

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des
Universitätsklinikums Halle (Saale)

(Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan)

Einfluss bakterieller Toxine auf die Thrombozytenaggregation in vitro

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Maria Bernadette Focke

geboren am 02.11.1981 in Dessau

Betreuer: Prof. Dr. med. M. Buerke

Gutachter/Gutachterin:

1. Prof. Dr. med. M. Buerke
2. Prof. Dr. med. P. Presek
3. Prof. Dr. med. T. Hohlfeld (Düsseldorf)

Halle (Saale), 25.10.2013

Meinen Eltern Stephanie und Wolfgang Focke

Referat

In den Krankheitsbildern der Sepsis und der Endokarditis spielen Bakterien und deren Produkte, die Toxine in der Gerinnungsaktivierung eine zunehmende Rolle. Im Fall der daraus resultierenden Verbrauchskoagulopathie zeigt sich neben Blutungen gleichzeitig eine Bildung von Mikrothromben. In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss bakterieller Toxine wie LPS (*E.coli*), α -Toxin (*Staphylococcus aureus*), Lysostaphin (*Staphylococcus stapholyticus*), Exotoxin A und Lectin 1 (beide von *Pseudomonas aeruginosa*) auf die Thrombozytenaggregation analysiert werden. Hierzu kam die photometrisch verfahrenende Methode nach Born zur quantitativen Bestimmung der Thrombozytenaggregation in Verwendung. Erste Versuchsansätze fanden zur Testung verschiedener bakterieller Toxine isoliert bzw. mit ADP oder Kollagen statt. Anschließend erfolgte die Untersuchung unterschiedlicher Thrombozytenaggregationshemmer an ADP, Kollagen oder α -Toxin stimulierten Blutplättchen. Experimentell lässt sich zeigen, dass sich bakterielle Toxine sowohl wie physiologisch vorkommende Plättchenaktivatoren (z.B. α -Toxin ($EC_{50} = 3,24 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$)) als auch Inhibitoren (z.B. Exotoxin A ($IC_{50} = 39,33 \pm 6,88 \mu\text{g/ml}$), Lectin 1 ($IC_{50} = 1,79 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$) und Lysostaphin ($IC_{50} = 3,68 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$)) verhalten. Letztere Toxine inhibieren die Thrombozytenaggregation, obwohl eine Stimulation dieser mit ADP erfolgte. Auch kann die proaggregatorische Wirkung des α -Toxin durch Medikamente wie Abciximab ($IC_{50} = 0,91 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$), Eptifibatid ($IC_{50} = 0,36 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$), Iloprost ($IC_{50} = 7,86 \cdot 10^{-5} \pm 1,69 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/ml}$) und interessanterweise mit Levosimendan ($IC_{50} = 6,12 \pm 4,12 \mu\text{g/ml}$) konzentrationsabhängig inhibiert werden. LPS zeigte in den Ergebnissen zum einen keine aggregatorische Eigenschaft und zum anderen auch keine inhibierenden Effekte auf die ADP-induzierte Aggregation.

Schlussfolgernd muss, aufgrund der unterschiedlichen Wirkungen bakterieller Toxine auf die Thrombozytenaggregation und auch des den darauf nachgewiesenen Einflusses diverser Medikamente in vitro, über weitere experimentelle medikamentöse Strategien nachgedacht werden. Das Zusammenspiel von Thrombozyten und bakteriellen Toxinen scheint auch zukünftig ein Forschungsfeld zu bieten, dass möglicherweise weitere relevante Ergebnisse für die Behandlung der Sepsis und Endokarditis liefert.

Focke, Bernadette: Einfluss bakterieller Toxine auf die Thrombozytenaggregation in vitro, Halle (Saale), Martin-Luther-Universität Halle-Saale, Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Halle (Saale), 76 Seiten, 2012

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Infektionen	1
1.1.1 Sepsis und Endokarditis	1
1.1.2 Pathophysiologie der Infektionen	2
1.1.3 Rolle der Thrombozyten	3
1.2 Thrombozyten	4
1.2.1 Physiologie der Thrombozyten	4
1.2.2 Physiologische Prozesse in primärer und sekundärer Hämostase	6
1.2.3 Inhibierende Prozesse	9
1.2.4 Inflammatorische Prozesse	9
1.2.5 Thrombozytäre Membranrezeptoren	12
1.3 Aktivierung und Inhibierung der Plättchen-aggregation	13
1.3.1 Allgemeine Substanzen	13
1.3.2 Bakterielle Toxine	15
1.3.3 Antithrombozytäre Substanzen	25
2 Ziel der Untersuchung	28
3 Material	30
3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	30
3.1.1 Allgemeine Laborgeräte und Materialien	30
3.1.2 Spezielle Materialien und Geräte	30
3.2 Chemikalien und Lösungen	31
3.2.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen	31
3.2.2 Spezielle Chemikalien und Lösungen	31
4 Methoden	32
4.1 Versuchsvorbereitungen	32
4.1.1 Probengewinnung	32
4.1.2 Probenverarbeitung	32
4.1.3 Herstellung der Verdünnungsreihen der Substanzen	32
4.1.4 Berechnung der Effektiven und der Inhibitorischen Konzentration bei 50 % (EC_{50} / IC_{50})	35
4.2 Aggregometrie	35
4.2.1 Messprinzip	35
4.2.2 Durchführung	37
4.2.3 Standardisierung der Versuchsmethode	37
4.3 Statistische Methoden und Datenauswertung	38
5 Ergebnisse	39

	Seite
5.1 Aktivierende Effekte auf die Thrombozyten- aggregation	39
5.1.1 Aggregationsuntersuchungen mit ADP und Kollagen	39
5.1.2 Stimulation der Thrombozyten mit Staphylococcus aureus α -Toxin	40
5.2 Weitere Testungen an Thrombozyten mittels der Aggregometrie	41
5.2.1 Aggregationsuntersuchungen mit Lysostaphin, Lektin und Exotoxin A	41
5.2.2 Untersuchungen mit Lipopolysacchariden von E. coli an Thrombozyten	42
5.3 Hemmende Effekte auf die induzierte Thrombozytenaggregation	43
5.3.1 Testung verschiedener Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Plättchenaggregation	43
5.3.2 Inhibierende Auswirkungen von Medikamenten auf die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation	48
5.3.3 Hemmung der induzierten Plättchenaggregation durch Exotoxin A, Lysostaphin und Lektin	51
6 Diskussion	53
6.1 Therapeutische Grundsätze in der Klinik	53
6.2 Bedeutung der Thrombozyten in der Sepsis/ Endokarditis	53
6.3. Antithrombozytäre Substanzen	54
6.4 Testung verschiedener Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Plättchenaggregation	54
6.5 Aggregatorische und inhibitorische Wirkung bakterieller Toxine auf Thrombozyten	56
6.6 Bedeutsamkeit einer antithrombotischen Therapie bei bakteriellen Toxinen	61
6.7 Komplikationen und Nachteile in der klinischen Behandlung	63
7 Zusammenfassung	65
8 Literaturverzeichnis	66
9 Thesen	76

Abkürzungsverzeichnis

α -Toxin	Alpha-Toxin
ACL	Adenylatzyklase
ADP	Adenosine-5`-diphosphat
APACT	Automated Platelet Coagulation Tracer
APC	Aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-3	B-cell Lymphoma 3
Ca ⁺⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
ClfA	Clumping factor A
COX	Cyclooxygenase
CWT	C-terminal cell wall-targeting domain
DAG	Diacylglycerin
DIC	Disseminated intravascular coagulation
EC	Effektive Konzentration
E. coli	Escherichia coli
EDRF	Endothelial derived relaxing factor
eEF-2	eukaryotischer Elongationsfaktor 2
Fc	Crystallizable fragment region
FcR γ	Fc Rezeptor γ -Kette
FnbpA	Fibrinogen binding protein A
GP	Glykoprotein
G- Protein	Guanylnukleotid bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Enzym, das GTP bindet und hydrolysiert
IC	Inhibitorische Konzentration
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL-1 β	Interleukin 1 β
IP ₃	Inosit-1,4,5-triphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif
JAM-3	Junctional adhesion molecule-3
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
Lec A	Lektin 1
Lec B	Lektin 2
LPS	Lipopolysaccharid
LRP	Low-density receptor-related protein
Mac-1	Macrophage- 1 antigen
MD-2	Myeloid differentiation protein-2
mRNA	Messenger RNA
MSCRAMMs	Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
NaCl	Natrium Chlorid
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
PAF	Plättchen- aktivierender Faktor
PA-IL	Lektin 1
PA-IIL	Lektin 2

pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PF 4	Platelet factor 4
PGI ₂	Prostazyklin
PLCγ2	Phospholipase Cy 2
PMP	Platelet microbicidal protein (plättcheneigenes antimikrobielles Protein)
PMN	Polymorphonuclear neutrophils
PPP	Platelet poor plasma
pre-mRNA	Precursor messenger ribonucleic acid
PRP	Platelet rich plasma
PSGL-1	P- Selektin glykoprotein ligand 1
RANTES	Regulated upon activity normal T cell expressed and presumably secreted
RNA	Ribonukleinsäure
sCD	Löslicher (soluble) CD Ligand
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom (Systemisches inflammatorisches Response Syndrom)
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TLR 4	Toll-like Rezeptor 4
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Target of RNAIII activating protein
tRNA	Transfer RNA
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VLA-2	Very late activation antigen 2
vWF	Von-Willebrand-Faktor

1.1 Infektionen

1.1.1 Sepsis und Endokarditis

In aktuellen Statistiken wird die Sepsis als eine häufige Todesursache in der nosokomialen Infektion beschrieben, was die Notwendigkeit weiterer Forschungen mit dem Ziel, gegebenenfalls die Mortalitätsrate zu reduzieren, erklärt (Loew, Riess, 2005; Schouten et al., 2008).

