist im weiteren Text erläutert. Die Analyse erfolgte mit einem Durchflusszytometer CytoFLEX und wurde mit Hilfe der Analysesoftware Flow-Jo ausgewertet.

2.2.3 Mikroskopie

Zur Kontrolle der gewünschten Adhäsionsreaktion der Thrombozyten auf der beschichteten Wells-Platte wurden bei jedem Versuch stichprobenartig die Platten nach dem zweimaligen Waschen unter dem Lichtmikroskop bei bis zu 1000-facher Vergrößerung auf das Adhäsionsverhalten untersucht.

2.3 Versuche

2.3.1. Versuche mit humanen Thrombozyten

2.3.1.1 Versuche mit Hämolysin α auf Fibrinogen

Hämolysin α , auch α -Toxin genannt, ist ein mikrobielles Exotoxin des Bakteriums *Staphylokokkus aureus*, das für diese Versuchsreihe verwendet wurde. Wir setzten α -Toxin in einer Konzentration von 1U/ml bis 20U/ml ein. Eine Unit bedeutet, dass dabei eine 50%-ige Lyse einer 1%-igen Suspension mit Erythrozyten von Kaninchen stattfindet. Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine Adhäsion von Thrombozyten auf Fibrinogen unter dynamischen und statischen Bedingungen zu beobachten ist (Sivaraman & Latour 2010; Sauter et al. 2019). Daher wurde ein Großteil der Versuche mit Fibrinogen durchgeführt. Es sollte beobachtet werden, wie der Adhäsionsprozess der Thrombozyten durch Hämolysin α beeinflusst wird.

2.3.1.1.1 Untersuchung der toxischen Wirkung von Hämolysin α auf humane Thrombozyten
Bereits in der Einleitung wurde die variierende Toxizität auf unterschiedliche Zellen bei gleichen Konzentrationen von Hämolysin α beschrieben. Um die Toxizität des bakteriellen Hämolysins zu überprüfen, wurden in diesem Versuch stoffwechselaktive Thrombozyten angefärbt. Vitale Thrombozyten können das nicht-fluoreszierende Calcein AM[®] nach Transport über die Zellmembran intrazellulär durch Esterasen in grün fluoreszierendes Calcein umsetzen. Mittels Durchflusszytometrie lässt sich die Fluoreszenz und somit die Vitalität der verwendeten Zellen ermitteln. Dazu wurde Calcein AM[®] in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst, sodass eine Lösung mit einer Konzentration von 50 μ M entstand (Herstellerangabe).

Nach obigem Vorgehen erfolgte die Thrombozytenisolation. Eine Million Thrombozyten wurden jeweils pro Probe in einem Milliliter PBS gelöst. Die Auswahl dieser Anzahl der Plättchen orientierte sich an der Arbeit von Bellavite et al. (Bellavite et al. 1994) und entsprach der Anzahl der Thrombozyten in den Folgeversuchen, um ähnliche Versuchsbedingungen zu schaffen. Anschließend erfolgte die Zugabe verschiedener Mengen von Hämolysin α (1 U/ml, 2 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml, 20 U/ml) in jeweils ein Proberöhrchen. Dazu wurden 2 μ l der Calcein-DMSO-Lösung gegeben und im Dunkeln 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Proberöhrchen mit Thrombozyten und Calcein für 20 min bei 60 °C inkubiert, um vitale Thrombozyten abzutöten. Mittels FACS konnte anschließend die Fluoreszenz gemessen werden und eine Aussage zur Toxizität des Hämolysin α getroffen

werden (Bratosin et al. 2005). Eine schematische Abbildung des Versuches findet sich im Teil „Resultate“ (Abbildung 4).

2.3.1.1.2 Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolyisin α

In diesem Versuch wurde das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Wells-Platte unter statischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolyisin α verschiedener Konzentrationen ermittelt. Außerdem wurde das Adhäsionsverhalten unbehandelter Thrombozyten und mit Plättchen-aktivierendem ADP versetzter Thrombozyten zum Vergleich beobachtet. Für die Beschichtung wurde Fibrinogen aufgetragen (100 μ l à 2 mg/ml je Well) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit Hämolyisin α unterschiedlicher Konzentrationen (1 U/ml, 2U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml inkubiert und als Positivkontrolle ADP (1 μ g/ml) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach dem Auftragen der Thrombozyten (1x10⁶ Thrombozyten pro Well) auf die gewaschene Wells-Platte und zwei Stunden Zuwarten bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platte mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 μ l je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Probe stand über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 μ l je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader. Auch für diesen Versuch findet sich eine vereinfachte Darstellung im Teil „Resultate“ (Abbildung 6).

2.3.1.1.3 Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Hämolyisin α

Der Versuchsaufbau orientierte sich an Versuch 2.3.1.1.2. Es wurde erneut das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Wells-Platte unter statischen Bedingungen untersucht. Anders als im vorherigen Versuch wurde das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Hämolyisin α verschiedener Konzentrationen ermittelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit ADP versetzte Thrombozyten auf eine Fibrinogen-Beschichtung ohne vorherige Inkubation mit Hämolyisin α gegeben.

Für die Beschichtung wurde Fibrinogen aufgetragen (100 µl à 2 mg/ml je Well). In einigen Wells wurde zusätzlich Hämolysin α unterschiedlicher Konzentrationen (5 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml) hinzugefügt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Es erfolgte die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese auf die gewaschene Wells-Platte aufgetragen (1x10⁶ Thrombozyten pro Well). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich ADP (1 µg/ml) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach zwei Stunden Zuwarten bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platte mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Probe stand über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 µl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader. Bezüglich einer schematischen Darstellung sei auf den Teil „Resultate“ verwiesen (siehe Abbildung 8).

2.3.1.1.4 Vergleich des Adhäsionsverhaltens humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolysin α auf Fibronectin und Kollagen

Um zu untersuchen, wie sich die Adhäsion der Thrombozyten nach Zugabe von Hämolysin α auf anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix verhält, wurde Versuch 2.3.1.1.2 analog mit Fibronectin bzw. Kollagen statt Fibrinogen wiederholt. Dazu wurde Fibronectin (100 µl à 2 µg/ml je Well) auf eine Platte gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Auf gleiche Weise erfolgte die Vorbereitung einer weiteren Platte mit Kollagen (100 µl à 10 µg/ml je Well). Es erfolgte einen Tag später die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit Hämolysin α unterschiedlicher Konzentrationen (5 U/ml, 10 U/ml, 15 U/ml) inkubiert. Als Positivkontrolle diente ADP (1 µg/ml). Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach dem Auftragen der Plättchen auf die gewaschenen Wells-Platten (1x10⁶ Thrombozyten pro Well) und weiteren zwei Stunden bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platten mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Proben standen über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 µl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.1.2 Versuche mit Lipoteichonsäure auf Fibrinogen

Obige Versuche wurden auf gleiche Weise mit einem weiteren bakteriellen Bestandteil durchgeführt. Dazu wurde Lipoteichonsäure (Sigma-Aldrich: Lipoteichonsäure aus *Staphylococcus aureus*) eingesetzt.

2.3.1.2.1 Untersuchung der toxischen Wirkung von Lipoteichonsäure auf humane Thrombozyten

Auch bei Lipoteichonsäure wurde zunächst die Toxizität auf die Thrombozyten untersucht. Dazu wurden erneut die stoffwechselaktiven Zellen angefärbt (siehe 2.3.1.1.1).

Nach obigem Vorgehen (2.1.3.1) erfolgte die Thrombozytenisolation. Eine Million Thrombozyten wurden jeweils pro Probe in einem Milliliter PBS gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe verschiedener Mengen von Lipoteichonsäure (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml) in jeweils ein Proberöhrchen. Dazu wurden 2 µl der 50µM Calcein-DMSO-Lösung gegeben und im Dunkeln 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein Proberöhrchen mit Thrombozyten und Calcein für 20 min bei 60 °C inkubiert, um vitale Thrombozyten abzutöten. Mittels FACS konnte anschließend die Fluoreszenz gemessen werden und eine Aussage zur Toxizität des Hämolysin α getroffen werden (Bratosin et al. 2005).

2.3.1.2.2 Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure

Wie bei 2.3.1.1.2 wurde das Adhäsionsverhalten von isolierten Thrombozyten auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Wells-Platte unter statischen Bedingungen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Lipoteichonsäure untersucht. Erneut fungierte ADP als Vergleichslösung.

Für die Beschichtung wurde Fibrinogen aufgetragen (100 µl à 2 mg/ml je Well) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit Lipoteichonsäure unterschiedlicher Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml) inkubiert und als Positivkontrolle ADP (1 µg/ml) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach dem Auftragen der Thrombozyten (1x10⁶ Thrombozyten pro Well) auf die gewaschene Wells-Platte und zwei Stunden Zuwarten bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platte mit anschließender

Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Probe stand über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 µl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.1.2.3 Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Lipoteichonsäure

Der Versuchsaufbau glich Versuch 2.3.1.2.2. Es wurde erneut das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Wells-Platte unter statischen Bedingungen untersucht. Anders als im vorherigen Versuch wurde das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Lipoteichonsäure ermittelt. Als Kontrolle wurden unbehandelte und mit ADP versetzte Thrombozyten auf eine Fibrinogen-Beschichtung ohne vorherige Inkubation mit Lipoteichonsäure gegeben.

Für die Beschichtung wurde Fibrinogen aufgetragen (100 µl à 2 mg/ml je Well). In einigen Wells wurde zusätzlich Lipoteichonsäure unterschiedlicher Konzentrationen (0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 2,5 µg/ml) hinzugefügt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese auf die gewaschene Wells-Platte aufgetragen (1×10^6 Thrombozyten pro Well). Als Positivkontrolle wurde zusätzlich ADP (1 µg/ml) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach zwei Stunden Zuwarten bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platte mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Probe stand über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 µl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.1.2.4 Vergleich des Adhäsionsverhaltens humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure auf Fibronectin und Kollagen

Wie im vorherigen Versuchsaufbau mit Hämolyysin α wurde das Verhalten der Thrombozyten nach Zugabe von Lipoteichonsäure auf anderen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix untersucht. Statt Fibrinogen wurden zur Beschichtung der Platten Kollagen und Fibronectin verwendet. Dazu wurde Fibronectin (100 µl à 2 µg/ml je Well) auf eine Platte gegeben und diese über Nacht bei 4°C inkubiert. Auf gleiche Weise erfolgte die Vorbereitung einer weiteren

Platte mit Kollagen (100 μ l à 10 μ g/ml je Well). Es erfolgte einen Tag später die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (siehe 2.1.3.1). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese für 30 min bei Raumtemperatur mit Lipoteichonsäure unterschiedlicher Konzentrationen (0,1 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml) inkubiert. Als Positivkontrolle diente ADP (1 μ g/ml). Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach dem Auftragen der Plättchen auf die gewaschenen Wells-Platten (1×10^6 Thrombozyten pro Well) und weiteren zwei Stunden bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platten mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 μ l je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Proben standen über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 μ l je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.1.3 Versuche mit Komplementinhibitoren

Um festzustellen, ob das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten auf Fibrinogen nach Zugabe von Lipoteichonsäure oder Hämolysin α in Zusammenhang mit dem Komplementsystem steht, wurden beispielhaft relevante Komplementfaktoren und deren Rezeptoren in den bestehenden Versuchsaufbau mit eingeschlossen. Dazu boten sich C3 und C5 an. Um einen Einfluss dieser Faktoren zu bestätigen oder auch auszuschließen, wurden der C5a- und der C3a-Rezeptorantagonist (PMX53; Sigma Aldrich und SB290157; Sigma Aldrich) und außerdem der C3-Inhibitor Compstatin (Sigma Aldrich) verwendet. Der Versuchsaufbau glich den vorherigen Versuchen. Für die Beschichtung wurde Fibrinogen auf eine Wells-Platte aufgetragen (100 μ l à 2 mg/ml je Well) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es erfolgte die Thrombozytenisolation humaner Thrombozyten aus frischem Vollblut (2.1.3.1).

2.3.1.3.1 Zugabe von C3a-/C5a-Rezeptorantagonisten

Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurde ein Teil dieser mit dem C5aR1-Antagonisten PMX 53 (10 μ M, Sigma Aldrich) und der andere Teil mit dem C3aR-Antagonisten SB290157 (10 μ M, Sigma Aldrich) für 30 min bei 37°C inkubiert. Vergleichsweise wurden unbehandelte Thrombozyten ebenso 30 min bei 37°C gelagert. Anschließend wurden jeweils Hämolysin α (15 U/ml) bzw. Lipoteichonsäure (2,5 μ g/ml) zu den unterschiedlichen Proben gegeben. Nach weiteren 30 min wurden die Proben auf die gewaschene beschichtete Platte gegeben. Diese wurde, wie bereits beschrieben, zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte

das erneute gründliche Waschen der Platten und schließlich die Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 µl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Proben standen über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 µl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.1.3.2 Zugabe des C3-Komplementinhibitors

Der Teilversuch wurde auf die gleiche Weise wie oben durchgeführt. Statt der Rezeptorantagonisten wurde allerdings der C3-Inhibitor Compstatin (50 µM, Sigma Aldrich) verwendet.

Die Versuche wurden zuerst mit Hämolysin α und anschließend mit Lipoteichonsäure durchgeführt.

2.3.2 Versuche mit murinen Thrombozyten

In diesem Ergänzungsteil wurden murine Thrombozyten untersucht. Dazu wurde die Thrombozytenisolation von Wildtyp-Tieren und Knockout-Tieren (C5aR1^{-/-}) durchgeführt und das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten bei Zugabe von Lipoteichonsäure und Hämolysin α verglichen.

2.3.2.1 Adhäsionsverhalten muriner Wildtyp-Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolysin α

Der Versuchsaufbau glich dem Aufbau der Versuche mit humanen Thrombozyten. Bezüglich einer schematischen Darstellung sei auf den Teil „Resultate“ verwiesen (siehe Abbildung 21). Es wurden Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen verwendet. Das Adhäsionsverhalten muriner Thrombozyten wurde erneut auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Well-Platte unter statischen Bedingungen untersucht. Dabei wurde das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolysin α ermittelt. Außerdem wurde das Adhäsionsverhalten unbehandelter Thrombozyten und mit Plättchen-aktivierendem ADP versetzter Thrombozyten zum Vergleich beobachtet.

Für die Beschichtung wurde Fibrinogen aufgetragen (100 µl à 2 mg/ml je Well) und über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Es erfolgte die Thrombozytenisolation muriner Thrombozyten aus frischem Vollblut (2.1.3.2). Nach dem Erhalt isolierter Thrombozyten wurden diese für 30 min

bei Raumtemperatur mit Hämolysin α (15 U/ml) inkubiert und als Positivkontrolle ADP (1 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Als Negativkontrolle fungierte PBS. Nach dem Auftragen der Thrombozyten (1×10^6 Thrombozyten pro Well) auf die gewaschene Wells-Platte und zwei Stunden Zuwarten bei Raumtemperatur folgte das erneute gründliche Waschen der Wells-Platte mit anschließender Zugabe von P-Nitrophenylphosphat (140 μl je Well à 1 mg/ml) in Citratpuffer. Die Probe stand über Nacht im Kühlschrank und die Reaktion wurde schließlich durch 2M NaOH (100 μl je Well) beendet, wodurch ein Farbumschlag erfolgte. Die Messung erfolgte bei 405 nm im ELISA-Reader.

2.3.2.2 Adhäsionsverhalten muriner Wildtyp-Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure

Der obige Versuch (2.3.2.1) wurde auf gleiche Weise noch einmal mit isolierten Thrombozyten von Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Allerdings wurde nun anstelle des Hämolysins Lipoteichonsäure (2,5 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte auf gleiche Weise bei 405 nm.

2.3.2.3 Adhäsionsverhalten muriner C5aR1^{-/-}-Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolysin α

Der obige Versuch (2.3.2.1) wurde nun auf gleiche Weise noch einmal mit isolierten Thrombozyten durchgeführt, dieses Mal jedoch mit Zellen von Knockout-Mäusen (C5aR1^{-/-}). Es wurde wieder mit der Inkubation mit Hämolysin α (15 U/ml) begonnen. Der Versuchsaufbau glich dem des obigen Versuchs. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte auf gleiche Weise bei 405 nm.

2.3.2.4 Adhäsionsverhalten muriner C5aR1^{-/-}-Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure

Obiger Versuch (2.3.2.1) wurde auf gleiche Weise noch einmal mit isolierten Thrombozyten von Knockout-Mäusen durchgeführt. Allerdings wurde nun anstelle des Hämolysins Lipoteichonsäure (2,5 $\mu\text{g/ml}$) verwendet. Die Messung im ELISA-Reader erfolgte auf gleiche Weise bei 405 nm.

3. Statistische Methoden

Die Daten wurden mit der Software GraphPad Prism 8.0 graphisch dargestellt. Je Blutspende wurden drei Wells mit Thrombozyten untersucht. Daraus wurde ein Mittelwert bestimmt, den wir zur Analyse heranzogen. Dieses Vorgehen wurde immer aus vier verschiedenen Blutproben wiederholt. Somit ergab sich $n = 4$.

Das Vorgehen für die Versuchsreihe 4.3 und 4.5 war wie folgt: Aufgrund der geringen Stichprobengröße führten wir zunächst einen nicht-parametrischen Globaltest, einen Kruskal-Wallis-Test, bei allen Daten durch. Zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Gruppen, dann führten wir einen Posthoc-Test (Dunn's-Test) im Anschluss bei den Gruppen, die uns interessierten, paarweise durch. Die Resultate stellten wir in Boxplots dar.

Das Vorgehen für die weiteren Versuche 4.5 und 4.6 war wie folgt:

Zur statistischen Analyse der Adhäsionsdaten wurde zunächst ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um Unterschiede zwischen mehreren unabhängigen Gruppen zu prüfen. Bei Vorliegen eines globalen Effekts erfolgte eine Post-hoc-Analyse mittels Dunn's-Test zur Identifikation paarweiser Gruppenunterschiede. Diese Analysen wurden sowohl für die Kontrollbedingungen als auch für die weitere Bedingung (etwa eine mit Compstatin behandelte Probe etc.) angewendet.

Zur direkten Gegenüberstellung unbehandelter und vorbehandelter Thrombozyten innerhalb identischer Stimulationsbedingungen wurden zusätzlich paarweise Vergleiche mittels Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Das gleiche Vorgehen wurde beim Vergleich muriner Wildtyp- und Knockout-Thrombozyten angewendet.