Definiert ist die Sepsis als eine überschießende systemische Abwehrreaktion auf eine zumeist bakterielle Infektion (Matot, Sprung, 2001). Im Fall der Endokarditis liegt dabei der infektiöse Streuherd im Bereich des Endokards, genauer im Bereich des Endokards der Herzklappen, mit lokaler und in einigen Fällen septisch verlaufender Entzündung. Die infektiöse Endokarditis wird meist durch *Staphylococcus aureus* verursacht. (Loughman et al., 2005; Westphal et al., 2009)

Endovaskuläre Infektionen sind aufgrund der komplexen und multifaktoriellen Pathogenese nur schwer zu therapieren. Bakterielle Komponenten einerseits und multiple Komponenten des betroffenen menschlichen Organismus, wie etwa des Endothels, der Thrombozyten, der Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN), der Lymphozyten und Plasmaproteine, andererseits spielen eine Rolle in der Infektion (Bayer et al., 1995; Kobayashi et al., 2003). Eine solche Infektion hat oft gravierende Folgen: Selbst ein äußerlich symptomfreier Mensch kann rasant in eine lebensbedrohliche Situation geraten, z.B. durch die Destruktion von hämodynamisch relevanten Herzklappenstrukturen (bei der Endokarditis) oder im Fall der Sepsis durch das Systemische Inflammatorische Response Syndrom (SIRS) mit Multiorganversagen bis hin zum Schock und Tod (Sinha, Herrmann, 2005; Trappe, Riess, 2005). In der Literatur taucht in diesem Zusammenhang immer wieder der Thrombozyt als zentrale interagierend wirkende Zelle auf (Kerrigan et al., 2008).

1.1.2 Pathophysiologie der Infektionen

Festzuhalten ist: Akut wird das Problem zunächst nicht durch die Infektion selbst; akut wird es durch eine außer Kontrolle geratende Immunreaktion, welche wiederum durch multiple immunstimulierende Toxine der Mikroorganismen ausgelöst wird (Trappe, Riess, 2005). Eine Überproduktion an immunmodulierenden Mediatoren wie Cytokinen, Chemokinen und Komplementfaktoren besteht konsekutiv (Schouten et al., 2008). Neben diversen Reaktionen im Rahmen der Sepsis, seitens der Leukozyten, der Monozyten/Makrophagen und der Endothelzellen, will ich vor allem jene der Thrombozyten beleuchten.

Zu beachten ist allerdings, dass die Inflammation sich erst durch das Zusammenspiel dieser Blutzellen bemerkbar macht. Folgen dieser Interaktion sind – eng verbunden mit Prozessen der disseminierten Aktivierung der Hämostase und der induzierten Inflammation – einerseits die Bildung von Mikrothromben und andererseits die Entwicklung von Hämorrhagien (Sinha, Herrmann, 2005; Trappe, Riess, 2005). Genannt wird dies nach entsprechenden Kriterien gehend in der späten Klinik der Sepsis Verbrauchskoagulopathie oder DIC, was sich durch eine massive generalisierte Freisetzung von diversen Cytokinen mit zur unkontrolliert kommenden Aktivierung der Gerinnung mit Fibrinbildung und Fibrinolyse auszeichnet (Dempfle, 2005). Letztlich kann die Organdysfunktion mit der disseminierten Mikrothrombenbildung und dadurch bedingter Perfusionseinschränkung im Bereich der Mikrozirkulation erklärt werden (Ragaller et al., 2007). Bestandteil eines solchen Mikrothrombus sind neben den Thrombozyten auch Leukozyten (Trappe, Riess, 2005).

Im Fall der Endokarditis ist die Endotheldysfunktion beziehungsweise ein Endothelschaden, wie etwa bei sklerotischen und inflammatorischen Veränderungen des Klappenendothels, von Bedeutung (Hoffmann, Hanrath, 2007). Nach Plättchen- und Fibrinablagerung an dieser Stelle entsteht ein idealer Nährboden für bakterielle Pathogene mit ihrer Adhärenz und schließlich – nach Auslösung der Plättchenaggregation und Bakterienvermehrung – makroskopisch sichtbar gewachsenen Plättchen-Bakterien-Aggregaten (Vegetationen) (Bayer et al., 1997; Kupferwasser et al., 1999; Rivera et al., 2007). Gegebenenfalls können diese Aggregate schließlich auch embolisieren (Gawaz, 2004).

1.1.3 Rolle der Thrombozyten

Blutplättchen besitzen eine diverse Anzahl an in der Zellmembran eingerichteten sowie an induzierbaren Membranrezeptoren, die hoch sensitiv sind und rasch auf ein breites Spektrum von Agonisten, die bei Gefäßverletzungen oder Infektionen auftreten, reagieren (Yeaman, 1997). Es ist wichtig zu wissen, dass auch die direkte und indirekte Interaktion mit Bakterien im Fall einer Sepsis über eine große Menge von Rezeptoren durch Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen mit Aktivierung einer plättcheninduzierten Gerinnungskaskade gesteuert wird (Fitzgerald et al., 2006a).

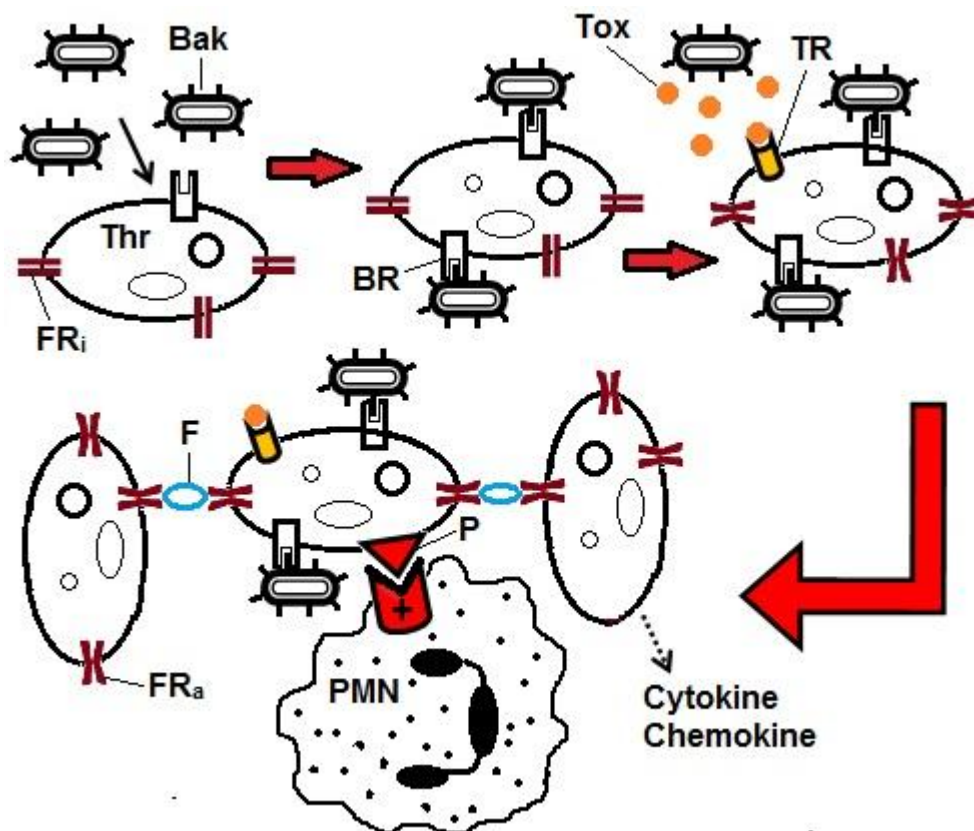


Abbildung 1: Darstellung der Bildung eines Konglomerates aus Bakterien, Thrombozyten und PMN nach Aktivierung der Blutplättchen. Aktivierung der Plättchen über rezeptorvermittelte Bakterien-Thrombozyten-Kontakte oder über von Bakterien abgegebene Toxine mit deren Andockung an entsprechende plättcheneigene Rezeptoren. Anschließend Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors mit Bindung anderer Thrombozyten, Freisetzung von Cytokinen/Chemokinen und Aktivierung anderer Blutzellen wie der PMN. *Bak* Bakterien, *BR* Rezeptor für Bakterienproteine, *FR_a* aktivierter Fibrinogenrezeptor (GPIIb/IIIa-Rezeptor), *FR_i* inaktiver Fibrinogenrezeptor, *PMN* polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt, *TR* Rezeptor für Toxine, *Tox* Toxine, *P* P-Selektin, + Mac-1 (*macophaga-1 antigen*) (In Anlehnung an die Grafik von Fitzgerald et al., 2006a und Kerrigan, Cox, 2009)

Der bakterielle Einfluss kann einerseits die Freisetzung der außerhalb und innerhalb der Zellmembran befindlichen und schon zur Verfügung stehenden Proteine, Faktoren und sonstigen Substanzen des Thrombozyten, einschließlich der Granulainhaltsstoffe,

auslösen. Andererseits gewinnt allerdings die Neusynthese von Proteinen aus thrombozyteneigenem genetischen Material der mRNA nach Kontakt mit bakteriellen Toxinen immer mehr an Bedeutung.

1.2 Thrombozyten

Von Max Schultze um 1865 entdeckt und als „spherules“ referiert, wurden die Thrombozyten 1882 durch den Italienischen Pathologen Giulio Bizzozero als eigenständige Zellen definiert. Bizzozero beobachtete sie mikroskopisch aus abgenommenem Blut und im zirkulierenden Blut lebender Tiere.

Weiterhin beschrieb er die Funktion der von ihm auf italienisch so genannten „piastrine“ unter intravaskulären Bedingungen, und er erkannte den Zusammenhang zwischen Adhäsion, Aggregation sowie subsequenter Fibrin-Bildung und Ablagerung. Dabei beschrieb er erstmals, dass die Blutplättchen sich an beschädigtes Gefäßendothel anlagern, mit Fibrin umgeben und hauptsächlich an der Thrombusbildung beteiligt sind. (Brewer, 2006)

Durch Abschnürung aus dem Zytoplasma eines Megakaryozyten entstanden, können Thrombozyten einen Durchmesser von zwei bis vier μm entwickeln. Sie besitzen im Bereich ihrer Mitochondrien einen begrenzten Rest an mRNA zur Proteinsynthese. Nach einer mittleren Lebensspanne von zehn Tagen werden sie im retikuloendothelialen System der Leber und Milz abgebaut. (Kehrel, 2003)

1.2.1 Physiologie der Thrombozyten

Morphologisch hält sich die Thrombozytenstruktur durch eine aus einer Lipiddoppelschicht bestehenden Membran und einem aus Aktin-/Myosinfilamenten aufgebauten intrazellulären Zytosklett (Kehrel, 2003). Die Membran ist mit einer sogenannten Glykokalyx beschichtet, in der Polysaccharide kovalent an Membranproteine und Membranlipide gebunden sind (Gawaz, 1999). Zu den Membranproteinen zählt eine große Anzahl an integrierten thrombozytären Rezeptoren, die noch genauer betrachtet werden. Wenn der Thrombozyt aktiviert wird, werden die Mikrofilamente aktiv und kontrahieren die Blutzelle mit Umverteilung der Organellen und Pseudopodienbildung (Gawaz, 1999; Kehrel, 2003). Für letzteres kommt durch Fusion mit der Außenmembran der große Vorrat an Membransystemen (offenes kanalikuläres System) zum Einsatz (Gawaz, 1999; Kehrel, 2003).

1. Einleitung

Im Inneren des Thrombozyten befinden sich neben Glykogengranula und den Mitochondrien auch zahlreiche Granula, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Inhaltsstoffe in dichte Granula, α -Granula und Lysosomen unterteilt werden. In den α -Granula sind neben einer Reihe von Gerinnungsfaktoren, Wachstumsfaktoren und Enzymen auch Fibrinogen, P-Selektin, von-Willebrand-Faktor (vWF) sowie ein Vorrat an Glykoprotein IIb-IIIa angesiedelt. Dichte Granula enthalten u.a. wichtige Stoffe für die Aktivierung, wie Kalzium und die Nukleotide ADP und ATP. (Rivera et al., 2009)

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula

dichte Granula (δ-Granula)	α-Granula	λ-Granula (Lysosomen)
• ATP • ADP • Kalzium²⁺ • Serotonin • Phosphat • Guaninnukleotide	<u>Enzym</u> • α 1-Antitrypsin • α 2-Makroglobulin • α 2-Antiplasmin • C1-Esterase-Inhibitor <u>Adhäsive Proteine</u> • Fibrinogen • Fibronectin • von-Willebrand-Faktor • Thrombospondin • Vitronectin • Glykoprotein IIb-IIIa <u>Wachstumsfaktoren</u> • Platelet-derived growth factor • Transforming growth factor β • Epidermal growth factor • Endothelial cell growth factor <u>Zytokinähnliche Proteine</u> • Interleukin 1 (?) • CD40-Ligand • Plättchenfaktor 4 (PF4) • β-Thromboglobulin <u>Koagulationsfaktoren</u> • HMWK • Plasminogen • PAI-1 • Faktor V • Faktor XI • Fibrinogen • Protein S	• α-Arabinoside • β-Galactosidase • β-Glucuronidase • N-Acetyl-glucosaminidase • Elastase • Kollagenase • Kathepsin

? noch unklar, da nicht eindeutig nachgewiesen (modifiziert nach Gawaz, Das Blutplättchen, Thieme 1999, Seite 7)

1. Einleitung

Schließlich ist auch für die Plättchenaktivierung das zweite, bisher nicht genannte Membransystem von Bedeutung, nämlich das dichte tubuläre System. Es gilt als Hauptspeicherort für freie Kalziumionen (Ca^{++}) (Gawaz, 1999). Aktivierte Plättchen setzen aus diversen Organellen nachweislich vesikuläre Membranfragmente mit Proteinen in der Größe von 0,1 bis 1,0 μm ab, die auch Mikropartikel genannt werden und bei der Koagulation und Inflammation eine Rolle spielen (Schouten et al., 2008; Dean et al., 2009).

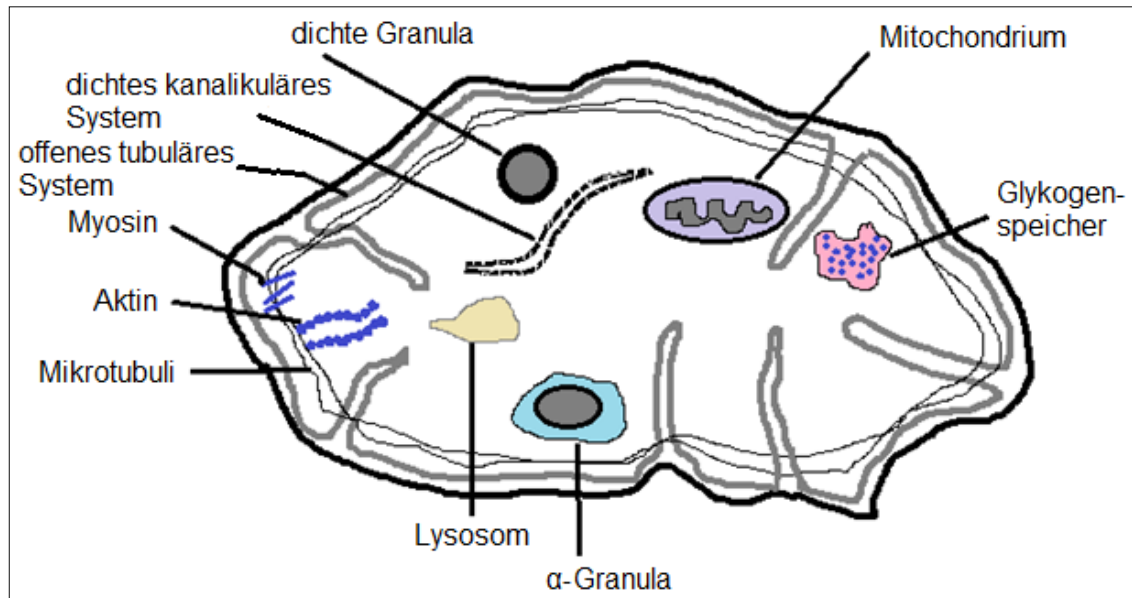


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines ruhenden Thrombozyten (modifiziert nach Gawaz, Das Blutplättchen, Thieme 1999, Seite 5).

1.2.2 Physiologische Prozesse in primärer und sekundärer Hämostase

Hauptaufgabe der Thrombozyten ist die korpuskuläre Blutgerinnung. Sie sind essentieller Bestandteil sowohl in der primären als auch in der sekundären Hämostase. (Gawaz, 1999) Die Hämostase ist ein dynamischer Prozess, in dem Membranrezeptoren der Plättchen, bidirektionale intrazelluläre Signale, Thrombozytenproteine sowie inflammatorische Substanzen eng verbunden sind und voneinander abhängen (Rivera et al., 2009). Aktiviert werden die Thrombozyten durch Interaktion mit diversen Agonisten, wie z.B. durch Komponenten des Subendothels, proinflammatorischen Mediatoren, Komplementfaktoren sowie adhäsiven Proteinen über plättcheneigene Rezeptoren. Im allgemeinen gilt weiterhin, dass fast alle Agonisten beziehungsweise Thrombozytenaktivatoren synergistisch wirken. Auch gibt es einen autokrinen Verstärkungsmechanismus des Thrombozyten im Falle einer Aggregation durch eigene Sezernierung von Agonisten wie ADP, PAF, Serotonin,

1. Einleitung

Thrombin und Thromboxan A₂ (TxA₂) (Gawaz, 2004; Jurk, Kehrel, 2005). In der Signaltransduktion sind dabei diverse intrazelluläre Moleküle, die *second messengers*, wie Ca⁺⁺, TxA₂, Diacylglycerin (DAG), Inosit-1,4,5-triphosphat (IP₃), und die Nukleotide cAMP und cGMP zuständig (Jurk, Kehrel, 2003).

Durch die Adhäsion an subendotheliale Strukturen formen sich die Plättchen in kugelige Gebilde mit stacheligen Pseudopodien um. Der Vorgang wird *shape change* genannt, wobei das Zytoskelett und die Aktinfilamente eine wichtige Funktion inne haben. (Gawaz, 1999)

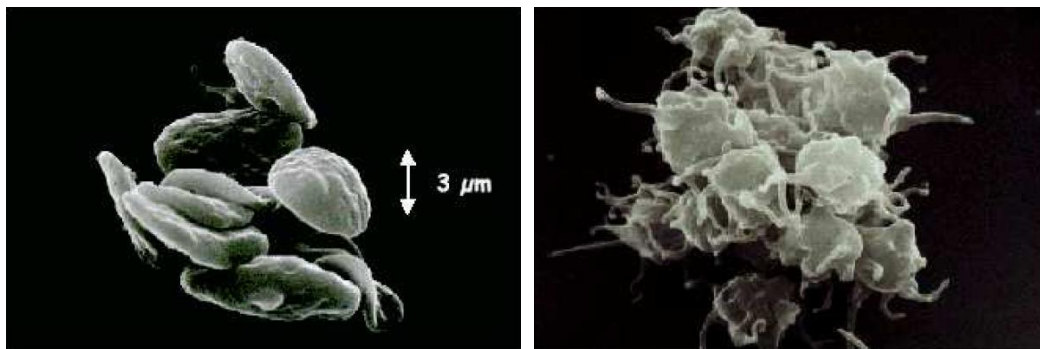


Abbildung 3: Ruhende und aktivierte Blutplättchen (Elektronenmikroskopie von Gawaz, 1999, Seite 4)

Eine schnelle Polymerisation von globulären Aktin oder Aktinfilamentbruchstücken zu Filamenten und schließlich zu einem Netzwerk führen zur aktivierten Form des Plättchens. Dies setzt eine Freisetzung des Aktinfilamentes vom Aktin-bindenden Protein genannt Gelsolin voraus. (Fox, 1993; Thomas et al., 2007)

Verformte und aktivierte Thrombozyten entleeren ihre Granula durch deren innerhalb von Sekunden stattfindende Fusion mit der Oberflächenmembran und deren Freisetzung beziehungsweise Ausschüttung ihrer Inhaltsstoffe in das Blutplasma. Auch verdichten sich durch das Verschmelzen der Membranen die Glykoproteinrezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, insbesondere die der Glykoprotein IIb-/ IIIa-Moleküle. (Jurk, Kehrel, 2005) Gleichermassen setzt das Endothel, nach Aktivierung durch inflammatorische Mediatoren, durch Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen Substanzen wie P-Selektin und vWF frei (Valentijn et al., 2010). Der an subendothelialen Strukturen bindende vWF fängt initial Plättchen unter hohen Scherkräften auf und bindet sie nach einer kurzen Phase des Entlangrollens über den Glykoprotein Ib-V-IX-Komplex und über das P-Selektin an die Endothelzellen an (Gawaz et al., 2005; Ruggeri, Mendolicchio, 2007). Diese Bindung zeigt sich als reversibel und insuffizient für eine Thrombozytenadhäsion (Nieswandt, Watson, 2003). Infolgedessen führt es über weitere Bindungen an thrombozyteneigene Kollagenrezeptoren (GPVI, α₂β₁) und ADP-Rezeptoren (P₂Y₁₂-, P₂Y₁- Rezeptor) zur

1. Einleitung

stabilen Plättchenadhäsion und –aktivierung mit Fortleiten des Aktivierungssignals nach innen (Siljander et al., 2004). U.a. führt dieses Signal zur neuen Biosynthese, beispielsweise von vWF, GP IIb/IIIa-Molekülen und vielen anderen Proteinen aus der bestehenden mRNA (Gawaz et al., 2005). Durch die Aktivierung kommt nun ein weiterer Rezeptor ins Spiel: der GPIIb/IIIa-Rezeptor mit eminenter Bedeutung für die Plättchenaggregation. Die Aggregation zeichnet sich durch eine Kreuzvernetzung des Fibrinogens zwischen zwei Fibrinogenrezeptoren (GP IIb/IIIa-Rezeptoren) aus (Kehrel, 2003; Gawaz, 2004). Eine Agglutination der Rezeptoren ging dem voraus. Durch viele dieser stabilen, hoch affinen Bindungen zwischen Fibrinogen und seinem Glykoproteinrezeptor zwischen den Thrombozyten und ihrer, genau daraus folgenden, Inkooperation in den Thrombus, kommt es letztlich zum Aggregatwachstum (Gawaz, 2004).