Um die Ergebnisse übersichtlich zu präsentieren, markierten wir nur signifikante Unterschiede. Bei fehlender Markierung ist nicht von einem signifikantem Ergebnis auszugehen. Ein P-Wert $p \leq 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Die Testergebnisse wurden in Abhängigkeit des P-Wertes wie folgt gekennzeichnet: * für $p < 0,05$, ns für $p > 0,05$.

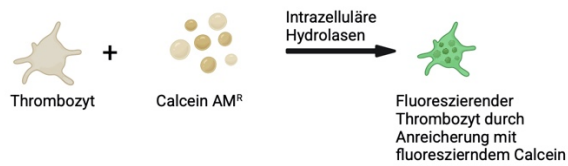
4. Resultate

4.1. Versuche mit Hämolyisin α auf Fibrinogen

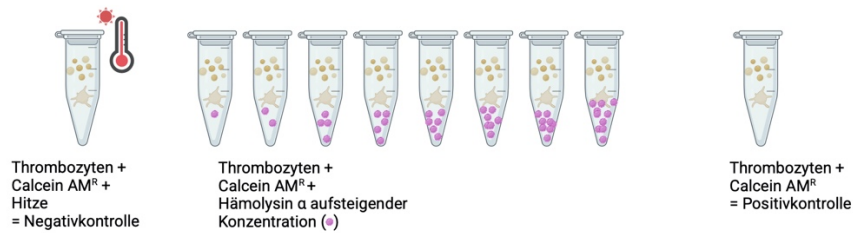
4.1.1. Untersuchung der toxischen Wirkung von Hämolyisin α auf humane Thrombozyten

Durchflusszytometrische Untersuchungen zur toxischen Wirkung von Hämolyisin α auf Thrombozyten wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Calcein AM[®] durchgeführt. In vitalen Zellen wird das nicht-fluoreszierende Calcein AM[®] nach der Acetoxymethylester-Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen in fluoreszierendes Calcein umgewandelt. Nach Zugabe des Farbstoffs zeigten vitale Zellen eine grüne Fluoreszenz. Abbildung 4 zeigt schematisch den Versuchsaufbau und -ablauf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt. In der Negativkontrolllösung mit Thrombozyten nach Hitzebehandlung konnte kaum Fluoreszenz gemessen werden. Dagegen wurde in der Positivkontrolle bei Thrombozyten, die weder Hitze noch Hämolyisin α ausgesetzt waren, viel Fluoreszenz gemessen. Dies bestätigt die gewünschte Farbstoffumsetzung ausschließlich in stoffwechselaktiven Thrombozyten. Eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz und somit eine Abnahme stoffwechselaktiver Zellen in der Lösung war nach Zugabe von Hämolyisin α bei einer Konzentration von 5 U/ml zu beobachten. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die hitzeinaktivierte Kontrolle signifikant von der PBS-Kontrolle unterschied. Alle anderen Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

1 Prinzip



2 Vorbereitung



3 Probenfluss, Signalverarbeitung und -analyse



ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR ÜBERPRÜFUNG DER ZELLTOXIZITÄT VON HÄMOLYSIN A

Vitale Thrombozyten können durch intrazelluläre Hydrolasen Calcein AM^R in fluoreszierendes Calcein umwandeln, was mittels Durchflusszytometer gemessen werden kann. Durch diesen Mechanismus ist es möglich, vitale Thrombozyten nachzuweisen. Nach Zugabe von Hämolyysin α aufsteigender Konzentrationen kann auf dessen Zytotoxizität rückgeschlossen werden.

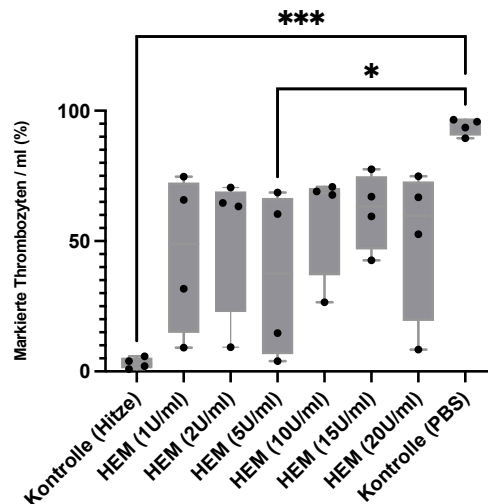


ABBILDUNG 5: UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT VON HÄMOLYSIN A AUF THROMBOZYTEN

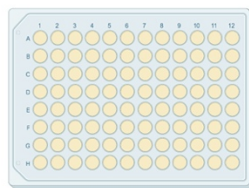
Dargestellt ist der prozentuale Anteil Calcein-AM-positiver Thrombozyten nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Hämolyysin α (HEM). Die PBS-Gruppe dient als Positivkontrolle, die hitzeinaktivierte Probe als Negativkontrolle.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

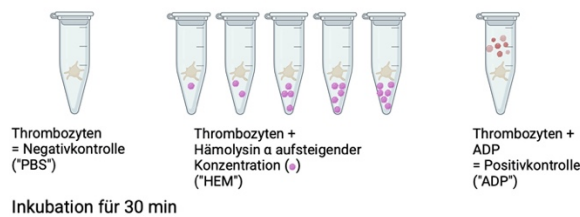
4.1.2. Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolyisin α

Das Prinzip des durchgeführten Versuches ist unten vereinfacht dargestellt (Abbildung 6). Thrombozyten adhären auf einer mit Fibrinogen beschichteten Platte. Unter Zugabe des plättchenaktivierenden Stoffes ADP zeigte sich eine signifikante Adhäsionserhöhung der Thrombozyten auf der Oberfläche. Dies fungierte als Positivkontrolle. Werden die Thrombozyten vorher mit Hämolyisin α (HEM) unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert, zeigt sich bei einer Konzentration von 15 U/ml eine signifikante Reduktion der Adhäsion auf der Platte im Vergleich zur Positivkontrolle mit ADP. Zudem wurden signifikante Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen geringen Konzentrationen von Hämolyisin α (1 U/ml bzw. 2 U/ml) und der höchsten Konzentration (15 U/ml) gezeigt (Abbildung 7).

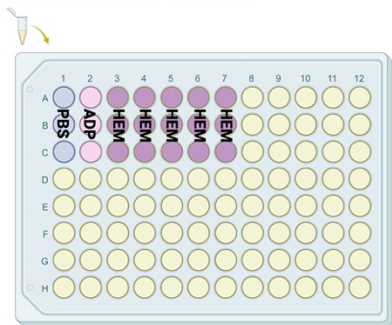
1 Vorbereitung



Wells-Platte mit Fibrinogen (Beschichtung über Nacht)



2 Thrombozytenreaktion



Auftragen, Inkubation über 2 Stunden, Waschvorgang

3 Messung

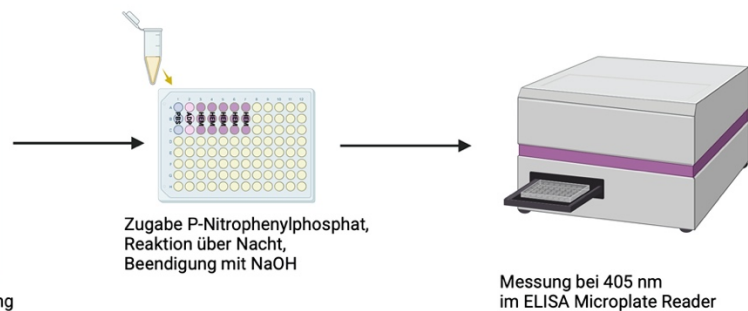


ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF DAS ADHÄSIONSVERHALTEN VON THROMBOZYTEN

Die Abbildung veranschaulicht den vereinfachten Versuchsaufbau. Es wurden Wells-Platten mit Fibrinogen beschichtet. Am Folgetag wurden Thrombozyten isoliert und mit Hämolyisin α unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert. Die Probelösungen wurden auf die Wells-Platte aufgetragen und es wurde P-Nitrophenylphosphat appliziert. Nach Beendigung der Reaktion konnte die Messung von adhären Thrombozyten erfolgen.

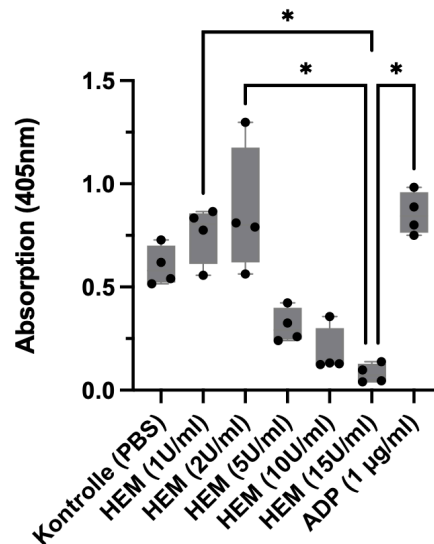


ABBILDUNG 7: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF FIBRINOGEN

Das Ausmaß der Adhäsion ist durch die Absorption auf der Ordinate dargestellt. Auf der Abszisse sind die Kontrollbedingung (PBS), Hämolysin α (HEM) in den Konzentrationen 1 U/ml, 2 U/ml, 5 U/ml, 10 U/ml und 15 U/ml sowie die Positivkontrolle ADP (1 μ g/ml) angegeben. Isolierte Thrombozyten (1×10^6 pro Well) adhäreren auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Well-Platte. Dargestellt sind Median und Interquartilsbereich; einzelne Messwerte sind als Punkte gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Gruppen sind durch Sterne markiert.

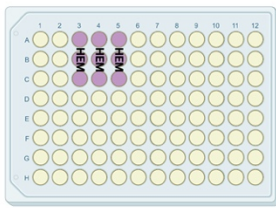
(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, $n = 4$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$)

4.1.3. Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Hämolysin α

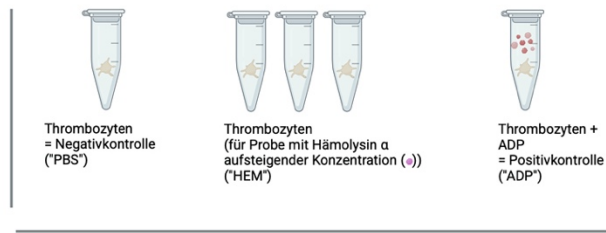
Anders als im vorherigen Versuch wurde die mit Fibrinogen beschichtete Platte vor der Zugabe der Thrombozyten mit Hämolysin α versetzt (Abbildung 8). Die Thrombozyten zeigten keine Adhäsionsreduktion. Wie in Abbildung 9 zu erkennen ist, gab es insgesamt keine signifikante Änderung im Vergleich zur Kontrolle mit PBS ohne Hämolysin α .

Erneut zeigte sich eine signifikante Adhäsionszunahme, wenn die Thrombozyten zusätzlich mit ADP versetzt wurden.

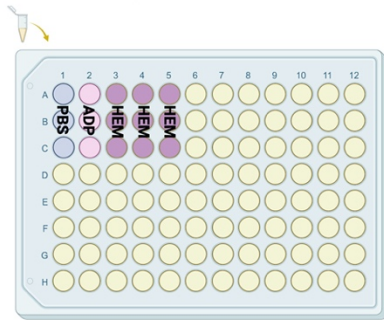
1 Vorbereitung



Wells-Platte mit Fibrinogen und Hämolyisin aufsteigender Konzentration (●) (Beschichtung über Nacht)

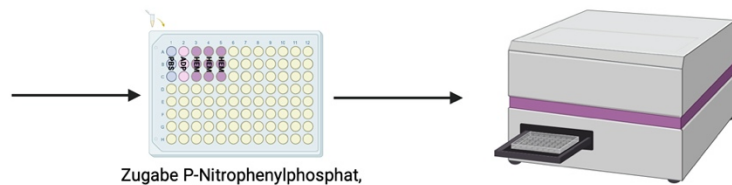


2 Thrombozytenreaktion



Auftragen, Inkubation über 2 Stunden, Waschvorgang

3 Messung



Zugabe P-Nitrophenylphosphat, Reaktion über Nacht, Beendigung mit NaOH

Messung bei 405 nm im ELISA Microplate Reader

ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF FIBRINOGEN

Die Abbildung veranschaulicht den vereinfachten Versuchsaufbau. Es wurden Wells-Platten mit Fibrinogen und Hämolyisin α unterschiedlicher Konzentrationen beschichtet. Am Folgetag wurden Thrombozyten isoliert auf die Wells-Platten aufgetragen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von P-Nitrophenylphosphat gestartet. Nach Beendigung der Reaktion konnte die Messung von adhärenierten Thrombozyten erfolgen.

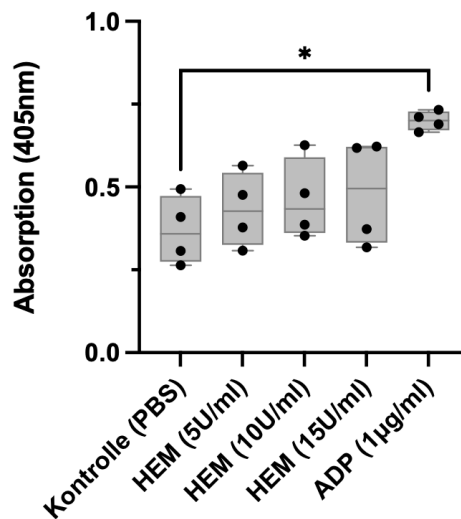


ABBILDUNG 9: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH VORHERIGER INKUBATION VON FIBRINOGEN VON HÄMOLYSIN A

Humane isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Die Inkubation der beschichteten Wells-Platte mit Hämolyisin α (HEM) unterschiedlicher Konzentrationen vor Zugabe der Thrombozyten führt zu keiner signifikanten Veränderung des Adhäsionsverhaltens der Thrombozyten. ADP dient als Positivkontrolle.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.1.4. Vergleich des Adhäsionsverhaltens humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolyisin α auf Fibronectin und Kollagen

Die Ergebnisse des Versuches mit Kollagen und Fibronectin wurden verglichen mit den Ergebnissen aus dem oben beschriebenen Versuch mit Fibrinogen (4.1.2). Die Verwendung unterschiedlicher Bestandteile der extrazellulären Matrix zeigte, dass eine Adhäsion der Thrombozyten auf der Platte stattfindet, diese aber unterschiedlich stark verläuft. Die Zugabe des bakteriellen Toxins Hämolyisin α bewirkte auf der Platte mit Fibronectin eine ähnliche Adhäsionsreduktion wie auf Fibrinogen, allerdings waren die Ergebnisse nicht signifikant (Abbildung 10). Auf einer mit Kollagen beschichteten Platte war im Vergleich zu Fibrinogen und Fibronectin ein viel geringer ausgeprägtes Adhäsionsverhalten insgesamt zu beobachten. Insgesamt konnte keine signifikante Veränderung nach der Inkubation mit Hämolyisin α im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 11).

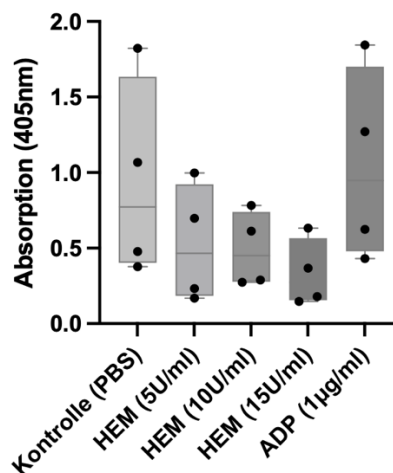


ABBILDUNG 10: VERGLEICH DER ADHÄSION VON THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF FIBRONECTIN

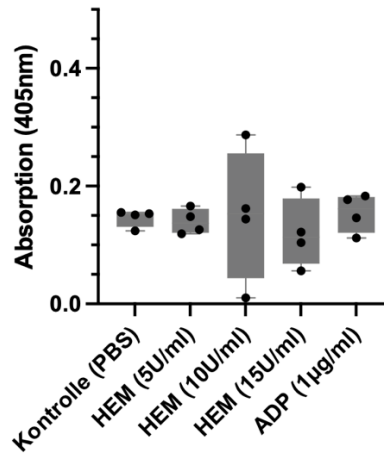


ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER ADHÄSION VON THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF KOLLAGEN

Humane isolierte Thrombozyten können an Bestandteilen der extrazellulären Matrix auf einer Wells-Platte adhären. Bei einer Beschichtung mit Kollagen ist insgesamt weniger Adhäsion zu messen als bei einer Beschichtung mit Fibronectin. Mit Hämolyisin α versetzte Thrombozyten zeigen weder auf Fibronectin noch auf Kollagen eine signifikant verstärkte Adhäsionsreduktion im Vergleich zur Pufferlösung (PBS) bzw. zur Positivkontrolle (ADP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)).

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.2. Versuche mit Lipoteichonsäure auf Fibrinogen

4.2.1. Untersuchung der toxischen Wirkung von Lipoteichonsäure auf humane Thrombozyten

Mittels Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe von Calcein AM[®] die toxische Wirkung des bakteriellen Zellwandbestandteils Lipoteichonsäure untersucht (Abbildung 12). Nach Zugabe des Farbstoffs zeigten vitale Zellen eine grüne Fluoreszenz. In der Negativkontrolllösung mit Thrombozyten nach Hitzebehandlung konnte kaum Fluoreszenz gemessen werden. Dagegen wurde in der Positivkontrolle bei Thrombozyten, die weder Hitze noch Lipoteichonsäure ausgesetzt waren, viel Fluoreszenz gemessen. Dies bestätigt die gewünschte Farbstoffumsetzung ausschließlich in stoffwechselaktiven Thrombozyten. Lipoteichonsäure wurde in aufsteigenden Konzentrationen dazugegeben. Eine signifikante Abnahme der Fluoreszenz und somit eine Abnahme stoffwechselaktiver Zellen in der Lösung war nach Zugabe von Lipoteichonsäure bei einer Konzentration von 10 µg/ml zu beobachten. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die hitzeinaktivierte Kontrolle signifikant von der PBS-Kontrolle unterschied. Somit fand eine Reduktion stoffwechselaktiver Zellen statt. Alle anderen Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

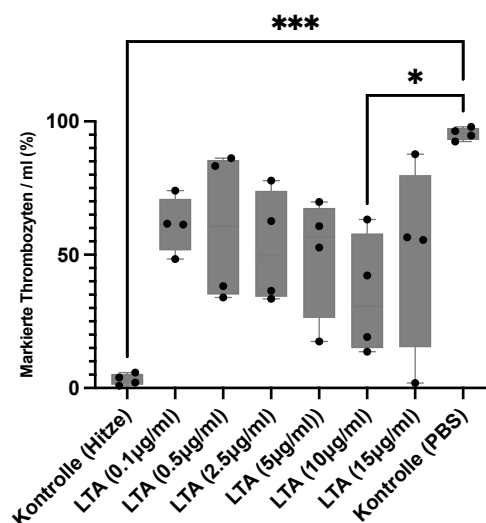


ABBILDUNG 12: UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT VON LIPOTEICHONSÄURE AUF THROMBOZYTEN

Dargestellt ist der prozentuale Anteil Calcein-AM-positiver Thrombozyten nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von Hämolyisin α (HEM). Die PBS-Gruppe dient als Positivkontrolle, die hitzeinaktivierte Probe als Negativkontrolle.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, $n = 4$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$)

4.2.2. Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure

Thrombozyten adhären auf einer mit Fibrinogen beschichteten Platte. Unter Zugabe des plättchenaktivierenden Stoffes ADP zeigte sich eine signifikante Adhäsionserhöhung der Thrombozyten auf der Oberfläche. Dies fungierte als Positivkontrolle. Nach Inkubation mit Lipoteichonsäure führten höhere Konzentrationen (ab 5 $\mu\text{g/ml}$) zu einer signifikanten Adhäsionsreduktion der Thrombozyten im Vergleich zur Positivkontrolle (siehe Abbildung 13).