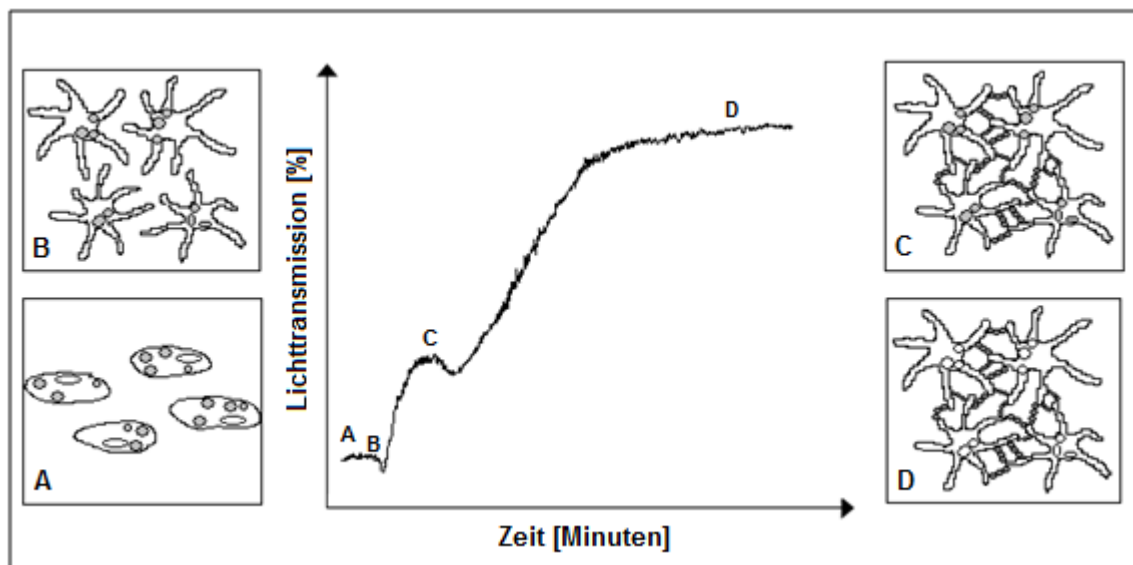


Abbildung 4: Bestimmung der Lichtdurchlässigkeit als ein Maß der Thrombozytenaggregation mit Hilfe des Aggregometers. Formveränderung (*shape change*) der Thrombozyten im Verlauf der Aggregation durch Aktivierung mittels Agonisten (A). (A) Diskoide Form des ruhenden Thrombozyten; (B) Aktivierung mit Pseudopodienbildung; (C) Reversible Phase mit Bildung von Fibrinogenbrücken; (D) Irreversible Aggregation mit Ausschüttung der Granulainhaltsstoffe. (In Anlehnung an die Grafik von Gawaz, 1999, (ff. 45)).

Die Plättchenaktivierung kann schließlich eine sekundäre Hämostase erleichtern. Sie besteht letztlich darin, dass nach Abfolge von proteolytischen Prozessen (extrinsisches und intrinsisches System) durch Thrombinbildung Fibrinogen in vernetztes Fibrin umgewandelt wird und damit dem Aggregat Festigkeit verleiht (Kehrel, 2003). Abschließend führt die vom TxA_2 ausgelöste Vasokonstriktion und die genannte Aggregatbildung zum verlangsamten Blutfluss in der Mikrozirkulation und schließlich zur Ischämie (Gawaz, 2004).

1.2.3 Inhibierende Prozesse

Eine intakte Endothelmembran beugt ungünstig verlaufenden thrombotischen und inflammatorischen Prozessen durch inhibitorische Mechanismen vor, etwa dadurch, dass Substanzen wie Prostazyklin (PGI_2), Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der endotheliale vasodilatierende Faktor (EDRF) bereitgestellt werden (Gawaz et al., 2005). Während PGI_2 mit späterer Erwähnung über die Adenylatzyklase (ACL) und daraus resultierenden cAMP-Spiegelanstiegs fungiert, kommt die inhibitorische Wirkung des Stickstoffmonoxid (NO) über die Guanylatzyklase mit cGMP-Spiegelanstieg zustande (Kehrel, 2003). Weiterhin wurde beobachtet, dass negativ regulatorische Proteinrezeptoren (PECAM-1), die über Phosphorylierung der ITIMs (immunoreceptor tyrosine based inhibition motifs) inhibitorisch wirken, eine überschießende Thrombusbildung limitieren (Jurk, Kehrel, 2005). Antikoagulative Prozesse werden auch durch TFPI (tissue factor pathway inhibitor), Antithrombin (AT) und dem aktivierten Protein C (APC) vermittelt (Levi et al., 2003). Zu diesen genannten körpereigenen Prozessen und Substanzen werden im späteren die pharmakologisch entwickelten Rezeptorenblocker wie zum Beispiel der entwickelte Antagonist für den ADP-Rezeptor oder den GP-IIb/IIIa-Rezeptor erläutert.

1.2.4 Inflammatorische Prozesse

Die Anfangsphase ist durch die Aktivierung der Endothelzellen aus ihrem Ruhezustand in einen prokoagulatorischen Status gekennzeichnet (Schouten et al., 2008; Levi et al., 2003). Dadurch ergibt sich am Endothel nach einer vermehrten Expression von Adhäsionsrezeptoren (P- und E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1) und Ausschüttung von Chemokinen mit folgender Aktivierung von Integrinen, Anlockung von Immunzellen, transendothelialer Migration bzw. Diapedese schließlich eine Exazerbation der inflammatorischen Reaktion (Gawaz et al., 2005; von Hundelshausen, Weber, 2007). Aufgrund der massiven Immunreaktion kommt es zur Schädigung des Gefäßendothels mit Freilegung von subendothelialen Strukturen, was wiederum durch die endotheliale Dysfunktion zur Fortführung der oben genannten Kettenreaktion mit mikrovaskulärer Funktionsbeeinträchtigung führt. Bezüglich der inflammatorischen Eigenschaften des Thrombozyten erfolgen diese durch die Anhaftung des Thrombozyten an das Endothel über seinen GPIIb/IIIa an den vWF, sowie des PSGL-1 (P-Selektin glykoprotein ligand 1) an das endotheliale P-Selektin. (Gawaz et al., 2005) Auch auf Monozyten, Neutrophilen und T-Lymphozyten sitzend, dockt deren PSGL-1 an das endotheliale

1. Einleitung

und thrombozytäre P-Selektin an, sodass eine Verbindung mit dem Blutplättchen geschaffen werden kann (Jurk, Kehrel, 2005; von Hundelshausen, Weber, 2007). Das P-Selektin vermittelt, neben einem Entlangrollen am aktivierten Endothel, die Adhäsion an der Membran mit anschließender Immobilisierung der Leukozyten (von Hundelshausen, Weber, 2007). Eine Leukozytenadhäsion an Plättchen wird nach bisherigen Erkenntnissen auch über JAM-3, ICAM-2 und GP1b α vermittelt (Gawaz, 2004).

Durch den Kontakt werden proinflammatorische Substanzen sogenannte Chemokine freigesetzt, die eine Entzündungsreaktion induzieren (Gawaz, 2004). Die erwähnte Aktivierung des Endothels resultiert initial über GPIIb-IIIa-Vermittlung durch das IL-1 β und den thrombozytären CD40L (CD154) mit seiner Bindung an seinen Rezeptor, der als CD40 an der Endothelmembran vorliegt (Gawaz, 2004; Gawaz et al., 2005; von Hundelshausen, Weber, 2007).

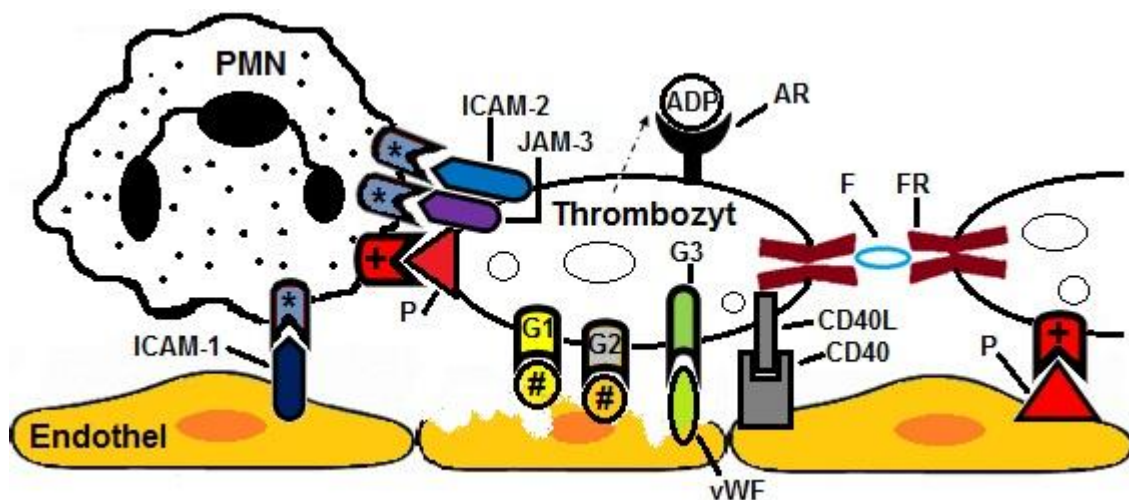


Abbildung 5: Darstellung der Wechselwirkungen von Liganden und Rezeptoren zwischen Thrombozyten, PMN und Endothelzellen. Im Bereich der Endothelläsion bindet subendotheliales Kollagen an GPVI und GPIa/IIa, sowie vWF an GPIb/V/IX. Eine weitere Verbindung entsteht zwischen dem CD40-Rezeptor und seinem am Blutplättchen befindlichen Liganden CD40L. Weiterhin besteht eine Interaktion der aktivierten Thrombozyten über den GPIIb/IIIa-Rezeptor und gebundenen Fibrinogen. PMN-Beziehungen entstehen durch Mac-1 zu ICAM-1 am Endothel, und durch Mac-1 zu ICAM-2 und JAM-3 am Thrombozyten. P-Selektin findet sich auf Thrombozyten und Endothelzellen, und stellt den Kontakt über PSGL-1 zu Thrombozyten und PMN her. Aktivierte Thrombozyten sezernieren ADP, welches an den ADP-Rezeptor andockt und weitere Mechanismen in Gang setzen kann. * Mac-1, + PSGL-1, # Kollagen, F Fibrinogen, FR GP IIb/IIIa-Rezeptor, AR ADP-Rezeptor, P P-Selektin, G1 GPIa/IIa, G2 GPVI, G3 GPIb/V/IX

Wichtige thrombozytäre Chemokine wie PF4 und RANTES (*Regulated upon activity normal T cell expressed and presumably secreted*) wirken neben ihrer chemotaktischen Eigenschaft auch antimikrobiell, weshalb sie auch durch Thrombin induziert plättcheneigene antimikrobielle Proteine (PMPs) genannt werden. PMPs

1. Einleitung

können dabei u.a. auch bakterizid auf *Staphylococcus aureus* wirken. (Yeaman et al., 1994; Bayer et al., 1997)

Ein weiterer wichtiger Ansatz liegt darin, den Thrombozyten in seiner gesamten Funktion zu betrachten. Vorher primär nur als Akteur in der Hämostase mit Verbrauch der v.a. in den Granula vorkommenden Substanzen bekannt gewesen, tritt durch diverse experimentelle Ansätze immer mehr die Bedeutung der *de novo* Proteinsynthese des Blutplättchens zu Tage. Daraus resultiert wiederum der für das Thema der Sepsis und Endokarditis wichtige Aspekt der aktiven Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion. Aktiv deshalb, weil im Thrombozyten selbst eine Translation und damit die Neusynthese von Proteinen stattfindet, welche wiederum weitestgehend unbekannte Signalkaskaden in Gang setzen und damit inflammatorische Prozesse steuern (Lindemann et al., 2001).

Grundvoraussetzung ist das Vorhandensein einer Anzahl von mRNA im Thrombozyten. Diese gelten als Träger der genetischen Information für die Herstellung von Proteinen, obwohl der Thrombozyt anuklär ist (Weyrich et al., 2007). Eine weitere Voraussetzung ist eine ausreichende Aktivierung des Thrombozyten selbst. Weyrich et al. fanden heraus, dass die Thrombozyten durch thrombin-induzierte Aktivierung ein Regulatorprotein, im speziellen das B-cell Lymphoma 3 (Bcl-3), innerhalb von Minuten herstellen können. Bcl-3 scheint bedeutsam für das Zusammenziehen des Thrombus mittels des Fibrins zu sein (Weyrich et al., 2007). Weiterhin greifen Denis et al. (2005) die Erkenntnis von Lindemann et al. (2001) auf, dass auf einer mRNA Interleukin-1 β (IL-1 β) codiert ist, translatiert und schließlich als ein inflammatorisch wirkendes Cytokin produziert wird. Dabei gehen die Untersuchungen dahingehend weiter, dass an der Vorstufe der mRNA des codierten IL-1 β , der pre-mRNA, eine der posttranskriptionellen Modifizierungen stattfindet, nämlich die des *Splicing*. Damit gilt als bestätigt, dass das Blutplättchen neben der pre-mRNA und mRNA auch das nötige Equipment für den Prozess des *Splicing* besitzt. Als weiteres Beispiel, da bedeutsam für die Thrombenbildung, ist das Forschungsergebnis von Schwertz et al. (2006) zu nennen, in dem Thrombozyten eindeutig nachweisbar tissue factor (TF) pre-mRNA enthalten. Die TF pre-mRNA wird wiederum, im Falle einer Thrombozytenaktivierung, durch den Prozess des *Splicing* zur Synthese des TF freigegeben (Schwertz et al., 2006). Der TF ist immens wichtig für die Kettenreaktion der Gerinnung, in der es nach Faktor VII und TF Zusammenlagerung über Aktivierung von Faktor IX und X zur Thrombinbildung kommt. Eine Fibrinbildung aus Fibrinogen für das Fibringewirr eines Thrombus folgt. (Levi et al., 2002; Jurk und Kehrel, 2005) Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse Reaktionen nach Aktivierung durch physiologisch vorkommende Plättchenaktivatoren. Auf dieser Grundlage konnten neuere Erkenntnisse durch bakterielle Stimulation der

Thrombozyten mit Bearbeitung der mRNA und Synthese von Proteinen gewonnen werden. Zu nennen sind dabei einerseits die neuesten Ergebnisse von Schubert et al. (2011), denen zufolge das α -Toxin von *Staphylococcus aureus* Blutplättchen stimuliert und zur Expression der Bcl-3 mRNA bringt, und andererseits die fortgeführten Forschungen mit Nachweis des α -Toxin- sowie Lipopolysaccharide-induzierten Splicens der TF pre-mRNA und seiner Expression (Rondina et al., 2011).

1.2.5 Thrombozytäre Membranrezeptoren

Ihrer charakteristischen Molekülstruktur entsprechend, werden die Membranglykoproteine der Thrombozyten in diverse Gruppen unterteilt: Integrine (z.B. $\alpha\text{IIb}\beta_3$), leuzinreiche Glykoproteine (GPIV, TLR 4), Selektine (P-Selektin), immunglobulinähnliche Rezeptoren (ICAM-2, PECAM-1) und lysosomale integrale Membranproteine (GP53) (Nurden AT, Nurden P, 1993; Kehrel, 2003; Rivera et al., 2009).

Eine weitere Klassifizierung ist die Untergruppierung der Adhäsionsmoleküle, die die Adhärenz von z.B. Thrombozyten an das Endothel vermitteln. Hierzu gehören die Integrine, die Selektine und die Immunglobulinrezeptoren.

Integrine sind heterodimere transmembrane Glykoproteine mit einer α - und einer dazugehörigen β -Untereinheit, die durch eine vorherige Signalkette aus dem Status einer niedrigen Affinität in einen mit hoher Affinität zu ihrem entsprechenden Liganden geführt werden (Nieswandt, Watson, 2003; Schwarz et al., 2006; Lau et al., 2009). Jede der Untereinheiten ist in eine extrazelluläre Domäne, ein transmembranes Segment und einen zytoplasmatischen Teil gegliedert (Yang et al., 2009). Für die Plättchenaggregation ist das Glykoprotein-IIb/ IIIa-Molekül von zentraler Bedeutung. Zusätzlich zu der Präsentation an der Thrombozytenoberfläche im inaktiven Zustand, wird das Protein für den Fall einer Aktivierung zu circa 30% in den α -Granula und im offenen kanalikulären Membransystem gespeichert (Gawaz, 1999; Bennett, 2005). Erst nach Aktivierung des Rezeptors sowie nach Konformationswechsel mit Freiwerden von Bindungsstellen kann das lösliche plasmatische Fibrinogen an der extrazellulären Domäne primär reversibel, dann irreversibel binden (Gawaz, 1999; Schwarz et al., 2006). Auch die Bindung von Fibronectin, CD40L und vWF ist möglich (Ruggeri, Mendolicchio, 2007). Intrazelluläres Signaling über den Rezeptor läuft über den zytoplasmatischen Teil, sodass letztlich von einem bidirektionalem Signaling gesprochen werden kann (Lau et al., 2009; Yang et al., 2009).

Übrigens sind die Selektine auch Glykoproteine, wozu auch das plättchenspezifische P-Selektin gehört (von Hundelshausen, Weber, 2007). Der oben genannte CD 40 Rezeptor zählt zur Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und bindet das Transmembranprotein CD40L (von Hundelshausen, Weber, 2007).

1.3 Aktivierung und Inhibierung der Plättchenaggregation

1.3.1 Allgemeine Substanzen

— ADP

Adenosin-di-phosphat (ADP) wird 1962 in Folge des Nachweises, dass es in vitro im Plasma die Plättchen zur Aggregation führt, mit den Thrombozyten in Zusammenhang gebracht (Born, 1962). Es wird in den Thrombozyten produziert und in ihren dichten Granula gespeichert sowie bei einer Exposition mit Thrombin, Kollagen oder Thromboxan A_2 freigesetzt. Vor allem verstärkt es die Wirkungen diverser Agonisten und führt als parakriner Mechanismus zur Plättchenrekrutierung (Cattaneo, Gachet, 2001; Gawaz, 2004). Das Blutplättchen besitzt drei Subtypen an Rezeptoren für Adenin-Nukleotide, namentlich P_2Y_1 , P_2Y_{12} und P_2X_1 , die u.a. die Thrombozytenaggregation verursachen (Gachet et al., 2006; Murugppan, Kunapuli, 2006). P_2X_1 interagiert mit ATP und bildet einen Ionenkanal für den schnellen Einfluss von Kalzium in das Zytosol, was einen *shape change* verursacht und somit bei der Thrombozytenaktivierung behilflich ist (Murugppan, Kunapuli, 2006). Die Adenosine-5'-diphosphate-selektiven Rezeptoren P_2Y_1 und P_2Y_{12} sind an G-Protein gekoppelt. P_2Y_1 steht in Verbindung mit einem Gq- Protein und führt zur intrazellulären Kalzium-Freisetzung, zum *shape change* und zur Plättchenaggregation mit vorheriger Glykoprotein-IIb-IIIa-Rezeptor-Aktivierung. (Jurk, Kehrel, 2005; Murugppan, Kunapuli, 2006) Der zweite ADP-Rezeptor entfaltet seine Wirkung über ein inhibitorisch gekoppeltes G-Protein. Das Wirkspektrum ähnelt dem des vorher beschriebenen Rezeptors. Ergänzend allerdings vermittelt P_2Y_{12} eine gesteigerte Freisetzungsreaktion der dichten Granula, Inhibierung der Adenylatzyklase, Aktivierung der GP-IIb/IIIa-Rezeptoren via Phosphoinositol-3-Kinase und anderen G-Proteinen und ist wichtig für die Bildung und Stabilisierung eines Thrombus oder Aggregates. (Fontana et al., 2003; Gachet et al., 2006) Dieser Rezeptor ist durch irreversible Inaktivierung mittels kovalenter Bindung molekularisches Ziel der ADP-selektiven antiaggregatorischen

Medikamente wie Ticlopidine, Clopidogrel und Prasugrel (Cattaneo, Gachet, 2001; Boeynaems et al., 2005).