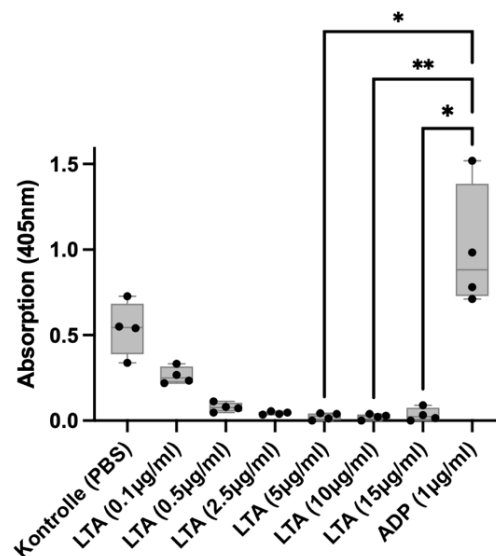


ABBILDUNG 13: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE AUF FIBRINOGEN

Das Ausmaß der Adhäsion ist durch die Absorption auf der Ordinate dargestellt. Auf der Abszisse sind die Kontrollbedingung (PBS), Lipoteichonsäure (LTA) in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 0,5 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$ sowie die Positivkontrolle ADP (1 $\mu\text{g/ml}$) angegeben. Isolierte Thrombozyten (1×10^6 pro Well) adhären auf einer mit Fibrinogen beschichteten 96-Well-Platte. Dargestellt sind Median und Interquartilsbereich; einzelne Messwerte sind als Punkte gezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den gekennzeichneten Gruppen sind durch Sterne markiert.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, $n = 4$; * $p < 0.05$; ns $p > 0.05$)

4.2.3. Adhäsionsverhalten humaner Thrombozyten nach Inkubation von Fibrinogen mit Lipoteichonsäure

Im Gegensatz zum äquivalenten Versuch mit Hämolyisin α konnte bei vorheriger Behandlung der mit Fibrinogen beschichteten Platte mit Lipoteichonsäure aufsteigender Konzentrationen eine signifikante Reduktion der Adhäsion der Thrombozyten im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet werden (Abbildung 14). Bereits die geringe Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ bewirkte eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Positivkontrolle ohne bakterielle Bestandteile.

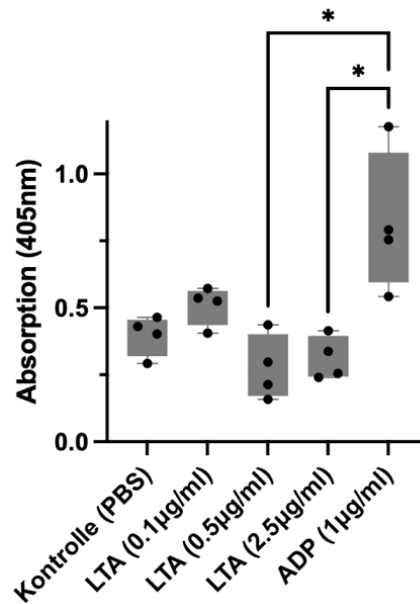


ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH VORHERIGER INKUBATION VON FIBRINOGEN MIT LIPOTEICHONSÄURE

Humane isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Die Inkubation der beschichteten Wells-Platte mit Lipoteichonsäure (LTA) unterschiedlicher Konzentrationen vor Zugabe der Thrombozyten führt je nach Konzentration zu einer signifikanten Veränderung des Adhäsionsverhaltens der Thrombozyten im Vergleich zur Positivkontrolle mit ADP.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.2.4. Vergleich des Adhäsionsverhaltens humaner Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure auf Fibronectin und Kollagen

Der Einsatz unterschiedlicher Bestandteile der extrazellulären Matrix zeigte ein unterschiedliches Adhäsionsverhalten der Thrombozyten. Die Zugabe des bakteriellen Bestandteils Lipoteichonsäure bewirkte auf der Platte mit Fibronectin eine ähnliche Adhäsionsreduktion wie auf Fibrinogen, allerdings waren die Ergebnisse nur bei höherer Konzentration signifikant (siehe Abbildung 15). Auf einer mit Kollagen beschichteten Platte war im Vergleich zu Fibrinogen und Fibronectin ein viel geringer ausgeprägtes Adhäsionsverhalten insgesamt zu beobachten (siehe Abbildung 16). Die Thrombozytenadhäsion war auf Kollagen nach Zugabe höherer Konzentrationen von Lipoteichonsäure wie auf Fibrinogen ebenfalls reduziert. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich zur Positivkontrolle, lediglich im Vergleich zu einer geringeren Konzentration von Lipoteichonsäure.

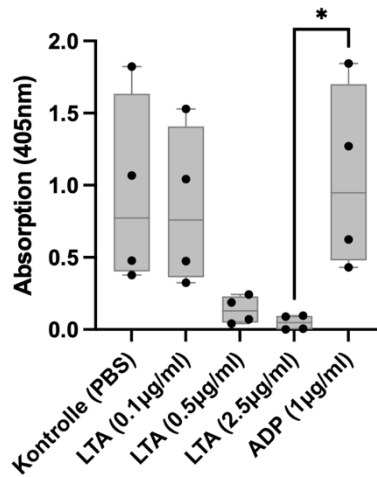


ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE AUF FIBRONECTIN

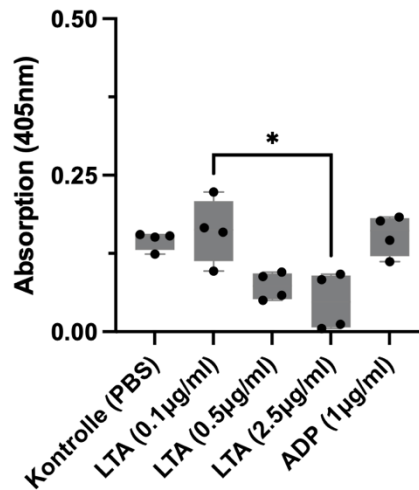


ABBILDUNG 16: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE AUF KOLLAGEN

Bei einer Beschichtung mit Kollagen ist insgesamt weniger Adhäsion zu messen als bei einer Beschichtung mit Fibronectin. Mit Lipoteichonsäure versetzte Thrombozyten zeigen auf Fibronectin nur bei höherer Konzentration eine signifikante Adhäsionsreduktion im Vergleich zur Positivkontrolle (ADP (1 µg/ml)). Auf Kollagen kann keine verstärkte Adhäsionsreduktion nach Zugabe von Lipoteichonsäure gezeigt werden.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.3. Versuche mit Komplementinhibitoren

4.3.1. Rolle von C3a-/C5a-Rezeptorantagonisten bei der Thrombozytenadhäsion unter Hämolysin- α -Exposition

In diesem Experiment wurden verschiedene Gruppen untersucht, die dann mit einer Kontrollgruppe verglichen wurden, die dem grundsätzlichen Versuchsaufbau entsprach. Dabei wurden, wie im Methodenteil beschrieben, die C3a- bzw. C5a-Rezeptorantagonisten (SB290157 bzw. PMX53) verwendet. Zunächst wurde geprüft, ob die Inkubation der Thrombozyten mit Hämolysin innerhalb der Kontrollgruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorangegangenen Analysen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der PBS-Kontrolle und der ADP-stimulierten Positivkontrolle, während zwischen den übrigen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

In einem zweiten Schritt wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten nach Behandlung mit dem C3a- bzw. C5a-Rezeptorantagonisten unter denselben statistischen Voraussetzungen analysiert. Hierbei ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in der Adhäsionsreaktion zwischen der PBS-Kontrolle und der ADP-stimulierten Positivkontrolle.

Anschließend wurden jeweils paarweise Vergleiche zwischen unbehandelten und mit dem C3a- bzw. C5a-Rezeptorantagonisten (SB290157 bzw. PMX53) behandelten Thrombozyten durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Gruppen (PBS vs. PBS + SB290157, HEM vs. HEM + SB290157 sowie ADP vs. ADP + SB290157 und PBS vs. PBS + PMX53, HEM vs. HEM + PMX53 sowie ADP vs. ADP + PMX53) mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Es zeigte sich in der C3aR-Antagonist-Gruppe eine signifikant höhere Adhäsion nach Zugabe von ADP im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor. Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen, auch nicht nach Inkubation der Thrombozyten der verschiedenen Gruppen mit Hämolysin α (Abbildung 17).

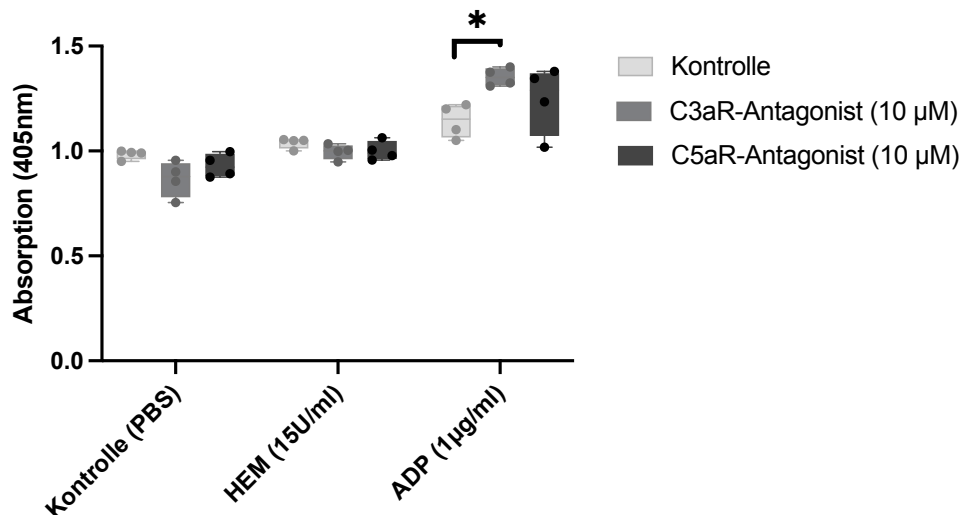


ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT KOMPLEMENTREZEPTORINHIBITOREN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A

Isolierte Thrombozyten adhäreren an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Hier ist im Vergleich das Adhäsionsverhalten nach Zugabe von SB290157 (C3aR-Antagonist) bzw. von PMX53 (C5aR-Antagonist) dargestellt. Die Inkubation der Thrombozyten mit Hämolysin α (HEM) führt zu keinen signifikanten Unterschieden im Adhäsionsverhalten der verschiedenen Gruppen mit SB290157 bzw. PMX53 im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.3.2. Rolle von C3a-/C5a-Rezeptorantagonisten bei der Thrombozytenadhäsion unter Lipoteichonsäure-Exposition

Der oben gezeigte Versuch (4.3.1) wurde nun analog mit Lipoteichonsäure durchgeführt. Zunächst wurde geprüft, ob die Inkubation der Thrombozyten mit Hämolysin innerhalb der Kontrollgruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorangegangenen Analysen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach Inkubation mit Lipoteichonsäure und der ADP-stimulierten Positivkontrolle.

Es wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten nach Behandlung mit dem C3a- bzw. C5a-Rezeptorantagonisten unter denselben statistischen Voraussetzungen analysiert. Hierbei ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede in der Adhäsionsreaktion nach Zugabe von Lipoteichonsäure und der ADP-stimulierten Positivkontrolle.

Anschließend wurden jeweils paarweise Vergleiche zwischen unbehandelten und mit dem C3a- bzw. C5a-Rezeptorantagonisten (SB290157 bzw. PMX53) behandelten Thrombozyten durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Gruppen (PBS vs. PBS + SB290157, LTA vs. LTA + SB290157 sowie ADP vs. ADP + SB290157 und PBS vs. PBS + PMX53, LTA vs. LTA + PMX53

sowie ADP vs. ADP + PMX53) mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Wieder zeigte sich in der C3aR-Antagonist-Gruppe eine signifikant höhere Adhäsion nach Zugabe von ADP im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor. Ansonsten waren keine signifikanten Unterschiede zu sehen, auch nicht nach Inkubation der Thrombozyten der verschiedenen Gruppen mit Lipoteichonsäure (Abbildung 18).

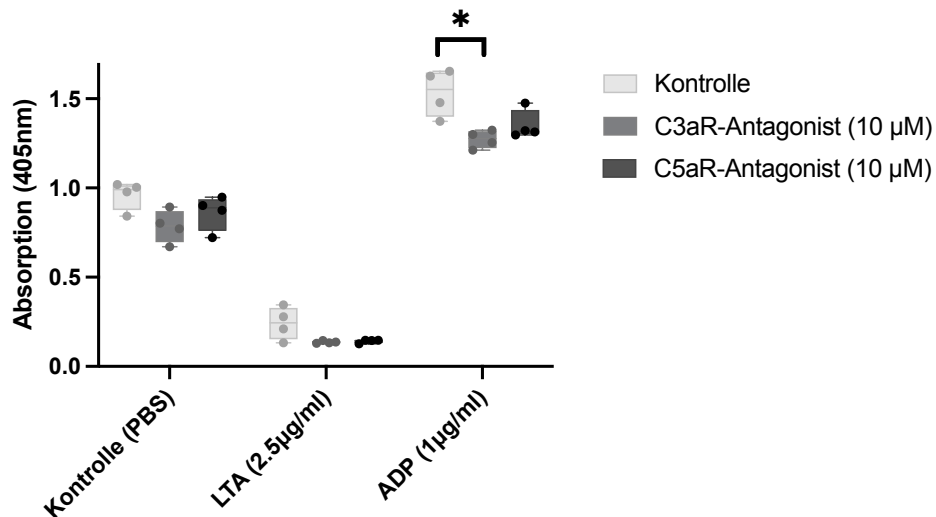


ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT KOMPLEMENTREZEPTORINHIBITOREN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE

Isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Hier ist im Vergleich das Adhäsionsverhalten nach Zugabe von SB290157 (C3aR-Antagonist) bzw. von PMX53 (C5aR-Antagonist) dargestellt. Die Inkubation der Thrombozyten mit Lipoteichonsäure (LTA) führt zu keinen signifikanten Unterschieden im Adhäsionsverhalten der verschiedenen Gruppen mit SB290157 bzw. PMX53 im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.3.3. Einfluss von Compstatin auf die Hämolyisin- α -induzierte Thrombozytenaktivierung

Compstatin ist ein Inhibitor des Komplementfaktors C3. Verglichen wurde eine Gruppe mit Compstatin-behandelten Thrombozyten mit einer Gruppe ohne Inhibitor (Kontrollgruppe mit PBS). Es wurde das Adhäsionsverhalten nach Inkubation mit Hämolyisin α verglichen. Zunächst wurde geprüft, ob die Inkubation der Thrombozyten mit Hämolyisin innerhalb der Kontrollgruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorangegangenen Analysen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen der PBS-Kontrolle und der ADP-stimulierten Positivkontrolle, während zwischen den übrigen Bedingungen keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

In einem zweiten Schritt wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten nach Behandlung mit Compstatin unter denselben statistischen Voraussetzungen analysiert. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Anschließend wurden jeweils paarweise Vergleiche zwischen unbehandelten und mit Compstatin behandelten Thrombozyten durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Gruppen (PBS vs. PBS + Compstatin, HEM vs. HEM + Compstatin sowie ADP vs. ADP + Compstatin) mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. In keinem dieser Vergleiche konnten signifikante Unterschiede zwischen Thrombozyten mit und ohne Compstatin nachgewiesen werden (Abbildung 19).

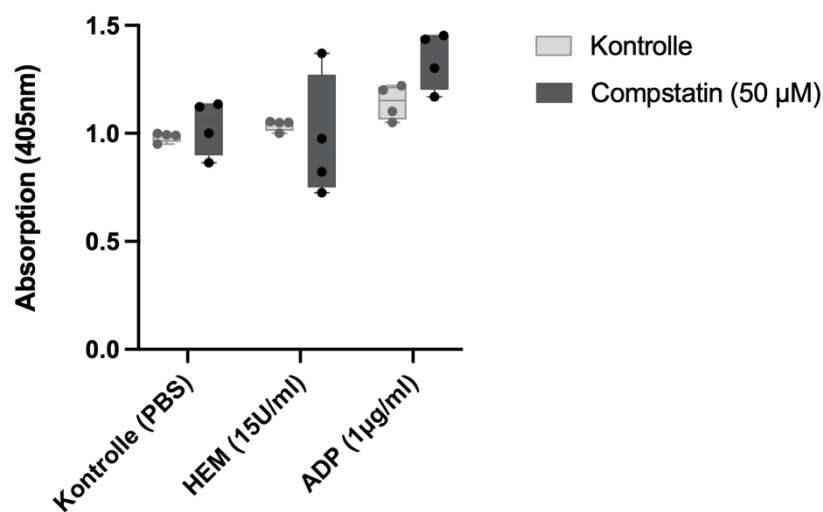


ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT COMPSTATIN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A

Isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Hier ist im Vergleich das Adhäsionsverhalten nach Zugabe von Compstatin (C3-Inhibitor) dargestellt. Die Inkubation der Thrombozyten mit Hämolysin α (HEM) führt zu keiner signifikanten Veränderung des Adhäsionsverhaltens in der Compstatin-Gruppe im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.3.4. Einfluss von Compstatin auf die Lipoteichonsäure-induzierte Thrombozytenaktivierung

Der gleiche Versuch wie oben mit Hämolysin α beschrieben wurde nun mit Lipoteichonsäure durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die Zugabe von Hämolysin innerhalb der Kontrollgruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorherigen Untersuchungen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem

Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Adhäsionsreduktion nach Zugabe von LTA im Vergleich zu der ADP-stimulierten Positivkontrolle.