— Kollagen

Kollagen ist als in Tripelhelixstruktur aufgebautes extrazelluläres Matrixprotein an subendothelialen Oberflächen von verletztem Gefäßendothel und in pathologischen Inflammationsprozessen exponiert. Dabei induziert es eine Plättchenaktivierung und -adhäsion durch entsprechende Bindung an thrombozytäre Kollagenrezeptoren. (Clemetson KJ, Clemetson JM, 2001)

Es konnte herausgefunden werden, dass nur eine schmale Fraktion der Plättchen tatsächlich direkt durch Kollagen aktiviert wurde, wogegen die Mehrheit ihre Aktivierung der Freisetzung von Mediatoren, wie ADP und Thromboxan A₂, zu verdanken hat (Nieswandt et al., 2002). Allerdings scheint es ohne Interaktion mit Aktivierung durch Kollagen-Kollagenrezeptoren zu einer starken Reduktion der ans Endothel gebundenen Thrombozyten wie auch zu mangelhafter bis fehlender Bildung von Aggregaten zu kommen (Siljander et al., 2004).

Die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung erfolgt außer durch das Glykoprotein VI (p62) auch wesentlich durch das Integrin $\alpha 2\beta 1$ (CD49b/ GPIa-IIa/ VLA-2) (Kehrel et al., 1998; Moroi, Jung, 1998; Siljander et al., 2004; Farndale, 2006).

Das Glykoprotein VI gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und besitzt zwei Immunglobulin-Domänen. In Komplexbildung mit einer FcR γ Untereinheit leitet es das Kollagensignal durch Tyrosin-Phosphorylierung an der Fc-Rezeptor- γ -Kette über darauf sitzende sogenannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine based activation motifs*) weiter. Daran schließt sich die Plättchenaktivierung über Phosphorylierung und Aktivierung der PLC $\gamma 2$ (Phospholipase C $\gamma 2$) mit daraus resultierendem intrazellulären Kalziumanstieg an. (Nieswandt, Watson, 2003; Jarvis et al., 2004; Watson et al., 2005) Das Integrin $\alpha 2\beta 1$ vermittelt nebst dem indirekten Kollagenrezeptor GPIb/V/IX durch vWF die Plättchenadhäsion (Siljander et al., 2004).

Im Zusammenspiel scheint es nach Andocken des Thrombozyten mit seinem Glykoprotein VI an das Kollagen zur Aktivierung und Affinitätssteigerung des Rezeptors $\alpha 2\beta 1$ für das Kollagen zu kommen, wodurch das Plättchen am Endothel stabilisiert wird (Nieswandt, Watson, 2003; Jarvis et al., 2004; Siljander et al., 2004). Die Aktivität des GP VI wiederum wird durch Ingangsetzen einer Signalkaskade mit Freisetzung von löslichen Mediatoren, wie u.a. durch ADP und TxA₂ sowie $\alpha 2\beta 1$, verstärkt. ADP und TxA₂ locken weitere Plättchen an und stimulieren zusätzliche $\alpha 2\beta 1$ -, $\alpha 11b\beta 3$ - (Fibrinogenrezeptor) und GP-VI-Rezeptoren. (Nieswandt, Watson, 2003)

1.3.2 Bakterielle Toxine

Multiple pathogene Bakterien produzieren potente toxische Substanzen. Im Allgemeinen erzielen die Toxine ihre Wirkung durch Veränderungen in der Zelfunktion des Wirtes über schwerwiegende Zellschädigung bis hin zur Zytolyse. Bis heute kennt man drei Kategorien von toxischen Bakterienprodukten: Zellwandkomponenten (Endotoxine, Peptidoglykane, Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren), Exotoxine (inclusive Exoenzyme) und Superantigentoxine. (van Amersfoort et al., 2003)

— α -Toxin

Aus den Jahren 1871/72 liegen Berichte von rundlich kokkoiden Elementen in Abszessen, im Eiter sowie im Blut von pyämischen Patienten vor. 1878 teilte Robert Koch seine Untersuchungen zur Ätiologie von Wundinfektionen mit. Bald darauf stellte im Jahr 1880 der schottische Arzt Alexander Ogston seine Arbeiten über Staphylokokken in einem berühmt gewordenen Vortrag vor. Die größte pathogene und damit klinisch-bakterielle Bedeutung kommt der koagulasepositiven Spezies *Staphylococcus aureus* zu. (Smith, 1982)

Staphylococcus aureus zeigt sich in der Natur als ein grampositives Bakterium mit der Fähigkeit multiple Oberflächen- und sezernierte Proteine, sowie andere Oberflächen-Komponenten wie Polysaccharide als Virulenzfaktoren zu exponieren (Blot et al., 1998; Lowy, 1998; Sinha, Herrmann, 2005).

Demzufolge spielt es als pathogener Keim eine wichtige Rolle in der Medizin bei Erkrankungen, die von Hautinfektionen bis hin zu intravaskulären Infektionen bzw. systemischen nosokomialen Infektionen reichen (Emori, Gaynes, 1993). Dazu zählen die Krankheitsbilder der infektiösen Endokarditis und der Sepsis sowie einschließlich des septischen Schocks (Sinha, Herrmann, 2005). Das Adhärenzieren des Bakteriums über sogenannte MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), wie zum Beispiel Clumping factor A (ClfA) und Fibrinogen binding protein A (FnbpA), und der Verlauf der Erkrankungen sind von multiplen staphylococcogenen globalen Regulatorsystemen abhängig (Niemann et al., 2004; Fitzgerald et al., 2006b; Nitsche-Schmitz et al., 2007; Rivera et al., 2007). Auch wenn *Staphylococcus aureus* an vielen Ansatzpunkten am Plättchen agieren kann, gilt das Augenmerk in dieser Arbeit besonders dem α -Toxin. Von der Mehrheit der *S.-aureus*-Ketten produziert, ist es auf dem *hla* Gen kodiert (Bhakdi und Tranum Jensen, 1991).

1. Einleitung

Xiong et al. (2006) schreiben dem *staphylococcal accessory protein effector sae*, eines von drei bekannten Regulatorgenen (*agr*, *SarA*), nebst der in vitro auch eine Bedeutsamkeit in vivo zu. Bekannt ist, dass es als relevanter pathogenetischer Faktor als hydrophiles Einzelketten Polypeptid von den meisten Ketten des *Staphylococcus aureus* sezerniert wird (Bhakdi et al., 1988).

In Wasserlösungen liegt das Toxin in monomerer Form vor; es kann sich aber in der Lösung langsam zu ringförmigen Oligomeren verbinden. In Anwesenheit von Desoxycholate oder an Lipidmembranen von Zellen kann dieser Vorgang stark beschleunigt werden (Bhakdi et al., 1981; Bhakdi et al., 1996).

Im Modell der Porenbildung von S. Bhakdi und J. Tranum Jensen gibt es vier Stadien: Erstens das Vorliegen des wasserlöslichen nativen Monomers; zweitens die Bindung des Monomers an eine Membran; drittens die heptamerische, nicht lytisch wirkende Prä-Pore; viertens die Konfiguration einer Pore, in der die funktionelle Domäne in die Membran eindringt und einen hydrophilen Kanal bildet (Walker et al., 1992; Walker et al., 1995). Letzterer wird aus sieben zentralen Domänen geformt, welche einen wassergefüllten Kanal wie eine ringbildende Heptamere bilden (Füssle et al., 1981; Bhakdi, Tranum Jensen, 1991; Gouaux et al., 1994). Die Struktur ist die eines β -Faltblatts (Song et al., 1996).

Aus der Neigung, ohne Detergenzien in wasserhaltigen Medien zu aggregieren, und aus der Fähigkeit, das Detergent und Lipide zu binden, lässt sich eine amphiphilische Natur rückschließen (Bhakdi et al., 1981). Das Molekulargewicht des Toxins beträgt $M_r = 34.000$ (Arbuthnott et al., 1967).

Spontan bindet das Toxin an Lipidmembranen und bildet dort funktionelle transmembrane Poren mit einem Durchmesser von 1,5 bis 2,0 nm. Auch elektronenmikroskopisch lassen sich diese Gebilde als kreisförmige Ringe erkennen (Bhakdi et al., 1988; Gouaux et al., 1994; Bhakdi et al., 1996).

Sekundärer Effekt aus der Aquaporenbildung ist die Funktion als nicht-physiologischer Kalzium-Kanal mit folgendem passiven Einstromen von Kalzium²⁺⁺ (Ca^{++}), das weitere Prozesse wie die Aktivierung von Phospholipiden und der Arachidonsäure-Kaskade mit Freisetzung von TxA_2 in Gang setzt (Bhakdi et al., 1988; Bhakdi et al., 1996). Pathophysiologisch resultiert daraus z.B. eine Sekretion von Granula-Inhaltsstoffen mit prokoagulatorischen Substanzen von Thrombozyten und eine kontraktile Dysfunktion in Endothelzellen mit Ödembildung und NO-Produktion, kurzum: eine systemische inflammatorische Reaktion (Bhakdi et al., 1996). Andere porenformende Toxine sind Streptolysin von Staphylokokken und das Hemolysin von *Escherichia coli* (Bhakdi et al., 1996).