Im nächsten Analyseschritt wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten nach Behandlung mit Compstatin unter denselben statistischen Voraussetzungen untersucht. Auch hier ergab der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Test einen signifikanten Unterschied nach Zugabe von LTA im Vergleich zu der ADP-stimulierten Positivkontrolle. Anschließend wurden paarweise Vergleiche zwischen unbehandelten und mit Compstatin behandelten Thrombozyten innerhalb identischer Stimulationsbedingungen durchgeführt. Hierzu wurden die Gruppen PBS vs. PBS + Compstatin, LTA vs. LTA + Compstatin sowie ADP vs. ADP + Compstatin mittels Mann-Whitney-U-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. In keinem der Vergleiche konnten signifikante Unterschiede zwischen Thrombozyten mit und ohne Compstatin festgestellt werden (Abbildung 20).

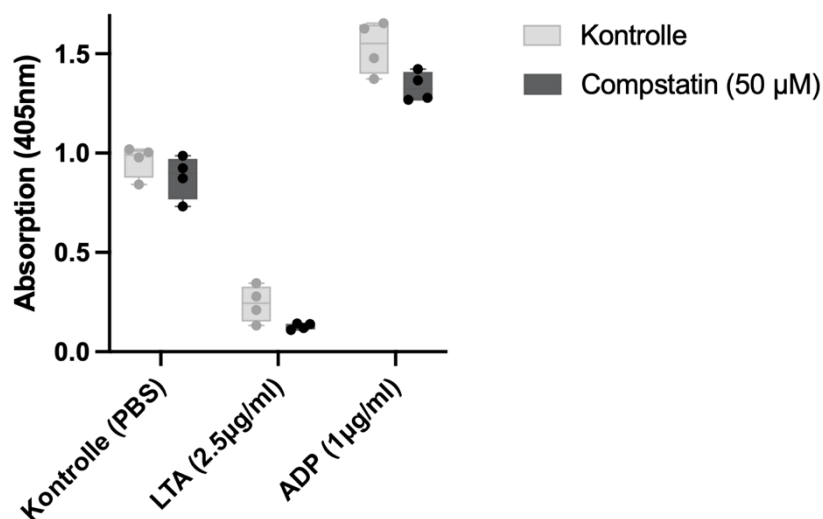


ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT COMPSTATIN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE

Isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Hier ist im Vergleich das Adhäsionsverhalten nach Zugabe von Compstatin (C3-Inhibitor) dargestellt. Die Inkubation der Thrombozyten mit Lipoteichonsäure (LTA) führt zu keiner signifikanten Veränderung des Adhäsionsverhaltens in der Compstatin-Gruppe im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Komplementrezeptoren für C3a und C5a auf Thrombozyten und der Komplementfaktor C3 vermutlich keine große Rolle in der Thrombozytenadhäsion im Zusammenhang mit bakteriellen Bestandteilen von *Staphylococcus aureus* spielen.

4.4. Versuche mit murinen Thrombozyten

4.4.1. Adhäsionsverhalten muriner Thrombozyten nach Inkubation mit Hämolysin α

Murine Thrombozyten adhäreren, wie auch humane Thrombozyten, auf einer mit Fibrinogen beschichteten Platte. Es wurden Thrombozyten von Wildtyp-Tieren und von C5aR1^{-/-}-Tieren isoliert und die Resultate verglichen. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 21 gezeigt. Die Versuche wurden auf die gleiche Weise wie die Versuchsreihe 4.5 ausgewertet.

Zunächst wurde untersucht, ob die Zugabe von Hämolysin α innerhalb der Wildtyp-Gruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorherigen Untersuchungen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Adhäsionsunterschiede.

Im nächsten Analyseschritt wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten bei den C5aR1^{-/-}-Tieren unter denselben statistischen Voraussetzungen untersucht. Auch hier ergab der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Test keinen signifikanten Unterschied nach Zugabe von Hämolysin α . Anschließend wurden paarweise Vergleiche zwischen Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Thrombozyten innerhalb identischer Stimulationsbedingungen durchgeführt.

Beim Vergleich der Thrombozytenreaktion der Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Tiere fiel insgesamt eine signifikant geringere Adhäsionsreaktion bei C5aR1^{-/-}-Thrombozyten auf. Bei der isolierten Untersuchung der C5aR1^{-/-}-Tiere fiel auf, dass die Adhäsionsreaktion vor und nach Zugabe von Hämolysin α ähnlich ausgeprägt war und durch die Zugabe von Hämolysin α nicht signifikant verringert werden konnte (siehe Abbildung 22).

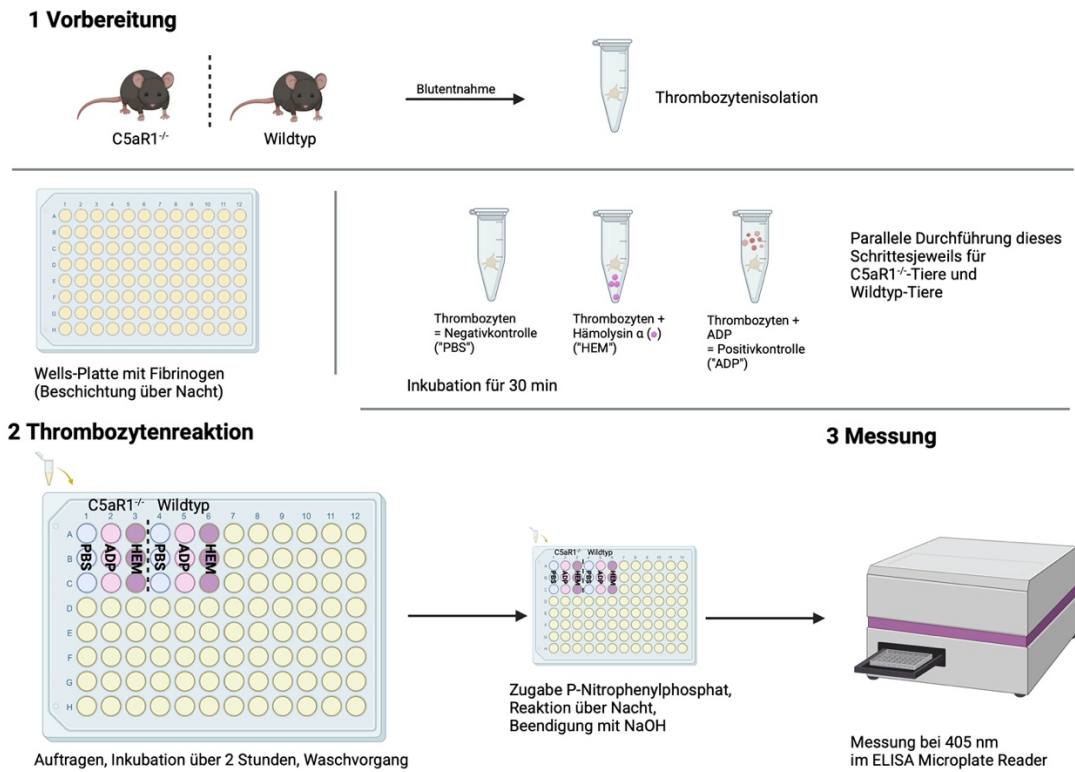


ABBILDUNG 21: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF DAS ADHÄSIONSVERHALTEN VON WILD-TYP- UND C5aR1^{-/-}-THROMBOZYTEN

Die Abbildung veranschaulicht den vereinfachten Versuchsaufbau. Es wurden Wells-Platten mit Fibrinogen beschichtet. Am Folgetag wurden Thrombozyten von Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Tieren isoliert und mit Hämolysin α inkubiert. Die Probelösungen wurden auf die Wells-Platte aufgetragen und es wurde P-Nitrophenylphosphat appliziert. Nach Beendigung der Reaktion konnte die Messung von adhärenierten Thrombozyten erfolgen.

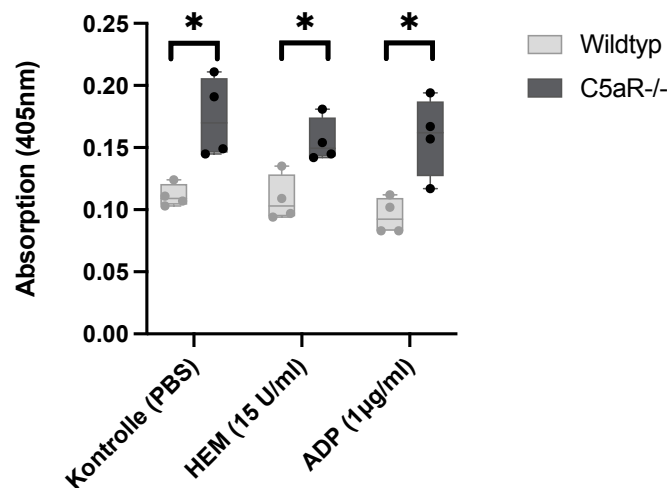


ABBILDUNG 22: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION MURINER WILD-TYP- UND C5aR1^{-/-}-THROMBOZYTEN AUF FIBRINOGEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A

Murine isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Insgesamt zeigt sich eine signifikant geringere Adhäsion der Thrombozyten der C5aR1^{-/-}-Tiere im Vergleich zu der Adhäsion der Thrombozyten der Wildtyp-Tiere. ADP dient als Positivkontrolle.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

4.4.2. Adhäsionsverhalten muriner Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure

Es wurden erneut Thrombozyten von Wildtyp-Tieren und von C5aR1^{-/-}-Tieren isoliert und das Verhalten der Thrombozyten verglichen. ADP diente als Positivkontrolle, orientierend an den oben genannten Versuchen (Abbildung 22).

Zunächst wurde untersucht, ob die Zugabe von Lipoteichonsäure innerhalb der Wildtyp-Gruppe zu signifikanten Unterschieden in der Adhäsionsreaktion führte. Hierzu wurde – analog zu den vorherigen Untersuchungen – ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Post-hoc-Test durchgeführt. Dabei zeigte sich eine signifikante Adhäsionsreduktion nach Zugabe von Lipoteichonsäure im Vergleich zur Positivkontrolle mit ADP.

Im nächsten Analyseschritt wurde die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten bei den C5aR1^{-/-}-Tieren unter denselben statistischen Voraussetzungen untersucht. Auch hier ergab der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's-Test eine signifikante Reduktion nach Zugabe von Lipoteichonsäure. Anschließend wurden paarweise Vergleiche zwischen Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Thrombozyten innerhalb identischer Stimulationsbedingungen durchgeführt.

Beim Vergleich der Thrombozyten von Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Tieren zeigte sich insgesamt ein ähnlicher Trend. Beim direkten Vergleich der Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure bestätigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 23).

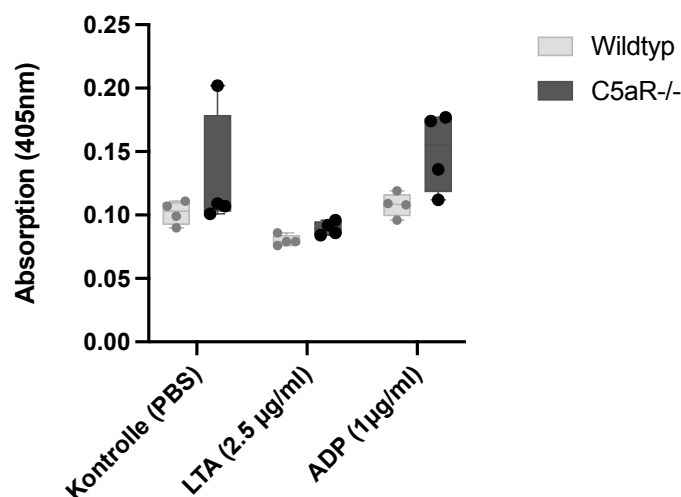


ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION MURINER WILDTYP- UND C5aR1^{-/-}-THROMBOZYTEN AUF FIBRINOGEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE

Murine isolierte Thrombozyten adhären an einer mit Fibrinogen beschichteten Wells-Platte. Die Inkubation der Thrombozyten mit Lipoteichonsäure (LTA) führt zu signifikanten Veränderungen des Adhäsionsverhaltens der Thrombozyten. Beim Vergleich des Adhäsionsverhaltens der Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Thrombozyten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. ADP dient als Positivkontrolle.

(Daten: Einzelwerte mit Boxplots, n = 4; * p < 0.05; ns p > 0.05)

Insgesamt wurde auch nach mehrmaliger Wiederholung der Versuche ein viel geringeres Absorptionsverhalten der murinen Thrombozyten im Vergleich zu humanen Thrombozyten beobachtet. Die Ergebnisse konnten dennoch ausgewertet und ins Verhältnis gesetzt werden.

4.5. Mikroskopische Kontrolle

Um sicherzustellen, dass die Thrombozyten an die Oberfläche der Wells-Platten adhärirten, führten wir nach jedem Versuch eine stichprobenartige mikroskopische Kontrolle durch. Die Ergebnisse zeigten, dass die Thrombozyten, trotz des Waschschriffs, an der Oberfläche hafteten. Interessanterweise adhärirten die Thrombozyten dabei eher als Einzelzellen und nicht als Zellaggregate.

5. Diskussion

Schon seit vielen Jahren ist bekannt, dass unterschiedlichste Bakterien mit Thrombozyten interagieren können. Solche Vorgänge können wesentlich zur Entstehung von Infektionen und nachfolgend zu kardiovaskulären Komplikationen beitragen (Fitzgerald, Foster & Cox 2006). Durch Kontakt mit Bakterien werden Thrombozyten aktiviert, senden Botenstoffe aus, können aggregieren und Thromben bilden oder an Flächen bzw. Gewebe adhären. Dies geschieht unter anderem durch Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, an die Bakterien oder deren Pathogenitätsfaktoren binden können. Um sich dem Verständnis von Interaktionen zwischen *Staphylokokkus aureus* und Thrombozyten ein kleines Stück anzunähern, wurden für diese Arbeit zwei für das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten relevant erscheinende Pathogenitätsfaktoren ausgewählt. Wir wollten herausfinden, ob Hämolyisin α und Lipoteichonsäure von *Staphylokokkus aureus* die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten auf extrazellulärer Matrix verändern und ob dies die Theorie der Entstehung von Herzklappenvegetationen untermauert.

Nach Durchführung einer Versuchsreihe mit beiden Pathogenitätsfaktoren lassen sich die im Folgenden aufgeführten Aussagen treffen: Die beiden Pathogenitätsfaktoren Hämolyisin α und Lipoteichonsäure verändern in unterschiedlichem, konzentrationsabhängigem Maße das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten auf extrazellulären Bestandteilen. Entgegen der Erwartung, die Adhäsion könne durch Inkubation der Thrombozyten mit Pathogenitätsfaktoren erhöht werden, konnte in dieser Arbeit eine verringerte Adhäsion mit steigender Konzentration von Hämolyisin α und Lipoteichonsäure beobachtet werden. Da bei Zugabe von *Staph. aureus* eine verstärkte Thrombozytenaggregation beobachtet wurde, lag die Vermutung nahe, dass auch die Adhäsionsreaktion verstärkt werden könnte (Bayer et al. 1995; Kerrigan et al. 2008). Beide Faktoren des Bakteriums haben jedoch, zumindest in der vorliegenden Versuchskonstellation, einen ähnlichen, adhäsionsmindernden Einfluss auf Thrombozyten. Um zu belegen, dass der festgestellte Effekt zwischen den Virulenzfaktoren und Thrombozyten, anstatt zwischen den Virulenzfaktoren und Fibrinogen auftritt, wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem die Virulenzfaktoren zunächst mit Fibrinogen inkubiert wurden, bevor Thrombozyten hinzugefügt wurden. Es zeigte sich lediglich bei höheren Konzentrationen von Lipoteichonsäure eine signifikante Adhäsionsreduktion im Vergleich zur

Gruppe ohne Pathogenitätsfaktoren. Nach Zugabe von Hämolyisin α zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Es ist davon auszugehen, dass die nach Inkubation mit Lipoteichonsäure beobachtete Reduktion der Adhäsion eher auf Effekte zurückzuführen ist, die mit denen der vorangegangenen Versuche vergleichbar sind, als auf eine direkte Interaktion zwischen dem Pathogenitätsfaktor und Fibrinogen. Der Vergleich dreier Bestandteile der extrazellulären Matrix (Fibrinogen, Fibronectin und Kollagen) konnte zeigen, dass Unterschiede im Adhäsionsverhalten zwischen diesen Bestandteilen bestehen. So adhären Thrombozyten generell besser auf Fibrinogen und auf Fibronectin als auf Kollagen. Für unsere Fragestellung war jedoch Folgendes relevant: Es zeigte sich der gleiche, oben bereits erwähnte Trend, dass bei höherer Konzentration der Pathogenitätsfaktoren weniger Adhäsionsverhalten zu erwarten ist. Darüber hinaus wurde untersucht, ob bestimmte Elemente des Komplementsystems das Adhäsionsverhalten im vorhandenen Versuchsaufbau beeinflussen. Es wurden dazu ein C3-Inhibitor (Compstatin), ein C3a- und ein C5a-Rezeptor-Inhibitor (SB290157 bzw. PMX53) verwendet. Durch den Vergleich der Effekte von Compstatin (C3-Inhibitor) mit den C3a- und C5a-Rezeptor-Inhibitoren konnten wir unterschiedliche Aspekte der Komplementkaskade untersuchen und herausfinden, ob ein Schritt der Komplementaktivierung entscheidend für die beobachteten Effekte ist. Es wäre möglich, dass Effekte der Pathogenitätsfaktoren durch die opsonisierende Wirkung von C3 oder durch die Freisetzung von Anaphylatoxinen (C3a, C5a) vermittelt werden. Allerdings hatten weder Compstatin noch die C3a- und C5a-Rezeptor-Inhibitoren einen signifikanten Einfluss auf die Adhäsionsreduktion nach Zugabe der Pathogenitätsfaktoren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Um diesen Versuch zu erweitern, wurde mit murinen Thrombozyten von C5aR1^{-/-}-Mäusen gearbeitet und die Ergebnisse mit denen von Wildtyp-Mäusen verglichen. Bei Zugabe von Hämolyisin α ergaben sich weder bei den Wildtyp-, noch bei den C5aR1^{-/-}-Tieren eine signifikante Adhäsionsreduktion. Bei Zugabe von Lipoteichonsäure war die Adhäsionsreduktion in Relation zu den C5aR1^{-/-}-Tieren nicht signifikant anders. Es ergaben sich somit bei humanen und murinen Thrombozyten ähnliche Ergebnisse.