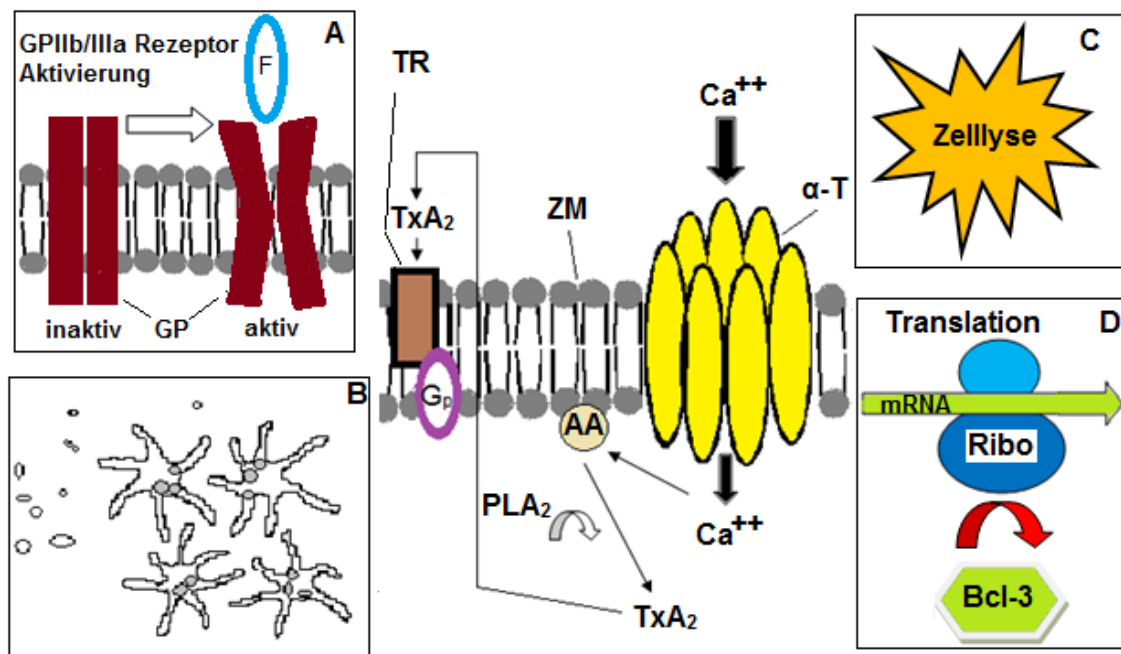


Abbildung 6: Auswirkungen des α -Toxins von *Staphylococcus aureus* auf den Thrombozyten: Das α -Toxin (α -T) führt durch die Porenbildung zum Einstromen von Ca^{++} . Hiernach Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), die wiederum die Freisetzung der Arachidonsäure (AA) aus den Phospholipiden der Zellmembran (ZM) katalysiert. Über mehrere enzymatische Schritte schließlich Bildung von Thromboxan A₂ (TxA₂). Letzteres kann in den extrazellulären Raum gelangen und über einen G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor (TR) die Thrombozytenaktivierung fördern. Hieraus resultieren: [A] Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa aus dem inaktiven in den aktiven Zustand mit Bindung des Fibrinogens (F) an den aktiven Rezeptor. [B] Stimulation der Granulasekretion und *shape change* des Blutplättchens über eine Signalkaskade u.a. durch TxA₂-Synthese. [C] In vitro kann α -Toxin eine Zelllyse des Blutplättchens induzieren. [D] Einfluss des Toxins auf die Proteinsynthese wie z.B. auf die Expression von Bcl-3. (In Anlehnung an die Grafik von Gawaz, 1999, (Seite 13 und 45).

Schon 1964 war klar, dass α -Toxin als Bakterientoxin imponiert, welches in subzytolytischen Konzentrationen als Plättchenaktivator und Blutkoagulator fungiert (Siegel, Cohen, 1964; Masek et al., 1969; Bhakdi et al., 1988). In vitro wurde dabei dem Plättchenreichen Plasma α -Toxin hinzugegeben und anschließend ein Dichtezuwachs der plättchenspezifischen Granula, vermehrte allgemeine Zytoplasma-Veränderungen mit *Shape change* der Thrombozyten und endlich ihre irreversible Aggregation nachgewiesen (Siegel, Cohen, 1964; Bhakdi et al., 1988). Toxinbehandelte Plättchen entfalten eine prokoagulatorische Aktivität mit Exozytose durch passiven Kalzium-Einstrom (Arvand et al., 1990). Danach gab es zunächst keine größeren Experimente mit α -Toxin bezüglich seines Einflusses auf Thrombozyten. 1988 griffen Bhakdi et al. diesen Gedanken wieder auf und wiesen in mehreren Experimenten nach, dass α -Toxin humane Thrombozyten aktiviert und die Plättchenaggregation anregt (Bhakdi et al., 1988).

Retrospektiv erweist sich das Exotoxin nicht als zelllytische Substanz, sondern imponiert mit seinen sekundären Effekten (Bhakdi et al., 1988). In dem näher beleuchteten Krankheitsbild der grampositiven Sepsis scheinen die Störung der Mikrozirkulation, koronare Vasokonstriktion und der Verlust der myokardialen Kontraktilität vorrangig zu sein (Sibeliu et al., 2000).

In schweren systemischen Infektionen und Septikämien kann als systemische Antwort der Plättchen auf die α -Toxin-Wirkung eine disseminierte intravaskuläre Koagulation resultieren (Bhakdi et al., 1988).

— Exotoxin A

Exotoxin A ist eines der toxischen Proteine, die von pathogenen Ketten des *Pseudomonas aeruginosa* freigesetzt werden (Morlon-Guyot et al., 2009). Das Bakterium ist ein für schwere Infektionen verantwortlich gemachter Mikroorganismus mit häufigem Auftreten in immunsupprimierten Menschen (Menestrina et al., 1991). Sezerniert als Proenzym mit einem Molekulargewicht von 66.000 Dalton, besteht es aus einer einzelnen Polypeptidkette mit 613 Aminosäuren und drei verschiedenen Domänen (Nordera et al., 1997). Nach rezeptorvermittelter Endozytose als notwendigem Schritt erfolgt anschließend eine intrazelluläre enzymatische Aktivierung mit Molekülreduktion auf 37.000 Dalton, wodurch letztlich die unten beschriebene toxische Wirkung entfaltet wird (Morlon-Guyot et al., 2009).

Allgemein gehört das Toxin zu den die Proteinsynthese hemmenden Exotoxinen und wirkt damit – durch Blockade der Ribosomenfunktion – zellwachstumhemmend. Genauer betrachtet ist es ein Enzym namens Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase. Durch Katalyse mit Transfer der Adenosindiphosphat-Ribose-Gruppe von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid auf das Protein Translocase, dem sogenannten Elongationsfaktor 2 (eukaryotisches G-Protein, eEF-2), wird das ribosomale Enzym (GTPase) inaktiviert. (Iglewski et al., 1977; Jørgensen et al., 2005; Jäger et al., 2011)

Molekularbiologisch ist das spezifische Ziel des Toxins und auch das des Diphtherietoxins ein innerhalb des eEF-2 liegender, posttranslatorisch veränderter Histidinrest, genannt Diphthamid (Zhang et al., 2008). Daraus folgt eine irreversible Blockade der Proteinsynthese, da die Translocase für die GTP-abhängige Translokation der Peptidyl-tRNA von der Akzeptor- zur Donor-Stelle auf dem Ribosom benötigt wird (Iglewski et al., 1977). Exakter ausgedrückt, wird der Translokationsschritt des verantwortlichen eEF-2, der die Peptidkettenelongation der Proteinsynthese

1. Einleitung

katalysiert, also die Bewegung der wachsenden Polypeptidkette, relativ zur mRNA inaktiviert. Jørgensen et al. (2005) beschreiben dabei ein biologisches Mimikry des Exotoxin A von einem rRNA-Stück, das für die Erkennung der tRNA unabdingbar ist. Zusammenfassend folgt eine schwerwiegende Schädigung der betroffenen Zellen mit Entwicklung von Infektionen, wie z.B. von Pneumonien, Hautinfektionen und im extremen Fall einer Sepsis. Selten beschrieben, aber auch Ursache der Erkrankung kann *Pseudomonas aeruginosa* im Falle der Endokarditis sein. (Plotkowski et al., 1994) Durch direkte Invasion des Bakteriums mithilfe seiner Toxine aus der Blutbahn führt es zur Schädigung der Herzklappen. In der Literatur werden Fälle u.a. von Menschen mit praktizierendem intravenösen Drogenabusus und erkrankte Patienten mit künstlichen Herzklappen beschrieben. (Bicanic und Eykyn, 2002; Sá et al., 2007; Kato et al., 2009)

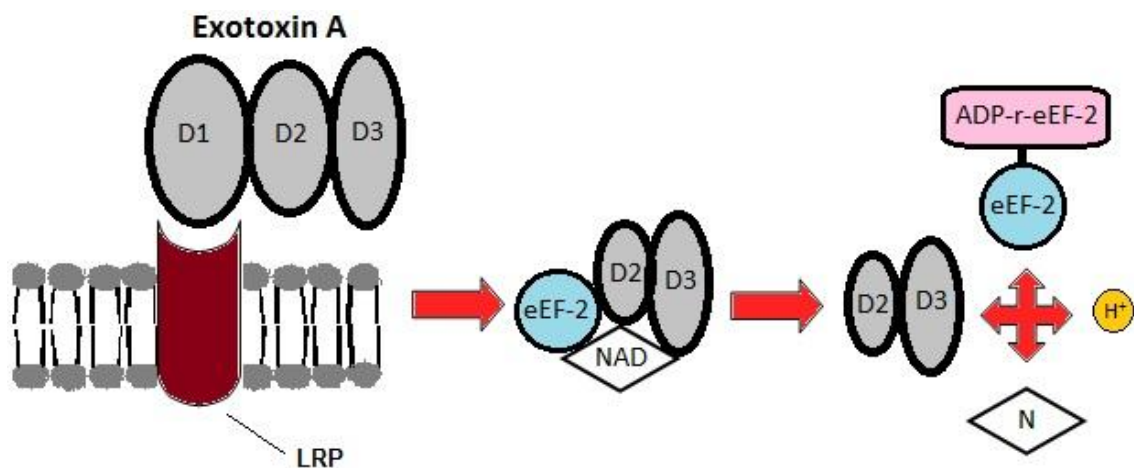


Abbildung 7: Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) besteht aus drei Domänen. Bindung der ersten Domäne an das *low-density receptor-related protein*. Weitere Prozesse: Endozytose und Toxinreduktion durch enzymatische Spaltung mittels Furin (nicht veranschaulicht). Freisetzung ins Zytosol und Zusammenlagerung der zweiten und der dritten Domäne mit dem Elongationsfaktor und NAD. Die dritte enzymatisch wirkende Domäne führt zur Ribosylierung des eEF-2 mit Nikotinamid und Wasserstoffion als Nebenprodukt. Der Elongationsfaktor eEF-2 wird zu einem ADP-Ribosyl-EF2-Komplex gebunden. Eine Blockade der Proteinsynthese resultiert. *LRP* *low-density receptor-related protein*, *NAD* Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, *eEF-2* eukaryotischer Elongationsfaktor 2, *N* Nicotinamid, H^+ Wasserstoffion, *D1* Bindungsprotein, *D2* Domäne 2, *D3* Enzymatisch wirkende Domäne (Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase), *ADP-r-eEF-2* ADP-Ribose-Elongationsfaktor Komplex 2.