Vor Beginn der eigentlichen Versuchsreihe sollte eine komplette Zytotoxizität der Pathogenitätsfaktoren ausgeschlossen werden. Dazu wurde jeweils mit Hämolyisin α und Lipoteichonsäure ein Assay mit Calcein AM[®] zur Messung der Zytotoxizität auf Thrombozyten durchgeführt. Wir wollten dabei erfahren, ob prinzipiell nach Zugabe der Pathogenitätsfaktoren noch vitale Plättchen vorhanden sind. Dieses Verfahren basierte auf

einer Methode von Gillissen et al., die eine Möglichkeit gefunden hatten, mittels Durchflusszytometrie einzelne vitale, auch adhärierende Zellen anzufärben und nachzuweisen (Gillissen et al. 2016). In der Vergangenheit hatten bereits weitere Forschungsgruppen Calcein verwendet, um vitale Zellen nachzuweisen (Neri et al. 2001; Galluzzi et al. 2009). Die Methodik schien von Vorteil, da sie recht unkompliziert und sensitiv war. Durch die Messung der enzymatischen Umsetzung von Calcein durch intrazelluläre Esterasen, somit also der direkten Messung vitaler Zellen, konnten unspezifische Signale, die bei nekrotischen oder apoptotischen Vorgängen entstehen können, vermieden werden (Gillissen et al. 2016).

Hauptsächlich bediente sich die vorliegende Arbeit aber einer anderen, recht gut umsetzbaren und gleichzeitig auch gut reproduzierbaren Methodik. Die Voraussetzung für die durchgeführten Methoden war die Isolation der humanen und murinen Thrombozyten. Diese folgte einem etablierten Protokoll, das in der Arbeitsgruppe häufig genutzt wird (Nording et al. 2021). Die isolierten Zellen wurden dann nach einem von Bellavite et al. entwickelten Versuchsaufbau weiterverwendet. Diese Arbeitsgruppe hatte bereits in den 1990er-Jahren ein vielversprechendes und sensitives Adhäsionsassay entwickelt, mit dem die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten auf einer mit extrazellulären Bestandteilen beschichteten Wells-Platte untersucht wurde. Die Messwerte beruhen auf der Aktivität der zellulären, unter anderem in Thrombozyten enthaltenen, sauren Phosphatase. Dieses Enzym wird unabhängig vom Aktivierungszustand der Zelle freigesetzt. Wir orientierten uns an dem bereits entwickelten Versuchsprotokoll und maßen das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion mittels Microplate Reader bei 405 nm. Wir konnten ebenfalls, zumindest beim Großteil der Versuche, feststellen, dass die Adhäsionsreaktion von Thrombozyten auf der mit Plasmabestandteilen beschichteten Oberfläche bei Zugabe von ADP als Aktivator von Thrombozyten stärker war. In den durchgeführten Versuchen wurde ADP als Positivkontrolle verwendet. Allerdings konnte festgestellt werden, dass der Unterschied zur Lösung ohne ADP (nur PBS) nicht allzu groß war. Daher könnte man hinterfragen, ob die Zugabe von ADP überhaupt von Nöten ist. Auch Bellavite et al. kamen zu ähnlichen Resultaten. Vermutlich hätte allerdings mehr ADP auch zu mehr Adhäsion geführt, was aber bei diesem Versuchsaufbau nicht ausschlaggebend für die Resultate mit den Pathogenitätsfaktoren war. Zieht man weitere, Thrombozyten-aktivierende Substanzen in Erwägung, stößt man in der Literatur oft auf Thrombin. ADP regt allerdings im Vergleich zu Thrombin eher die Adhäsions- als die Aggregationsreaktion an, was gewünscht

war. Bellavite et. al konnten mikroskopisch eine reine Adhäsionsreaktion nachweisen, weshalb die Entscheidung in der vorliegenden Arbeit auf ADP fiel (Bellavite et al. 1994).

Insgesamt ist diese Methode vielseitig und relativ sensitiv. Im Vergleich zu anderen denkbaren Messmethoden für Plättchen ergaben sich einige Vorteile. Es wurden eher wenig Thrombozyten pro Versuchsreihe benötigt (1×10^6 Thrombozyten pro Well). Das bedeutete auch weniger Bedarf an biologischem Material, was von Vorteil war. Außerdem war der Zeitaufwand im Vergleich zur reinen mikroskopischen Analyse recht gering. Die mikroskopische Messung hätte jedoch den Vorteil einer differenzierteren Darstellung der Zellen. Darüber hinaus gibt es in der Literatur beschriebene Messmethoden für Thrombozyten mittels radioaktiver Markierung, was natürlich immer ein Risiko der Strahlungsbelastung für das Personal bedeutet und besondere Ausstattung eines Labors erfordert (Lahav, Schwartz & Hynes 1982; Resmi, Varghese & Krishnan 2004).

Eine Herausforderung besteht beim Arbeiten mit Thrombozyten darin, dass Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten sehr ähnliche Vorgänge sind, die nicht ohne Weiteres voneinander zu trennen sind. Im beschriebenen Versuchsaufbau wurde jedoch durch verschiedene Aspekte versucht, eine Thrombozytenaggregation durch sehr vorsichtiges Arbeiten während des Inkubationsvorgangs und vorsichtiges Waschen der Wells-Platten möglichst zu verhindern. Auch die Konzentration der Thrombozyten wurde im Verhältnis zur physiologischen Konzentration im Blut geringer gewählt, was zu weniger Aggregation der Zellen untereinander führt. Dennoch ist der vollständige Ausschluss der Thrombozytenaggregation bei solch einem Versuch kaum möglich. Die stichprobenartige mikroskopische Analyse zeigte jedoch, ebenso wie bei Bellavite et al., dass die Thrombozyten größtenteils nicht als Aggregate, sondern als einzelne Zellen auf der Oberfläche adhärirten. Ein Nachteil der Methode besteht darin, dass in vitro unter statischen Bedingungen getestet wurde (Bellavite et al. 1994). Die vorliegenden Ergebnisse beziehen sich auf die Verhältnisse in vitro und lassen natürlich nur bedingt die gleichen Schlussfolgerungen in vivo zu. Sicherlich wäre der Versuchsaufbau unter dynamischen Bedingungen auch sehr interessant. Dennoch schien die Methode für diese Arbeit passend und lieferte interessante Ergebnisse. Die vorhandene Stichprobengröße war ausreichend, um signifikante Ergebnisse zu zeigen. Zudem konnte der Versuchsaufbau mit murinem Blut ebenso wie mit humanem durchgeführt werden. Allerdings waren die messbaren Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen bei

murinem Blut geringer. Es stellt sich daher die Frage, ob die Methode für weitere Versuchsreihen mit murinem Blut bei zukünftigen Versuchen perfektioniert werden müsste. Zudem ist es selbstverständlich nicht von der Hand zu weisen, dass mehr Probanden oder mehr Versuchstiere möglicherweise bei manchen Versuchen klarere Tendenzen gezeigt hätten. Positiv hervorzuheben ist schließlich, dass sich der nun etablierte Versuchsaufbau für eine unkomplizierte Erweiterung der Untersuchungen anbieten würde und daher weitere Möglichkeiten eröffnet.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass unter Zugabe und Inkubation von Thrombozyten mit *Staphylokokkus aureus* eine verstärkte Thrombozytenaktivierung stattfinden kann. Eine Verallgemeinerung dieser Aussage ist jedoch nicht ohne Weiteres möglich, denn einige Pathogenitätsfaktoren, wie etwa Enterotoxin B von *Staphylokokkus aureus*, scheinen die Aggregation zu verringern (Tran et al. 2006). Da, wie bereits im Einleitungsteil beschrieben, Thrombozytenaktivierung und -adhäsion eng verknüpfte physiologische Vorgänge im Aktivierungsprozess darstellen, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Adhäsionsreaktion verstärkt werden könnte. Andererseits sprachen Fitzgerald et al. von zwei differenziert zu betrachtenden Vorgängen. Es ist denkbar, dass eine Thrombozytenaggregation verstärkt wird, während die Adhäsion verringert wird. Es gibt möglicherweise einen „aktivierenden“ und „adhäsiven Phänotypen“, den Bakterien haben und der zur Entwicklung von Infektionen beiträgt (Fitzgerald et al. 2006). Es gibt wahrscheinlich bakterielle Proteine, die nur zu Adhäsion beitragen. Manche scheinen aber auch Adhäsion und Aggregation voranzutreiben (Cox et al. 2011).

Divyakolu et al. untersuchten im Jahr 2019 Hämolysin α sehr detailliert und lieferten wertvolle Grundlagen für diese Arbeit. Sie arbeiteten wie wir mit sublytischen Konzentrationen. Die Interaktion des Toxins mit Zellen ist konzentrationsabhängig und Interaktionen mit Rezeptoren sind eher bei geringeren Konzentrationen zu beobachten. Eine Zelllyse scheint bei einer Konzentration von Hämolysin $\alpha > 33 \text{ ng}/\mu\text{l}$ stattzufinden. Das entspricht 330 U/ml Lösung. Wir verwendeten minimal 1 U/ml bzw. maximal 20 U/ml, was weit unter der von Divyakolu et al. angegebenen Konzentrationsgrenze liegt (Divyakolu et al. 2019). Es ist anzunehmen, dass eine Zelllyse umgangen wurde. Außerdem konnte bei Erythrozyten beobachtet werden, dass bei geringeren Konzentrationen eine spezifischere Reaktion stattfindet als bei höheren Konzentrationen (Hildebrand et al. 1991). Es wäre denkbar, dass

dies bei Thrombozyten ähnlich ist. Allerdings ist anzumerken, dass unterschiedliche Zellen auch unterschiedlich auf das Toxin reagieren und daher Erkenntnisse mit anderen Zelltypen nicht direkt auf Thrombozyten übertragbar sind (Divyakolu et al. 2019). Es konnte eine verringerte Adhäsion der Thrombozyten auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix in nahezu allen durchgeführten Versuchen mit Hämolysin α festgestellt werden. Leeten et al. untersuchten ebenfalls das Adhäsions- und Aggregationsverhalten von Thrombozyten und zeigten bei „sublytischen Konzentrationen“ eine verringerte Adhäsionsreaktion. Hinzuzufügen ist dem jedoch, dass „lytische Konzentrationen“ des Toxins eher das Gegenteil bewirken (Bhakdi et al. 1988; Powers et al. 2012; Surewaard et al. 2018). Die verringerte Adhäsionsreaktion führten sie auf die Spaltung des GP-VI-Rezeptors durch die Bindung des Toxins an ADAM10 auf Thrombozyten zurück (Leeten et al. 2021). Glykoprotein-VI präsentiert sich auf der Thrombozytenoberfläche als Dimer aus einem Fc-Rezeptor und dem eigentlichen Glykoprotein und bindet Kollagen. Es scheint bei der Thrombenbildung beteiligt zu sein (Moroi & Jung 2004). Auch Jahn et al. stellten eine verringerte Thrombenbildung bei Zugabe des Toxins fest und sprachen von „instabilen“ Thromben (Jahn et al. 2022). Surewaard et al. konnten andererseits eine verstärkte Thrombenbildung in Blutgefäßen in Zusammenhang nach intravenöser Verabreichung von Hämolysin α in sublytischen Konzentrationen in Mäusen zeigen. Sie führten die Entstehung von Organschäden mitunter auf die Ablagerung dieser Thromben in kleinsten Blutgefäßen zurück. Interessanterweise zeigten sie in ihrer Arbeit eine verstärkte Adhäsion dieser Thromben in Leber und Niere, nicht aber in Mikrogefäßen der Haut oder der Lunge. Dies ist ein Hinweis auf eine sehr heterogene Wirkung des Toxins auf die Thrombozytenadhäsion und widerspricht somit nicht den Daten dieser Arbeit (Surewaard et al. 2018). Schubert et al. zeigten veränderte Plättcheneigenschaften durch Hämolysin α und vermuteten einen Zusammenhang zur Entwicklung einer Endokarditis. Bei adhärennten Thrombozyten auf Bestandteilen extrazellulärer Matrix stellten sie einen Erhalt der Adhäsionsfunktion auf extrazellulärer Matrix bei Zugabe von Hämolysin α fest. Sie fanden interessanterweise heraus, dass die Wirkung des Toxins auf adhärennte Thrombozyten eine andere sein könnte als auf zirkulierende Thrombozyten und zeigten veränderte morphologische Eigenschaften der adhärennten Plättchen. Die unveränderte Adhäsion geht nicht einher mit den Erkenntnissen dieser Arbeit. Dies könnte mitunter darin begründet sein, dass Schubert et al. die Thrombozyten und Hämolysin α zeitgleich zum Fibrinogen gaben, wir

jedoch die Thrombozyten vorher mit dem Toxin inkubierten und dieses schon im Voraus mit den Thrombozyten interagieren konnte (Schubert et al. 2011).

Es gibt zahlreiche Staphylokokkus-aureus-Bakterienstämme. Wir verwendeten Hämolyisin α des Stammes NCTC 8325, einen Wildtyp-Stamm. Bayer et al. verwendeten diesen unter anderen auch. Sie konnten unterschiedliche Auswirkungen auf die Entwicklung der Herzklappenvegetationen in der infektiösen Endokarditis bei der Verwendung von Hämolyisin α unterschiedlicher Stämme feststellen. So zeigten sie etwa, dass Hämolyisin α einiger Stämme, wie auch des Stammes NCTC 8325, trotz hoher Konzentrationen im Blut dennoch weniger Infektionskraft aufwiesen, da durch die Lyse der Plättchen teilweise bakterizide Proteine entstanden, die in vivo wiederum Staphylokokkus aureus bekämpften. Leider ist in dieser Hinsicht unser Modell begrenzt und es bleibt die Frage offen, ob sich Hämolyisin α anderer Stämme, wie zum Beispiel eines Methicillin-resistenten Stammes, bezüglich der Wirkung auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen anders verhalten hätte (Bayer et al. 1997; Enright et al. 2002).

Es konnte in dieser Arbeit bei Thrombozyten nach Inkubation mit Lipoteichonsäure über Stunden eine verringerte Adhäsion auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix festgestellt werden. Sheu et al. untersuchten die Plättchenaggregation und konnten eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der Aggregation in Zusammenhang mit Lipoteichonsäure feststellen. Die Adhäsion wurde nicht separat untersucht. Sie verwendeten jedoch eine vergleichbare Konzentration der Säure wie wir (zwischen 0,1 – 1 $\mu\text{g/ml}$). Betrachtet man Konzentrationen der Lipoteichonsäure in vivo, findet man Konzentrationen bis zu 10 $\mu\text{g/ml}$ der Säure. Das zeigt, dass wir uns in einem realistischen Bereich bewegten. Sheu et al. fanden heraus, dass die Anwesenheit von Lipoteichonsäure einen Anstieg von cAMP intrazellulär, jedoch nicht von cGMP bewirkt. Ein Anstieg von cAMP führt zu einer verringerten intrazellulären Calciumkonzentration und geringerer Proteinkinase-C-Aktivität, was letztlich zu einer gesteigerten Blutungsneigung führt (Sheu et al. 2000; Travers et al. 2010). Dieser Vorgang könnte über den PAF-Rezeptor (Plättchen-aktivierender-Faktor-Rezeptor) stattfinden. Lemjabbar et al. zeigten in Epithelzellen der Lunge, dass dieser G-Protein—gekoppelt ist (Lemjabbar & Basbaum 2002). Es wäre denkbar, dass in Thrombozyten ähnliche Vorgänge ablaufen. Ob diese Erkenntnisse mit unserer gezeigten Adhäsionsreaktion vereinbar sind und eventuell ähnliche Vorgänge stattfinden, bleibt unklar. Eine gehemmte

Aktivierung von Thrombozyten durch Lipoteichonsäure konnte auch in anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden. Waller et al. zeigten eine Aggregationsreduktion und führten dies wiederum auf den PAF-Rezeptor auf Thrombozyten zurück. Auch sie zeigten einen cAMP-Anstieg. Sie zeigten darüber hinaus, dass für eine vollständige Inhibition der Aggregation D-Alanin notwendig ist (Waller et al. 2013). Auch Rajagopal et al. zeigten eine für die vollständige Entfaltung der Toxizität notwendige Modifikation der Lipoteichonsäure durch D-Alanin. Sie schlugen eine Unterbindung der Reaktionskaskade als möglichen Therapieansatz vor (Rajagopal & Walker 2015). Auch Wu et al. zeigten eine dosisabhängige Aggregationreduktion stimulierter Plättchen durch Lipoteichonsäure und schlussfolgerten daraus, dass Lipoteichonsäure zur Immunevasion von *Staphaphylokokkus aureus* beiträgt (Wu et al. 2011). Alles in allem sind unsere Erkenntnisse zum Einfluss von Lipoteichonsäure auf die Plättchenadhäsion bisher recht neu. Untermauern lassen sich doch die Ergebnisse damit, dass viele Versuchsgruppen zumindest eine verringerte Aggregationsreaktion zeigen konnten und die Vorgänge letztlich doch eng zusammenhängen könnten. Die denkbare Möglichkeit, dass die Pathogenitätsfaktoren direkt an Bestandteile der extrazellulären Matrix binden und so die Bindungsstelle für die Thrombozyten blockieren könnten, wurde ausgeschlossen. Diesen Ansatz verfolgten Liesenborghs et al., die eine Studie zur Adhäsion von *Staphylokokkus aureus* auf Herzklappen durchführten. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass *Staphylokokkus aureus* bei Epithelschäden auf Herzklappen ohne vorherige Inflammation direkt und unabhängig von Thrombozyten über Adhäsine an Fibrin oder von-Willebrand-Faktor (vWF) binden kann (Liesenborghs et al. 2019). Es ist aufgrund der Erkenntnisse anzunehmen, dass dieser Prozess unabhängig von den untersuchten Pathogenitätsfaktoren stattfindet.

In der Vergangenheit konnte ein Zusammenhang zwischen Plättchen und dem Komplementsystem in der Reaktion auf bakterielle Infektionen hergestellt werden (Verschoor et al. 2011). Nahid et al. führten eine Untersuchung zur Bindung von Ficolin- α an Lipopolysaccharide von Bakterien durch. Dabei war auch Lipoteichonsäure von *Staph. aureus*. Sie fanden heraus, dass Lipoteichonsäure unter anderem auch mit Ficolin- α reagiert (Nahid & Sugii 2006). Dieses ist involviert bei immunologischen Vorgängen des angeborenen Immunsystems. Das bedeutet, dass es zur Aktivierung des Komplementsystems über den Lektinweg beiträgt (Endo, Matsushita & Fujita 2007). Zusammengefasst könnte Lipoteichonsäure nach diesen Erkenntnissen zur Komplementaktivierung beitragen. Wir wollten wissen, ob Lipoteichonsäure möglicherweise auch mit dem Komplementfaktor C3

oder den Rezeptoren von C5a bzw. C3a interagiert. Der gravierende Unterschied zu unserer Untersuchung im Vergleich zu Nahid et al. bestand darin, dass im in-vitro-Versuchsmodell Mediatorstoffe, wie etwa Ficolin- α , nicht vorhanden waren. Wir waren in unserem Versuchsaufbau darauf fokussiert zu untersuchen, ob die Inhibition der ausgewählten Komplementrezeptoren oder -faktoren zu einer veränderten Thrombozytenadhäsion führte.

Es besteht die Annahme, dass Plättchen Vorläufer für den Komplementfaktor C3 enthalten, die in α -Granula gespeichert sind. Die Freisetzung könnte den klassischen Komplementweg in Gang setzen (Maynard et al. 2007). C3 kann die Adhäsions- und Aggregationsreaktion verändern (Rawish et al. 2021). Sauter et al. zeigten, dass das Inhibieren des Komplementfaktors C3a eine Veränderung der Blutungszeit bewirkte (Sauter et al. 2018). Das passt auch zu Erkenntnissen von Gushiken et al., die einen Zusammenhang zwischen Mangel von C3 und einer resultierend verringerten Thrombozytenaktivierung zeigten (Gushiken et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen der C3-Serum-Spiegel nach Injektion von Lipoteichonsäure anstieg (Jung et al. 2021). Wir wollten sehen, ob die Verhinderung einer potenziellen Wirkung von C3 in unserem Versuchsaufbau eine Änderung im Adhäsionsverhalten der Thrombozyten bewirkt. Es wäre denkbar, dass Lipoteichonsäure oder Hämolyisin α in Konkurrenz mit dem Komplementfaktor C3 stehen könnte und ebenfalls über dessen Bindungsstellen am Thrombozyten binden könnte. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass der primäre Effekt von Lipoteichonsäure oder Hämolyisin α auf die Thrombozytenadhäsion über die opsonisierende Wirkung von C3 vermittelt wird. Aus diesem Grund untersuchten wir unseren Versuch bei Zugabe des C3-Antagonisten Compstatin. Im Versuchsaufbau mit Lipoteichonsäure und Hämolyisin α zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Compstatin. Somit ist, zumindest in diesem Versuchsaufbau, nicht von relevanten Effekten durch Compstatin auszugehen.

Es gibt Hinweise in der Literatur, dass Bakterien oder deren Bestandteile Komplementrezeptoren nutzen, um an Wirtszellen zu binden (Lukácsi et al. 2020). Nording et al. konnten die Expression des C5a-Rezeptors (genauer: C5a-Rezeptor 1) auf Thrombozyten feststellen. Sie zeigten, dass kein Zusammenhang zwischen klassischen Plättchenfunktionen, wie beispielsweise der Adhäsion, und der Bindung von C5a besteht (Nording et al. 2021). Sauter et al. konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass der Komplementrezeptor C3aR, der auch auf Thrombozyten zu finden ist, eine Rolle in der Thrombenbildung und beim Anstieg der

Plättchenadhäsion spielt (Sauter et al. 2018). Wir wollten herausfinden, ob das gezielte Ausschalten von Komplementrezeptoren eine Veränderung der Thrombozytenadhäsion auf Bestandteilen der extrazellulären Matrix in Gegenwart von Lipoteichonsäure oder Hämolysin α bewirkt. In der Literatur ist bereits eine unterschiedliche Empfänglichkeit des Organismus für Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* je nach Expression des Komplementrezeptors C5a1/2 beschrieben. Jedoch wurde hierbei nicht konkret auf Thrombozyten eingegangen (Horst et al. 2015). Wir vertieften diese Ansätze durch Erweiterung der Experimente mit Komplement-Rezeptor-Inhibitoren. Die Zugabe der C3a- und C5a-Rezeptor-Inhibitoren (SB290157 bzw. PMX53) bewirkte keinen signifikanten Adhäsionsunterschied im Vergleich zur Gruppe ohne Inhibitor. Im Mausversuch mit Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Mäusen ergaben sich teilweise ähnliche Ergebnisse. Beim Vergleich der Thrombozyten der Wildtyp- und C5aR1^{-/-}-Tiere fiel auf, dass die Adhäsionsreaktion vor und nach Zugabe von Hämolysin α ähnlich ausgeprägt war und durch die Zugabe von Hämolysin α weder bei Wildtyp- noch bei Knockout-Mäusen signifikant verringert wurde. Allerdings adhärten die Thrombozyten der Wildtyp-Tiere signifikant weniger als die der C5aR1^{-/-}-Tiere. Nach Zugabe von Lipoteichonsäure fiel auf, dass die Adhäsionsreaktion in beiden Gruppen ähnlich ausgeprägt war. Durch die Zugabe von Lipoteichonsäure konnte die Adhäsionsreaktion bei Wildtyp- und bei Knockout-Mäusen signifikant verringert werden. Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Dies stützt nicht die denkbare These, dass der C5a1-Rezeptor eine Bindungsstelle für Lipoteichonsäure sein könnte. Daraus lässt sich ableiten, dass der Rezeptor C5aR eher nicht an der veränderten Thrombozytenadhäsion nach Zugabe von Hämolysin α und Lipoteichonsäure beteiligt ist. Dennoch ist dies sicherlich ein interessanter Ansatz für weitere Forschung. Die C3a- und C5a-Rezeptoren könnten zwar an der Entzündungsreaktion beteiligt sein, haben aber keinen direkten Einfluss auf die Thrombozytenadhäsion unter den gegebenen Bedingungen. Andererseits wäre es möglich, dass die Blockade der C3a- und C5a-Rezeptoren zu kompensatorischen Mechanismen führen, die die Effekte von LTA und Hämolysin α maskieren. Die Inhibitoren könnten neben ihren primären Zielmolekülen auch andere zelluläre Prozesse beeinflussen.

Aus den Ergebnissen und Schlussfolgerungen dieser Arbeit ergeben sich weitere Fragen und einige Kritikpunkte. Die Arbeit kann nicht erklären, weshalb Bakterien-Thrombozyten-Aggregate an Herzklappen binden und Vegetationen bilden (McNicol & Israels 2010; Jung et al. 2015). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Lipoteichonsäure und Hämolysin α eher nicht für

diesen Prozess verantwortlich sind. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist aber davon auszugehen, dass die untersuchten Pathogenitätsfaktoren dennoch die Eigenschaften der Thrombozyten beeinflussen. Kritisch anzumerken ist darüber hinaus, dass die vorliegenden Versuche alle *in vitro* durchgeführt wurden. Die Versuchsbedingungen entsprechen selbstverständlich nicht einem lebendigen Organismus, in dem der Blutfluss eine entscheidende Rolle spielt. Besonders Herzklappen sind hohen Scherkräften und turbulenten Strömungen ausgesetzt. Unter Scherkräften interagieren einige Pathogenitätsfaktoren, wie etwa SpA (Staphylokokkus-aureus-Protein A), stärker mit Thrombozyten durch Veränderung der Rezeptorspezifität (Fitzgerald et al. 2006). Es ist möglich, dass Hämolyisin α oder Lipoteichonsäure einen anderen oder verstärkten Effekt unter Scherkräften zeigen würde. Auch mögliche Wechselwirkungen mit anderen Körperzellen wurden aufgrund des Versuchsaufbaus ausgeschlossen. Darüber hinaus wäre es sicherlich wichtig und interessant, die Rezeptoren, an die die Pathogenitätsfaktoren binden, genauer zu untersuchen, um weitere Aussagen treffen zu können. Auch die Verwendung der isolierten Pathogenitätsfaktoren wirft die Frage auf, ob kommerziell aufbereitete LTA oder Hämolyisin α die gleichen Funktionen wie deren natürliche Form haben (Waller et al. 2013).

Von klinischer Relevanz sind die erzielten Daten, weil sie fundamentale Hinweise darauf geben, dass Pathogenitätsfaktoren die Eigenschaften von Thrombozyten beeinflussen. Infektionen mit Staphylokokkus aureus sind häufig. Die Kenntnis über relevante Mechanismen bei einer bakteriellen Besiedelung kann die Medikamentenforschung vorantreiben. Leeten et al. verglichen beispielsweise den Einsatz von Aspirin oder Ticagrelor in der infektiösen Endokarditis mit Staphylokokkus aureus und kamen zu dem Schluss, dass eine Kombination mit antibiotischen Wirkstoffen in Zukunft durchaus denkbar wäre (Leeten et al. 2021). Surewaard et al. entwickelten die Idee einer Antikörper-vermittelten Neutralisierung von Hämolyisin α (Surewaard et al. 2018).

Bisher stellen Impfstoffe gegen Staphylokokkus aureus die Wissenschaft vor Herausforderungen und sind bisher nur in klinischen Studien erprobt und nicht zugelassen. Es gibt beispielsweise Ansätze, eine Vakzin-assoziierte B-Zell-Produktion im Körper anzuregen, woraufhin solche spezialisierten B-Zellen Antikörper gegen Pathogenitätsfaktoren, wie etwa Hämolyisin α , bilden (Clegg et al. 2021). Auch aus diesem Grund kann die Untersuchung von Pathogenitätsfaktoren sicherlich einen relevanten Beitrag zur Arzneimittelentwicklung beitragen. Unabhängig von bakteriellen Infektionen ist die Thrombozytenadhäsion sicherlich

ein relevanter Faktor bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen. Die Auseinandersetzung mit diversen dabei beteiligten Rezeptoren bietet großes Potential für neue Therapiemethoden neben den bekannteren Angriffspunkten bei der Thrombozytenaggregation. Denn beispielsweise GP-IIb-IIIa-Inhibitoren, wie Abciximab, sind bereits auf dem Markt und vielversprechende Therapiemethoden (Xu et al. 2016).

6. Zusammenfassung

Bakterielle Infektionen mit *Staphylokokkus aureus* kommen sehr häufig vor. Die infektiöse Endokarditis als Komplikation einer solchen Infektion ist auch in hoch entwickelten Ländern eine schwer behandelbare Erkrankung. Trotz zahlreicher Therapiemöglichkeiten birgt sie eine hohe Mortalität. Zudem treten zunehmend Antibiotikaresistenzen auf.

Bisher wurde gezeigt, dass *Staphylokokkus aureus* mit Thrombozyten interagiert und deren Eigenschaften verändern kann. Die genauen Mechanismen, über welche Pathogenitätsfaktoren und Rezeptoren die Interaktion zwischen Bakterium und Thrombozyt geschieht, sind jedoch unvollständig charakterisiert. Wir konzentrierten uns auf das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten unter Zugabe von zwei relevanten Pathogenitätsfaktoren mit der Fragestellung, ob die Adhäsionsreaktion verstärkt oder vermindert wird. Mittels einer Adhäsionsassay konnten wir zeigen, dass die beiden Pathogenitätsfaktoren Hämolysin α oder Lipoteichonsäure das Adhäsionsverhalten von Thrombozyten verändern. Die Inkubation isolierter Thrombozyten mit dem jeweiligen Pathogenitätsfaktor führte zu einer signifikant verminderten Adhäsionsreaktion der Thrombozyten auf Komponenten der extrazellulären Matrix im Vergleich zu Thrombozyten ohne vorherige Inkubation. Der Versuchsaufbau wurde unter verschiedenen Bedingungen wiederholt und die Ergebnisse bestätigt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Komplementrezeptoren C3aR bzw. C5aR an den Wechselwirkungen mit den Pathogenitätsfaktoren beteiligt sind. Wir konnten zeigen, dass weder Lipoteichonsäure noch Hämolysin α über diese Rezeptoren das Adhäsionsverhalten der Thrombozyten verändern können.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass beide Pathogenitätsfaktoren die Thrombozytenadhäsion verringern, was sicherlich Auswirkungen auf den gesamten Organismus hat. Bei der Entstehung einer bakteriellen Endokarditis scheinen Lipoteichonsäure und Hämolysin α jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sie eher die Thrombenadhäsion an Herzklappen eher vermindern würden.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abhilasha, K.V., Sumanth, M.S., Thyagarajan, A., Sahu, R.P., Kemparaju, K. & Marathe, G.K., 2021, 'Reversible cross-tolerance to platelet-activating factor signaling by bacterial toxins', *Platelets*, 32, 960–967.
- 2 Ahn, K.B., Baik, J.E., Yun, C.-H. & Han, S.H., 2018, 'Lipoteichoic Acid Inhibits Staphylococcus aureus Biofilm Formation', *Frontiers in microbiology*, 9, 1-13.
- 3 Aslam, R., Speck, E.R., Kim, M., Crow, A.R., Bang, K.W.A., Nestel, F.P., Ni, H., Lazarus, A.H., Freedman, J. & Semple, J.W., 2006, 'Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo', 107, 637-641.
- 4 Bayer, A.S., Ramos, M.D., Menzies, B.E., Yeaman, M.R., Shen, A.J. & Cheung, A.L., 1997, 'Hyperproduction of alpha-toxin by Staphylococcus aureus results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal proteins', *Infection and Immunity*, 65, 4652–4660.
- 5 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 IIb/IIIa fibrinogen-binding domains', *Infection and Immunity*, 63, 3634–3641.
- 6 Becker, R.C., DiBello, P.M. & Lucas, F.V., 1987, 'Bacterial tissue tropism: an in vitro model for infective endocarditis', *Cardiovascular Research*, 21, 813–820.
- 7 Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C. & Wischmeyer, E., 2021, *Duale Reihe Physiologie*, 4. Auflage, S. 164ff, S. 181ff, Thieme, Stuttgart.
- 8 Bellavite, P., Andrioli, G., Guzzo, P., Arigliano, P., Chirumbolo, S., Manzato, F. & Santonastaso, C., 1994, 'A Colorimetric Method for the Measurement of Platelet Adhesion in Microtiter Plates', *Analytical Biochemistry*, 216, 444–450.
- 9 Berube, B. & Wardenburg, J., 2013, 'Staphylococcus aureus α -Toxin: Nearly a Century of Intrigue', *Toxins*, 5, 1140–1166.
- 10 Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klapettek, K., Mueller-Eckhardt, C. & Roka, L., 1988, 'Staphylococcal α toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets', *Journal of Experimental Medicine*, 168, 527–542.
- 11 Bhakdi, S. & Tranum-Jensen, J., 1991, 'Alpha-toxin of Staphylococcus aureus', *Microbiological Reviews*, 55, 733–751.
- 12 Bratosin, D., Mitrofan, L., Palii, C., Estaquier, J. & Montreuil, J., 2005, 'Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging', *Cytometry Part A*, 66, 78–84.
- 13 Brown, D.R. & Pattee, P.A., 1980, 'Identification of a chromosomal determinant of alpha-toxin production in Staphylococcus aureus', *Infection and Immunity*, 30, 36–42.

- 14 Brown, S., Santa Maria Jr., J.P. & Walker, S., 2013, 'Wall Teichoic Acids of Gram-Positive Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 67, 313–336.
- 15 Cheung, A.L., Eberhardt, K.J., Chung, E., Yeaman, M.R., Sullam, P.M., Ramos, M. & Bayer, A.S., 1994, 'Diminished virulence of a sar-/agr- mutant of *Staphylococcus aureus* in the rabbit model of endocarditis.', *The Journal of Clinical Investigation*, 94, 1815–1822.
- 16 Chugh, T.D., Burns, G.J., Shuhaiber, H.J. & Bahr, G.M., 1990, 'Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid', *Infection and Immunity*, 58, 315–319.
- 17 Clegg, J., Soldaini, E., McLoughlin, R., Rittenhouse, S., Bagnoli, F. & Phogat, S., 2021, 'Staphylococcus aureus Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies', *Frontiers in Immunology*, 12, 1-19.
- 18 Cox, D., Kerrigan, S.W. & Watson, S.P., 2011, 'Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 9, 1097–1107.
- 19 Daga, S., Shepherd, J.G., Callaghan, J.G.S., Hung, R.K.Y., Dawson, D.K., Padfield, G.J., Hey, S.Y., Cartwright, R.A., Newby, D.E. & Fitzgerald, J.R., 2011, 'Platelet receptor polymorphisms do not influence *Staphylococcus aureus*–platelet interactions or infective endocarditis', *Microbes and Infection*, 13, 216–225.
- 20 Divyakolu, S., Chikkala, R., Ratnakar, K.S. & Sritharan, V., 2019, 'Hemolysins of *Staphylococcus aureus*—An Update on Their Biology, Role in Pathogenesis and as Targets for Anti-Virulence Therapy', *Advances in Infectious Diseases*, 09, 80–104.
- 21 Durack, D.T., 1975, 'Experimental bacterial endocarditis. IV. Structure and evolution of very early lesions', *The Journal of pathology*, 115, 81–89.
- 22 Endo, Y., Matsushita, M. & Fujita, T., 2007, 'Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis', *Immunobiology*, 212, 371–379.
- 23 Enright, M.C., Robinson, D.A., Randle, G., Feil, E.J., Grundmann, H. & Spratt, B.G., 2002, 'The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 7687–7692.
- 24 Fedtke, I., Mader, D., Kohler, T., Moll, H., Nicholson, G., Biswas, R., Henseler, K., Götz, F., Zähringer, U. & Peschel, A., 2007, 'A *Staphylococcus aureus* ypfP mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity', *Molecular Microbiology*, 65, 1078–1091.
- 25 Fiedel, B.A. & Jackson, R.W., 1978, 'Activation of the alternative complement pathway by a streptococcal lipoteichoic acid', *Infection and Immunity*, 22, 286–287.
- 26 Fitzgerald, J.R., Foster, T.J. & Cox, D., 2006, 'The interaction of bacterial pathogens with platelets', *Nature Reviews Microbiology*, 4, 445–457.
- 27 Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D. & Wagner, D.D., 2000, 'P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (Psgl-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet–Endothelial Interactions in Vivo', *Journal of Experimental Medicine*,

191, 1413–1422.

- 28 Galluzzi, L., Aaronson, S.A., Abrams, J., Alnemri, E.S., Andrews, D.W., Baehrecke, E.H., Bazan, N.G., Blagosklonny, M.V., Blomgren, K., Borner, C., Bredesen, D.E., Brenner, C., Castedo, M., Cidlowski, J.A., Ciechanover, A., Cohen, G.M., De Laurenzi, V., De Maria, R., Deshmukh, M., Dynlacht, B.D., El-Deiry, W.S., Flavell, R.A., Fulda, S., Garrido, C., Golstein, P., Gougeon, M.-L., Green, D.R., Gronemeyer, H., Hajnóczky, G., Hardwick, J.M., Hengartner, M.O., Ichijo, H., Jäättelä, M., Kepp, O., Kimchi, A., Klionsky, D.J., Knight, R.A., Kornbluth, S., Kumar, S., Levine, B., Lipton, S.A., Lugli, E., Madeo, F., Malorni, W., Marine, J.-C., Martin, S.J., Medema, J.P., Mehlen, P., Melino, G., Moll, U.M., Morselli, E., Nagata, S., Nicholson, D.W., Nicotera, P., Nuñez, G., Oren, M., Penninger, J., Pervaiz, S., Peter, M.E., Piacentini, M., Prehn, J.H.M., Puthalakath, H., Rabinovich, G.A., Rizzuto, R., Rodrigues, C.M.P., Rubinsztein, D.C., Rudel, T., Scorrano, L., Simon, H.-U., Steller, H., Tschopp, J., Tsujimoto, Y., Vandenabeele, P., Vitale, I., Vousden, K.H., Youle, R.J., Yuan, J., Zhivotovsky, B. & Kroemer, G., 2009, 'Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes', *Cell Death & Differentiation*, 16, 1093–1107.
- 29 Gillissen, M.A., Yasuda, E., Jong, G. de, Levie, S.E., Go, D., Spits, H., Helden, P.M. van & Hazenberg, M.D., 2016, 'The modified FACS calcein AM retention assay: A high throughput flow cytometer based method to measure cytotoxicity', *Journal of Immunological Methods*, 434, 16–23.
- 30 Gross, M., Cramton, S.E., Götz, F. & Peschel, A., 2001, 'Key Role of Teichoic Acid Net Charge in *Staphylococcus aureus* Colonization of Artificial Surfaces', *Infection and Immunity*, 69, 3423–3426.
- 31 Gushiken, F.C., Han, H., Li, J., Rumbaut, R.E. & Afshar-Kharghan, V., 2009, 'Abnormal platelet function in C3-deficient mice', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 865–870.
- 32 Herold, G., Riemer, J., Janssen, S.M., Rütger, N., Baumgart, U., Sander, M.L., Koch, A.K.P., Herrmann, B.G., Lange, R.W.R., Holstege, C.H.S. & und Mitarbeiter, 2021, *Innere Medizin*, 9. Auflage, S. 158ff, De Gruyter, Köln.
- 33 Herzberg, M.C., 1996, 'Platelet-Streptococcal Interactions in Endocarditis', *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 7, 222–236.
- 34 Hildebrand, A., Pohl, M. & Bhakdi, S., 1991, 'Staphylococcus aureus alpha-toxin. Dual mechanism of binding to target cells.', *Journal of Biological Chemistry*, 266, 17195–17200.
- 35 Hof, H., Schlüter, D., Bruder, D., Cornely, O.A., Geginat, G., Reischl, U., Schnitzler, P. & Wendt, C., 2004, *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*, 3. Auflage, S. 110ff, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 36 Horst, S., Itzek, A., Klos, A., Beineke, A. & Medina, E., 2015, 'Differential Contributions of the Complement Anaphylotoxin Receptors C5aR1 and C5aR2 to the Early Innate Immune Response against *Staphylococcus aureus* Infection', *Pathogens*, 4, 722–738.
- 37 Horstkotte, D., Follath, F., Gutschik, E., Lengyel, M., Oto, A., Pavie, A., Soler-Soler, J., Thiene, G., Graevenitz, A. von, Priori, S.G., Alonso Garcia, M.A., Blanc, J.-J., Budaj, A., Cowie, M., Dean, V., Deckers, J., Fernández Burgos, E., Lekakis, J., Lindahl, B., Mazzotta, G., Morais, J., Oto, A., Smiseth, O.A., Lekakis, J., Vahanian, A., Delahaye, F., Parkhomenko, A., Filipatos, G., Aldershvile, J., Vardas, P. & Task Force Members, E.C. for P.G. (CPG), Document Reviewers,

- 2004, 'Guidelines on Prevention, Diagnosis and Treatment of Infective Endocarditis Executive Summary: The Task Force on Infective Endocarditis of the European Society of Cardiology', *European Heart Journal*, 25, 267–276.
- 38 Hourton, D., Delerive, P., Stankova, J., Staels, B., Chapman, M.J. & Ninio, E., 2001, 'Oxidized low-density lipoprotein and peroxisome-proliferator-activated receptor α down-regulate platelet-activating-factor receptor expression in human macrophages', 354, 225-232.
- 39 Hoven, G. von, Qin, Q., Neukirch, C., Husmann, M. & Hellmann, N., 2019, 'Staphylococcus aureus α -toxin: small pore, large consequences', *Biological Chemistry*, 400, 1261–1276.
- 40 <http://www.sigmaaldrich.com/>(Zugriff:19.06.2024)
- 41 <https://www.bmglabtech.com/de/microplate-reader/>(Zugriff: 17.06.2024)
- 42 Jahn, K., Handtke, S., Palankar, R., Kohler, T.P., Wesche, J., Wolff, M., Bayer, J., Wolz, C., Greinacher, A. & Hammerschmidt, S., 2022, ' α -hemolysin of Staphylococcus aureus impairs thrombus formation', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 20, 1464–1475.
- 43 Jung, B.J., Kim, H., Jang, K.O., Kim, S. & Chung, D.K., 2021, 'Lipoteichoic Acid from Staphylococcus aureus Activates the Complement System via C3 Induction and CD55 Inhibition', *Microorganisms*, 9, 1-14.
- 44 Jung, C.-J., Yeh, C.-Y., Hsu, R.-B., Lee, C.-M., Shun, C.-T. & Chia, J.-S., 2015, 'Endocarditis Pathogen Promotes Vegetation Formation by Inducing Intravascular Neutrophil Extracellular Traps Through Activated Platelets', *Circulation*, 131, 571–581.
- 45 Jurk, K., Clemetson, K.J., Groot, P.G. de, 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', *The FASEB Journal*, 17, 1–18.
- 46 Kerrigan, S.W., Clarke, N., Loughman, A., Meade, G., Foster, T.J. & Cox, D., 2008, 'Molecular Basis for Staphylococcus aureus–Mediated Platelet Aggregate Formation Under Arterial Shear In Vitro', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28, 335–340.
- 47 Kim, H., Jung, B.J., Jeong, J., Chun, H. & Chung, D.K., 2014, 'Lipoteichoic Acid from Lactobacillus plantarum Inhibits the Expression of Platelet-Activating Factor Receptor Induced by Staphylococcus aureus Lipoteichoic Acid or Escherichia coli Lipopolysaccharide in Human Monocyte-Like Cells', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1051–1058.
- 48 Klinger, M.H.F. & Jelkmann, W., 2002, 'Review: Role of Blood Platelets in Infection and Inflammation', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22, 913–922.
- 49 Knapp, S., Von Aulock, S., Leendertse, M., Haslinger, I., Draing, C., Golenbock, D.T. & Van Der Poll, T., 2008, 'Lipoteichoic Acid-Induced Lung Inflammation Depends on TLR2 and the Concerted Action of TLR4 and the Platelet-Activating Factor Receptor', *The Journal of Immunology*, 180, 3478–3484.
- 50 Kraemer, B.F., Campbell, R.A., Schwertz, H., Franks, Z.G., Vieira De Abreu, A., Grundler, K., Kile, B.T., Dhakal, B.K., Rondina, M.T., Kahr, W.H.A., Mulvey, M.A., Blaylock, R.C., Zimmerman, G.A. & Weyrich, A.S., 2012, 'Bacteria differentially induce degradation of Bcl-xL, a survival protein,

by human platelets', *Blood*, 120, 5014–5020.

- 51 Lahav, J., Schwartz, M.A. & Hynes, R.O., 1982, 'Analysis of platelet adhesion with a radioactive chemical crosslinking reagent: Interaction of thrombospondin with fibronectin and collagen', *Cell*, 31, 253–262.
- 52 Lambertz, H., Lethen, H., Bartel, T., Eggebrecht, H., Erbel, R., Flachskampf, F.A., Franke, A., Graf, J., Greim, C.-A., Hoffmann, R., Janssens, U., Kuntz-Hehner, S., Mühler, E.G., Nienaber, C.A., Petzsch, M., Plicht, B., Seiler, C., Tries, H.-P., Vogt, M.O. & Wallmann, D., 2007, *Transösophageale Echokardiographie*, 2. Auflage, S-91ff, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 53 Leeten, K., Jacques, N., Lancellotti, P. & Oury, C., 2021, 'Aspirin or Ticagrelor in Staphylococcus aureus Infective Endocarditis: Where Do We Stand?', *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1-7.
- 54 Lemjabbar, H. & Basbaum, C., 2002, 'Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to Staphylococcus aureus in epithelial cells', *Nature Medicine*, 8, 41–46.
- 55 Li, C., Ni, H. & Li, J., 2020, 'Crosstalk Between Platelets and Microbial Pathogens', *Frontiers in Immunology*, 11, 1-14.
- 56 Liang, X. & Ji, Y., 2007, 'Involvement of alpha5beta1-integrin and TNF-alpha in Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced death of epithelial cells', *Cellular Microbiology*, 9, 1809–1821.
- 57 Liesenborghs, L., Meyers, S., Lox, M., Criel, M., Claes, J., Peetermans, M., Trensou, S., Velde, G.V., Berghe, P.V., Baatsen, P., Missiakas, D., Schneewind, O., Peetermans, W.E., Hoylaerts, M.F., Vanassche, T. & Verhamme, P., 2019, 'Staphylococcus aureus endocarditis: distinct mechanisms of bacterial adhesion to damaged and inflamed heart valves', 40, 3248–3259.
- 58 Loos, M., Clas, F. & Fischer, W., 1986, 'Interaction of purified lipoteichoic acid with the classical complement pathway', *Infection and Immunity*, 53, 595–599.
- 59 Lukácsi, S., Mácsik-Valent, B., Nagy-Baló, Z., Kovács, K.G., Kliment, K., Bajtay, Z. & Erdei, A., 2020, 'Utilization of complement receptors in immune cell–microbe interaction', *FEBS Letters*, 594, 2695–2713.
- 60 Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E., 2019, *Taschenlehrbuch Histologie*, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 61 Maguire, G.P., Arthur, A.D., Boustead, P.J., Dwyer, B. & Currie, B.J., 1996, 'Emerging epidemic of community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in the Northern Territory', 164, 721–723.
- 62 Maynard, D.M., Heijnen, H.F.G., Horne, M.K., White, J.G. & Gahl, W.A., 2007, 'Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5, 1945–1955.
- 63 McNicol, A. & Israels, S.J., 2010, 'Mechanisms of oral bacteria-induced platelet activation', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88, 510–524.
- 64 Moroi, M. & Jung, S.M., 1998, 'Integrin-mediated platelet adhesion', *Frontiers in Bioscience*, 3, 719–728.

- 65 Moroi, M. & Jung, S.M., 2004, 'Platelet glycoprotein VI: its structure and function', *Thrombosis Research*, 114, 221–233.
- 66 Moroi, M., Okuma, M. & Jung, S.M., 1992, 'Platelet adhesion to collagen-coated wells: Analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1137, 1–9.
- 67 Mueller, K.A.L., Patzelt, J., Sauter, M., Maier, P., Gekeler, S., Klingel, K., Kandolf, R., Seizer, P., Gawaz, M., Geisler, T. & Langer, H.F., 2018, 'Myocardial expression of the anaphylatoxin receptor C3aR is associated with cardiac inflammation and prognosis in patients with non-ischaemic heart failure: Anaphylatoxin receptors in non-ischaemic heart failure', *ESC Heart Failure*, 5, 846–857.
- 68 Nahid, A.M. & Sugii, S., 2006, 'Binding of porcine ficolin- α to lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria and lipoteichoic acids from Gram-positive bacteria', *Developmental & Comparative Immunology*, 30, 335–343.
- 69 National Institutes of Health, 2015, *Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*.
- 70 Neri, S., Mariani, E., Meneghetti, A., Cattini, L. & Facchini, A., 2001, 'Calcein-Acetyoxymethyl Cytotoxicity Assay: Standardization of a Method Allowing Additional Analyses on Recovered Effector Cells and Supernatants', *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, 8, 1131–1135.
- 71 Ni, H. & Freedman, J., 2003, 'Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands', *Transfusion and Apheresis Science*, 28, 257–264.
- 72 Nording, H., Baron, L., Haberthür, D., Emschermann, F., Mezger, M., Sauter, M., Sauter, R., Patzelt, J., Knoepp, K., Nording, A., Meusel, M., Meyer-Saraei, R., Hlushchuk, R., Sedding, D., Borst, O., Eitel, I., Karsten, C.M., Feil, R., Pichler, B., Erdmann, J., Verschoor, A., Chavakis, E., Chavakis, T., Von Hundelshausen, P., Köhl, J., Gawaz, M. & Langer, H.F., 2021, 'The C5a/C5a receptor 1 axis controls tissue neovascularization through CXCL4 release from platelets', *Nature Communications*, 12, 3352.
- 73 Nørgaard, M., Jensen, A.Ø., Engebjerg, M.C., Farkas, D.K., Thomsen, R.W., Cha, S., Zhao, S. & Sørensen, H.T., 2011, 'Long-term clinical outcomes of patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study', *Blood*, 117, 3514–3520.
- 74 Onogawa, T., 2002, 'Staphylococcal alpha-toxin synergistically enhances inflammation caused by bacterial components', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 33, 15–21.
- 75 Petersen, H.J., Keane, C., Jenkinson, H.F., Vickerman, M.M., Jesionowski, A., Waterhouse, J.C., Cox, D. & Kerrigan, S.W., 2010, 'Human Platelets Recognize a Novel Surface Protein, PadA, on *Streptococcus gordonii* through a Unique Interaction Involving Fibrinogen Receptor GPIIb/IIIa', *Infection and Immunity*, 78, 413–422.
- 76 Powers, M.E., Becker, R.E.N., Sailer, A., Turner, J.R. & Bubeck-Wardenburg, J., 2015, 'Synergistic Action of *Staphylococcus aureus* α -Toxin on Platelets and Myeloid Lineage Cells Contributes to Lethal Sepsis', *Cell Host and Microbe*, 17, 775–787.
- 77 Powers, M.E., Kim, H.K., Wang, Y. & Bubeck-Wardenburg, J., 2012, 'ADAM10 Mediates Vascular Injury Induced by *Staphylococcus aureus* α -Hemolysin', *The Journal of Infectious Diseases*, 206,

352–356.

- 78 Prévost, G., Mourey, L., Colin, D., Monteil, H., Serra, M.D. & Menestrina, G., 2006, 'Alpha-helix and beta-barrel pore-forming toxins (leucocidins, alpha-, gamma-, and delta-cytolysins) of *Staphylococcus aureus*', *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, S. 590–607, Elsevier, München.
- 79 Que, Y.-A. & Moreillon, P., 2011, 'Infective endocarditis', *Nature Reviews. Cardiology*, 8, 322–336.
- 80 Rajagopal, M. & Walker, S., 2015, 'Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria', *Protein and Sugar Export and Assembly in Gram-positive Bacteria*, *Current Topics in Microbiology and Immunology.*, 404, S. 1–44, Springer International Publishing, Heidelberg.
- 81 Rawish, E., Sauter, M., Sauter, R., Nording, H. & Langer, H.F., 2021, 'Complement, inflammation and thrombosis', *British Journal of Pharmacology*, 178, 2892–2904.
- 82 Resmi, K.R., Varghese, N. & Krishnan, L.K., 2004, 'Procedure for quantification of platelet adhesion to biomaterials by radioscintigraphy', *Thrombosis Research*, 114, 121–128.
- 83 Romo, G.M., Dong, J.-F., Schade, A.J., Gardiner, E.E., Kansas, G.S., Li, C.Q., McIntire, L.V., Berndt, M.C. & López, J.A., 1999, 'The Glycoprotein Ib-IX-V Complex Is a Platelet Counterreceptor for P-Selectin', *Journal of Experimental Medicine*, 190, 803–814.
- 84 Sauter, M., 2019, 'Die Rolle dendritischer Zellen in der experimentellen Atherosklerose', *Dissertation der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät Tübingen*, 25-26.
- 85 Sauter, R.J., Sauter, M., Obrich, M., Emschermann, F.N., Nording, H., Patzelt, J., Wendel, H.P., Reil, J.C., Edlich, F. & Langer, H.F., 2019, 'Anaphylatoxin Receptor C3aR Contributes to Platelet Function, Thrombus Formation and in Vivo Haemostasis', *Thrombosis and Haemostasis*, 119, 179–182.
- 86 Sauter, R.J., Sauter, M., Reis, E.S., Emschermann, F.N., Nording, H., Ebenhöch, S., Kraft, P., Münzer, P., Mauler, M., Rheinlaender, J., Madlung, J., Edlich, F., Schäffer, T.E., Meuth, S.G., Duerschmied, D., Geisler, T., Borst, O., Gawaz, M., Kleinschnitz, C., Lambris, J.D. & Langer, H.F., 2018, 'Functional Relevance of the Anaphylatoxin Receptor C3aR for Platelet Function and Arterial Thrombus Formation Marks an Intersection Point Between Innate Immunity and Thrombosis', *Circulation*, 138, 1720–1735.
- 87 Schubert, S., Schwertz, H., Weyrich, A.S., Franks, Z.G., Lindemann, S., Otto, M., Behr, H., Loppnow, H., Schlitt, A., Russ, M., Presek, P., Werdan, K. & Buerke, M., 2011, 'Staphylococcus aureus α -Toxin Triggers the Synthesis of B-Cell Lymphoma 3 by Human Platelets', *Toxins*, 3, 120–133.
- 88 Seo, H.S., Kim, J.H. & Nahm, M.H., 2006, 'Platelet-Activating Factor-Acetylhydrolase Can Monodeacylate and Inactivate Lipoteichoic Acid', *Clinical and Vaccine Immunology*, 13, 452–458.
- 89 Sheu, J.-R., Hsiao, G., Lee, C.-R., Chang, W.-C., Lee, L.-W., Su, C.-H. & Lin, C.-H., 2000, 'Antiplatelet Activity of *Staphylococcus aureus* Lipoteichoic Acid Is Mediated Through a Cyclic AMP Pathway', *Thrombosis Research*, 99, 249–258.

- 90 Siegel, I. & Cohen, S., 1964, 'Action of Staphylococcal Toxin on Human Platelets', *The Journal of Infectious Diseases*, 114, 488–502.
- 91 Sivaraman, B. & Latour, R.A., 2010, 'The relationship between platelet adhesion on surfaces and the structure versus the amount of adsorbed fibrinogen', *Biomaterials*, 31, 832–839.
- 92 Steckelberg, J.M., Murphy, J.G., Ballard, D., Bailey, K., Tajik, A.J., Taliercio, C.P., Giuliani, E.R. & Wilson, W.R., 1991, 'Emboli in Infective Endocarditis: The Prognostic Value of Echocardiography', *Annals of Internal Medicine*, 114, 635–640.
- 93 Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Zeng, Z., Tkaczyk, C., Cohen, T.S., Bardoel, B.W., Jorch, S.K., Deppermann, C., Bubeck Wardenburg, J., Davis, R.P., Jenne, C.N., Stover, K.C., Sellman, B.R. & Kuberski, P., 2018, 'α-Toxin Induces Platelet Aggregation and Liver Injury during *Staphylococcus aureus* Sepsis', *Cell Host & Microbe*, 24, 271–284.
- 94 Suttorp, N., Buerke, M. & Tannert-Otto, S., 1992, 'Stimulation of PAF-synthesis in pulmonary artery endothelial cells by staphylococcus aureus alpha-toxin', *Thrombosis Research*, 67, 243–252.
- 95 Takahashi, H. & Moroi, M., 2001, 'Antibody against platelet membrane glycoprotein VI in a patient with systemic lupus erythematosus', *American Journal of Hematology*, 67, 262–267.
- 96 Thiene, G. & Basso, C., 2006, 'Pathology and pathogenesis of infective endocarditis in native heart valves', *Cardiovascular Pathology*, 15, 256–263.
- 97 Tran, U., Boyle, T., Shupp, J.W., Hammamieh, R. & Jett, M., 2006, 'Staphylococcal Enterotoxin B Initiates Protein Kinase C Translocation and Eicosanoid Metabolism While Inhibiting Thrombin-Induced Aggregation in Human Platelets', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 288, 171–178.
- 98 Travers, J.B., Kozman, A., Mousdicas, N., Saha, C., Landis, M., Al-Hassani, M., Yao, W., Yao, Y., Hyatt, A.-M., Sheehan, M.P., Haggstrom, A.N. & Kaplan, M.H., 2010, 'Infected atopic dermatitis lesions contain pharmacologic amounts of lipoteichoic acid', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 146–152.
- 99 Valet, G., 2003, 'Past and present concepts in flow cytometry: A European perspective', *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 17, 213–222.
- 100 Verschoor, A., Neuenhahn, M., Navarini, A.A., Graef, P., Plaumann, A., Seidlmeier, A., Nieswandt, B., Massberg, S., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. & Busch, D.H., 2011, 'A platelet-mediated system for shuttling blood-borne bacteria to CD8α⁺ dendritic cells depends on glycoprotein GPIb and complement C3', *Nature Immunology*, 12, 1194–1201.
- 101 Waller, A.K., Sage, T., Kumar, C., Carr, T., Gibbins, J.M. & Clarke, S.R., 2013, 'Staphylococcus aureus lipoteichoic acid inhibits platelet activation and thrombus formation via the paf receptor', *Journal of Infectious Diseases*, 208, 2046–2057.
- 102 Wang, Y., Gallant, R.C. & Ni, H., 2016, 'Extracellular matrix proteins in the regulation of thrombus formation', *Current Opinion in Hematology*, 23, 280.
- 103 Wilke, G.A. & Wardenburg, J.B., 2010, 'Role of a disintegrin and metalloprotease 10 in *Staphylococcus aureus* α-hemolysin-mediated cellular injury', *Proceedings of the National*

Academy of Sciences, 107, 13473–13478.

- 104 Wu, B.-Q., Zhi, M.-J., Liu, H., Huang, J., Zhou, Y.-Q. & Zhang, T.-T., 2011, 'Inhibitory effects of lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* on platelet function and platelet–monocyte aggregation', *Inflammation Research*, 60, 775–782.
- 105 Wuescher, L.M., Takashima, A. & Worth, R.G., 2015, 'A novel conditional platelet depletion mouse model reveals the importance of platelets in protection against *Staphylococcus aureus* bacteremia', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13, 303–313.
- 106 Xia, G., Kohler, T. & Peschel, A., 2010, 'The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*', *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 148–154.
- 107 Xu, X.R., Carrim, N., Neves, M.A.D., McKeown, T., Stratton, T.W., Coelho, R.M.P., Lei, X., Chen, P., Xu, J., Dai, X., Li, B.X. & Ni, H., 2016, 'Platelets and platelet adhesion molecules: novel mechanisms of thrombosis and anti-thrombotic therapies', *Thrombosis Journal*, 14, 37-46.
- 108 Yang, H., Rehem, A., Chen, P., Zhu, G., Hynes, R.O., Freedman, J., Wagner, D.D. & Ni, H., 2006, 'Fibrinogen and von Willebrand factor-independent platelet aggregation in vitro and in vivo', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4, 2230–2237.
- 109 Yeaman, M.R., 2019, '29 - The Role of Platelets in Antimicrobial Host Defense', *Platelets* (Fourth Edition), S. 523–546, Elsevier, München.
- 110 Zhang, Q., Mousdicas, N., Yi, Q., Al-Hassani, M., Billings, S.D., Perkins, S.M., Howard, K.M., Ishii, S., Shimizu, T. & Travers, J.B., 2005, 'Staphylococcal lipoteichoic acid inhibits delayed-type hypersensitivity reactions via the platelet-activating factor receptor', *Journal of Clinical Investigation*, 115, 2855–2861.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHICHTAUFBAU DES HERZENS.....	7
ABBILDUNG 2: ENTSTEHUNG EINER HERZKLAPPENVEGETATION	7
ABBILDUNG 3: INTERAKTION EINES THROMBOZYTEN MIT LIPOTEICHOONSÄURE UND HÄMOLYSIN α	17
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR ÜBERPRÜFUNG DER ZELLTOXIZITÄT VON HÄMOLYSIN A	33
ABBILDUNG 5: UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT VON HÄMOLYSIN A AUF THROMBOZYTEN	33
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF DAS ADHÄSIONSVERHALTEN VON THROMBOZYTEN	34
ABBILDUNG 7: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF FIBRINOGEN	35
ABBILDUNG 8: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF FIBRINOGEN	36
ABBILDUNG 9: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH VORHERIGER INKUBATION VON FIBRINOGEN VON HÄMOLYSIN A	36
ABBILDUNG 10: VERGLEICH DER ADHÄSION VON THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF FIBRONECTIN	37
ABBILDUNG 11: VERGLEICH DER ADHÄSION VON THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A AUF KOLLAGEN.....	38
ABBILDUNG 12: UNTERSUCHUNG DER TOXIZITÄT VON LIPOTEICHOONSÄURE AUF THROMBOZYTEN .	39
ABBILDUNG 13: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION HUMANER THROMBOZYTEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHOONSÄURE AUF FIBRINOGEN	40
ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH VORHERIGER INKUBATION VON FIBRINOGEN MIT LIPOTEICHOONSÄURE	41
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHOONSÄURE AUF FIBRONECTIN	42
ABBILDUNG 16: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHOONSÄURE AUF KOLLAGEN	42
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT KOMPLEMENTREZEPTORINHIBITOREN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A.....	44
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT KOMPLEMENTREZEPTORINHIBITOREN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHOONSÄURE	45

ABBILDUNG 19: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT COMPSTATIN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A	46
ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION IM ZUSAMMENHANG MIT COMPSTATIN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE.....	47
ABBILDUNG 21: SCHEMATISCHER VERSUCHSAUFBAU ZUR WIRKUNG VON HÄMOLYSIN A AUF DAS ADHÄSIONSVERHALTEN VON WILD TYP- UND C5AR1 ^{-/-} -THROMBOZYTEN.....	49
ABBILDUNG 22: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION MURINER WILD TYP- UND C5AR1 ^{-/-} -THROMBOZYTEN AUF FIBRINOGEN NACH INKUBATION MIT HÄMOLYSIN A	49
ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER THROMBOZYTENADHÄSION MURINER WILD TYP- UND C5AR1 ^{-/-} -THROMBOZYTEN AUF FIBRINOGEN NACH INKUBATION MIT LIPOTEICHONSÄURE	50

8.2 Materialien

8.2.1 Geräte

Gerät:

Apotom Mikroskop Observer.Z1 (Software AxioVision V4.8.2.0)

Brutschrank CO₂ Inkubator MCO-18 AIC

Durchflusszytometer CytoFLEX Flow Cytometer

ELISA Lesegerät Microplate Reader 550

Eppendorf-Reaktionsgefäß-Ständer

Falconständer

Feinwaage ED 6202S

Inkubationsschüttler Innova 40/40 R

Lichtmikroskop Axiovert 200

Magnetrührer IKAMAG RCT basic

Netzgerät Elektrophoresis Power Supply PS304

Objektträger

pH-Meter

Pipetten Eppendorf research (Automatik Pipetten)

Pipettierhilfe Accu Jet Pro

Rundschüttler IKA KS 260 basic

Schlauchpumpe Rotarus standard 50

Sterilbank HERAsafe

Stoppuhr TR118

Thermomixer comfort

Transferringpipette

Vakuumpumpe Vacusafe comfort

Vortex Schüttler

Wasseraufbereitungssystem TKA-GenPure

Wasserbad Typ 1003

Zellzählautomat KX-21N

Zentrifuge Centrifuge 5415C

Zentrifuge Centrifuge 5427R

Zentrifuge Centrifuge 5810R

Zentrifuge Hettich EBA 3 S

Hersteller:

Carl Zeiss, Jena

SANYO, Gunma-Ken, Japan

Beckman Coulter, USA

Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Brand, Wertheim

Brand, Wertheim

Sartorius, Göttingen

New Brunswick Scientific, USA

Carl Zeiss, Jena

IKA Werke, Staufen

Life technologies, Carlsbad, USA

Langenbrink, Emmendingen

Hanna Instruments, Kehl a.R.

Eppendorf, Hamburg

Brand, Wertheim

IKA Werke, Staufen

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Hereaus, Hanau

Oregon Scientific, Neu-Isenburg

Eppendorf, Hamburg

Becton Dickinson, Heidelberg

INTEGRA Biosciences, Zizers, Schweiz

IKA Werke, Staufen

TKA, Niederelbert

GFL, Burgwedel

Sysmex KX-21N, Görlitz

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Hettich Rotina 380

Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Multifuge® 3S

Hereaus, Hanau

8.2.2 Verbrauchsmaterialien

Material

Einmalspritze (1ml, 5ml, 10ml, 20 ml)

Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 ml, 1,5 ml, 5ml)

FACS-Rundbodenröhrchen

Falcon®-Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)

Filter-Einheit 0,22 µm Millex GS

Glasdeckplättchen 25 mm

Glasküvette 500 µl

Glaspasteurpipetten

Multiflex 200 µl Ecoflex Tips

Perfusorspritzen 50 ml

Glas-Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)

Pipettenspitzen

Rührfischchen

Transferpipetten (3 ml)

96-Well Platte costar®

Hersteller

Braun, Melsungen

Eppendorf, Hamburg

Becton Dickinson, Heidelberg

Becton Dickinson, Heidelberg

Millipore, Bedford, USA

Glaswaren Hecht, Sondheim

ChronoLog, Leiden, Niederlande

Brand, Wertheim

Roth, Karlsruhe

Braun, Melsungen

Costar, Bodenheim

Eppendorf, Hamburg

ChronoLog, Leiden, Niederlande

Becton Dickinson, Heidelberg

Corning Incorporated, Corning, USA

8.2.3 Lösungen, Medien, Reagenzien, Proteine

Material	Bezugsquelle
ADP	ChronoLog, Leiden, Niederlande
Calcein AM [®]	Sigma-Aldrich, München
Calciumchlorid (CaCl ₂)-Dihydrat	Sigma, St.Louis, USA
Citratpuffer	Thermo Fisher, Fremont, USA
Compstatin	Sigma-Aldrich, München
D (+)-Glukose, wasserfrei	Sigma, St.Louis, USA
DMSO	AppliChem, Darmstadt
Fibrinogen, Fraction I (aus humanem Plasma)	Sigma, St.Louis, USA
Fibronectin (aus humanem Plasma)	Sigma-Aldrich, München
Ketamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
Kollagen, human Typ I	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lipoteichonsäure (Staphylococcus aureus)	Sigma-Aldrich, München
Methanol	VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N´-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma, St.Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfat, SDS)	Sigma, St.Louis, USA
Natriumhydroxid (NaOH)	E. Merck, Stockholm, Schweden
Paraformaldehyd 2% (PFA)	Merck, Darmstadt
PBS-Lösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PMX-53	Sigma-Aldrich, München
p-Nitrophenylphosphat	Sigma-Aldrich, München
SB290157	Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg
vWF (Von Willebrand Faktor)	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Xylazin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, München
α-Hämolyisin (Staphylococcus aureus)	Sigma-Aldrich, München

8.2.4 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
ACD-Puffer	12,5 g Natriumcitrat 6,82 g Zitronensäure 10 g Glukose Aqua dest. ad 500 ml und mit NaOH auf pH 4,69 einstellen
Citratpuffer	41ml tri-Natriumcitrat-dihydrat 0,1M (2,94g in 100ml dH ₂ O) 9ml Citronensäure 0,1M (1,92g in 100ml dH ₂ O) 450ml dH ₂ O
PBS-T Puffer (0,1% Tween)	1000 ml Aqua dest. 2 Stück PBS Tabletten (PBS Tablets) 1 ml Tween 20
Tyrodes-Gebrauchslösung	20 ml Tyrodes-Puffer (10x) 0,2 g BSA 0,2 g Glukose Aqua dest. ad 200 ml mit HEPES auf pH 7,4 einstellen, 50 ml abnehmen, den Rest mit HCl auf pH 6,5
Tyrodes-Puffer (10x)	80 g Natriumchlorid 10,15 g Natriumhydrogencarbonat 1,95 g Kaliumchlorid Aqua dest. ad 1000 ml

8.2.5 Versuchstiere

Stammbezeichnung	Bezugsquelle	Beschreibung
C57BL/6	Janvier Labs (Frankreich), weitere Züchtung in GTH (Gemeinsame Tierhaltung) (Universität zu Lübeck)	Wildtyp
C.129S4(B6)- <i>C5ar1^{tm1Cge}/J</i> (abgekürzt: C5aR1 ^{-/-})	Dr. C. Gerard Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA, USA), weitere Züchtung in GTH (Gemeinsame Tierhaltung) (Universität zu Lübeck)	Name: complement component 5a receptor 1; targeted mutation 1, Craig Gerard Synonyme: C5aR-, C5aRKO Stamm #:006845 RRID:IMSR_JAX:006845 homozygot für vorliegende Target-Mutation (targeted mutation 1, Craig Gerard) Gen: C5ar1 Locus: Chr7:15980668-15993465 bp, - strand Genetische Position: Chr7, 8.77 cM Genotyp: C5ar1 ^{tm1Cge} /C5ar1 ^{tm1Cge} Phänotyp: erhöhte Level freier Fettsäuren im Blut, abnormale C- Wellen im Elektroretinogramm

8.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	Acid Citrate Dextrose; Citronensäurehydrat-Natriumzitat-Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C 1-9	Komplementfaktor 1-9
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
C5aR1^{-/-}	C.129S4(B6)- <i>C5ar1^{tm1Cge}/J</i> (genveränderte Mäuse)
CD	Cluster of differentiation
CR	Complement Receptor
dH2O oder Aqua dest.	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
et al.	Et alii; und andere
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Fragment crystallisable
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
g	Relative Zentrifugalkraft
GP (Ib, IIb/IIA, IV, V, IV, IX)	Glykoprotein
HEM	Hämolysin α / α -Toxin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]- Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
L. m.	Listeria monocytogenes
LTA	Lipoteichonsäure (Lipoteichoic acid)
min	Minute
ml	Milliliter

n	Stückzahl
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neutrophil Extracellular Traps
ns	Nicht signifikant ($p > 0,05$)
p-Wert	Probabilitas = Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	Phosphate-buffered Saline
PF-4	Plättchenfaktor 4
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potenzial des Wasserstoffs
PPP	<i>Platelet Poor Plasma</i> ; plättchenarmes Plasma
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i> ; plättchenreiches Plasma
rpm	Rounds per minute; Umdrehungen pro Minute
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
Tab.	Tabelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
vWF / GPIb-IX-V-Rezeptorkomplex	Von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
*	Signifikant ($p \leq 0,05$)

9 Danksagung

Ich danke dem Institutsdirektor Herrn Professor Ingo Eitel für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes am Institut der medizinischen Klinik II für Kardiologie, Angiologie und Intensivmedizin.

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Harald Langer, der mich während meiner Promotion zu jeder Zeit in vorbildlicher Weise betreut und unterstützt hat. Insbesondere durch seine hohe wissenschaftliche Expertise und Verlässlichkeit im Bereich der Kardioimmunologie und Entzündungsforschung hat Professor Langer maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich habe den respektvollen Austausch auf Augenhöhe sowie die jederzeit offenen Gespräche sehr geschätzt.

Frau Dr. rer. nat. M. S. aus der gleichen Arbeitsgruppe danke ich sehr für ihre permanente liebe Unterstützung. Ich weiß sehr zu schätzen, dass es mir zu jeder Zeit möglich war, meine Fragen zu stellen. Außerdem gilt mein Dank Herrn Dr. med. R. S., ebenfalls Mitglied der Arbeitsgruppe. Durch das umfassende Wissen der beiden im Bereich der Thrombozyten- und Komplementforschung konnten meine Anliegen stets zeitnah geklärt werden.

Ich möchte auch meinem Kobetreuer Herrn Professor Y. L. danken, der stets bereit war, mich bei meinen Anliegen zu unterstützen.

Weiterhin gilt mein herzlicher Dank Herrn J. v. E. und Frau A. C., die mir mit großem Einsatz und höchster Kompetenz als Medizinisch-technische Assistenten zur Seite standen. Ohne die großzügige Unterstützung wäre die Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Außerdem bedanke ich mich beim gesamten Team des Instituts für Kardiogenetik am Campus Lübeck, das zwischenzeitlich Geräte zur Verfügung stellte und mir stets mit großer Freundlichkeit begegnete.

Besonders wichtig ist es für mich, meinen lieben Eltern von ganzem Herzen für die ständige und unermüdliche Unterstützung zu danken. Bei allen Herausforderungen hatte ich immer ein offenes und verständnisvolles Ohr und wusste, dass ich bedingungslos Rückhalt finde. Ohne die beiden wäre mir der Weg bis hier nicht möglich gewesen.

Auch meinen beiden wundervollen Geschwistern L. und M. möchte ich danken, dass sie immer da sind, wenn ich sie brauche.

Abschließend möchte ich meinem liebsten M. danken, der in jeder Lebensphase alle Stimmungen von mir erträgt, mir enormen Rückhalt gibt, mich aufbaut und immer unterstützend zur Seite steht.