— Lektin

In der Pathogenese von *Pseudomonas aeruginosa* zeigen sich die Schritte zur oligosaccharidvermittelten Bakterium-Zell-Erkennung und zur Adhäsion als bedeutsam. Dazu produziert *Pseudomonas aeruginosa* piläre und nicht piläre Adhäsine (Plotkowski

1. Einleitung

et al., 1994). Weiterhin sind zwei kohlenhydratbindende Lektine (= Proteine), genannt Lektin 1 (Lec A, PA-IL) und Lektin 2 (Lec B, PA-IIL), relevant. Beide können an eine Glykocalyx von Epithel und Endothel adhären, repräsentieren einen Virulenzfaktor und nutzen das Kalziumion zur Bindung der Kohlenhydrate. (Imberty et al., 2004)

PA-IL bindet bevorzugt an D-Galaktose und PA-IIL spezifisch an L- Fucose. Beide Toxine wirken ciliostatisch auf respiratorische Epithelzellen, im Fall von LecA über drei Phasen. (Mewe et al., 2005) LecA wird – da wir es in unseren Experimenten verwendet haben – genauer betrachtet. Wie Glick und Garber (1983) herausgefunden haben, kommt es hauptsächlich im Zytoplasma vor; es scheint aber auch in geringer Anzahl an der zytoplasmatischen Membran, an der Außenmembran sowie im periplasmatischen Raum lokalisiert zu sein. Vermutlich findet eine Bindung des Lektins (PA- IL) an Kohlenhydrat-Enden von Transmembran-Proteinen statt (Mewe et al., 2005). Blanchard et al. (2008) schildert dabei spezifischer die höhere Affinität des tetramersch aufgebauten Proteins zu α -galaktosylierte Glykane. Offen bleibt allerdings, wie es, in Anbetracht des Hauptvorkommens im Zytoplasma, an die Zielmembran kommt. Möglich wäre neben der Sezernierung des Toxins durch *Pseudomonas* auch die Freisetzung des PA-IL nach Zerstörung des Bakteriums (Bajolet-Laudinat et al., 1994). Dies könnte folglich zur Konformationsänderung von Rezeptoren bzw. Glykoproteinen führen. Ergänzend zeigt sich in den Studien, dass LecA neben zytotoxischen Effekten im Respirationstrakt auch eine vermehrte Durchlässigkeit der intestinalen Schleimhaut mit gesteigerter Wirksamkeit von Exotoxin A hervorruft (Bajolet-Laudinat et al., 1994; Chemani et al., 2009).

Beide Toxine sind, neben anderen, auf dem virulenten Insel-Gen lokalisiert. Im Falle einer Expression des LecA scheint dies mit der Expression des Exotoxin A koreguliert zu sein. (Laughlin et al., 2000) Schließlich wird auch die Fähigkeit zur Adhäsion an Endothelzellen über direkte Interaktion beschrieben (Chemani et al., 2009). Plotkowski et al.(1994) untersuchten *Pseudomonas aeruginosa* bezüglich seiner selektiven Bindung und schließlich seines Eintretens in humane Endothelzellen und schrieben den vom Bakterium produzierten Adhäsinen eine wichtige Bedeutung zu. Auch eine funktionelle Bedeutung des Lektins scheint in der infektiösen Endokarditis und anderen Infektionserkrankungen möglich. Insgesamt eröffnet sich wegen der wichtigen Rolle, die die Lektine in der Pathogenese des *Pseudomonas aeruginosa* spielen können, ein neuer therapeutischer Ansatz für die Zukunft.

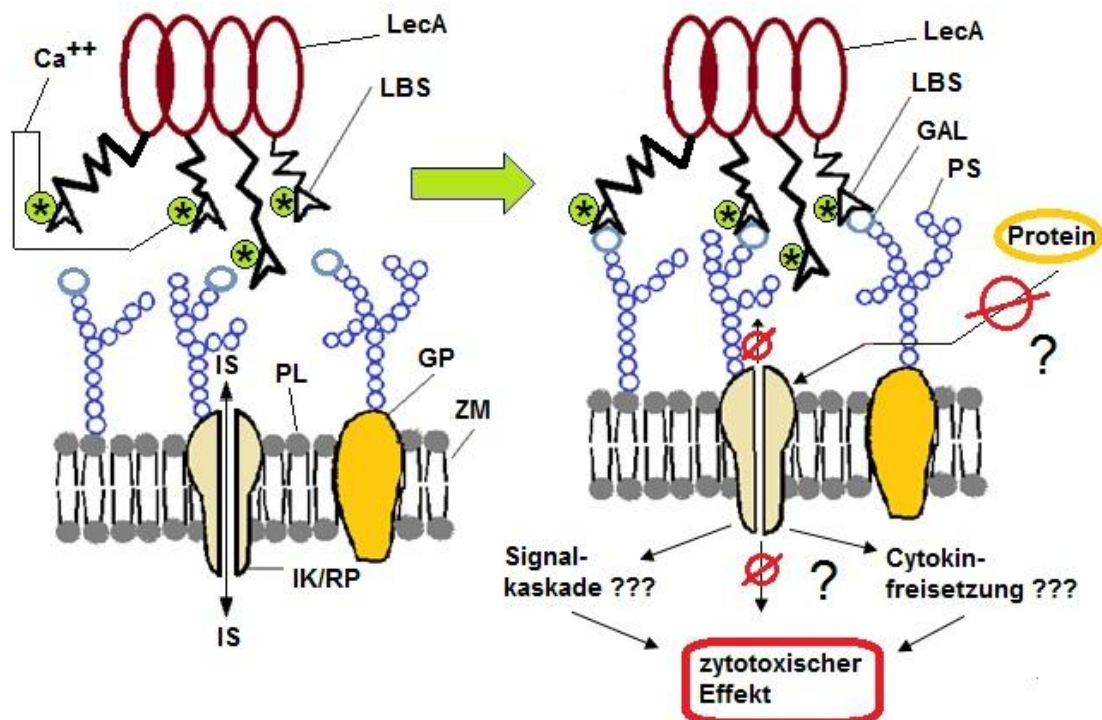


Abbildung 8: Darstellung einer Glykokalyx mit Glykoproteinen (GP) und Phospholipiden (PL) sowie dem daran kovalent gebundenen Glykanen. Die Glykane sind über glykosidische Bindung mit einem Monosaccharid verbunden; hier dargestellt galaktosylierte Glykane. Andocken der Ligandenbindungsstelle des tetramerschen Lektin (PA-IL) an die galaktosylierten Glykane. Für diese Bindung sind die gebundenen Kalziumionen wichtig (Imberty et al., 2004). Bisher ist kein Wirkungsweg bekannt, der u.a. zum zytotoxischen Effekt führt. Gegebenenfalls rührt der mögliche Wirkungsweg über eine unbekannte Signalkaskade, Cytokinfreisetzung, Abbruch bisheriger essentieller Ionenkanal-, Rezeptorproteinfunktionen oder Konformationsänderung von Glykoproteinen und damit Blockade deren Funktion her. Gal Galaktose, PS Polysaccharid=Glykan, IS Ionenstrom, ZM Zellmembran, Lec A Lektin A, LBS Liganden-Bindungsstelle, IK/RP Ionenkanal/Rezeptorprotein, Ca^{++} Kalziumionen.

— Lysostaphin

Lysostaphin, beschrieben mit einem Molekulargewicht von fast 27 kDa, gehört zur Gruppe der Endopeptidasen (Glycyl-glycine Zink Endopeptidase; Metalloenzym) und wird vom *Staphylococcus stapholyticus* biovar *simulans* durch Expression seines dafür kodierten Gens produziert (Kumar, 2008). Das mukolytische Protein spaltet die vernetzten Polyglycine in der Peptidoglykanschicht von Staphylokokken Spezies und führt damit durch Zerstörung der Zellwand mit Verlust des osmotischen Gleichgewichts zur unmittelbaren Lyse des Bakteriums (Gründling, Schneewind, 2006; Kokai-Kun et al., 2007). Francius et al. (2008) konnten durch Verwendung eines Atomkraftmikroskops darstellen, wie es zur immensen Zellschwellung und schließlich

1. Einleitung

induzierten, im Nanobereich liegenden Perforationen der Zellwand durch Exposition eines *Staphylococcus aureus* mit Lysostaphin kommt. Im Laufe der Zeit konnte das Gen für das Toxin determiniert und geklont werden, sodass das heute verwendete rekombinante Lysostaphin nur noch aus 246 statt der ursprünglichen 389 Aminosäuren besteht (Oldham, Daley, 1991). Das Toxin enthält zwei Domänen, die der *glycyl-glycine endopeptidase* und die der *C-terminal cell wall-targeting domain* (CWT) (Gründling, Schneewind, 2006; Yang et al., 2008). Yang et al. (2008) untersuchten bezüglich der letzteren Domäne einen möglichen Zusammenhang mit Interaktion zwischen der CWT des Lysostaphins und dem C-Terminus des *target of RNAIII activating protein* (TRAP). TRAP besitzt eine wichtige Funktion bei der Regulation der Exoproteinsekretion des *S. aureus* (Balaban et al., 2001; Yang et al., 2008). Als stapholytische Substanz findet es im experimentellen Bereich zur Behandlung (insbesondere antibiotikaresistenter) *Staphylococcus aureus* induzierter Infektionen auf verschiedene Weise Anwendung (Kumar, 2008). Dabei ist es für die Zerstörung des Bakteriums irrelevant, ob es bekapselt oder unbekapselt bzw. ob es im Ruhe- oder im aktiven Zustand vorliegt (Kumar, 2008). Da im klinischen Alltag in der Antibiotikatherapie vermehrt Resistenzen auftreten, wurde nach einer Alternative zur klassischen Therapie gesucht (Oldham, Daley, 1991). In der Literatur wird Lysostaphin u.a. auch als Prophylaxe gegen Infektionen venöser Katheter bzw. gegen deren Besiedlung mit *S. aureus* beschrieben (Kokai-Kun et al., 2009). Schließlich gibt es auch einen positiven additiven Effekt durch eine Kombinationstherapie mit gegen *S. aureus* wirksamen Antibiosen (Kokai-Kun et al., 2007), beispielsweise wie Climo et al. (1998) zeigen, zur experimentellen Behandlung einer methicillin-resistenten *S. aureus* induzierten Aortenklappenendokarditis. Das Ergebnis: In der Behandlung der Endokarditis ist Lysostaphin allein oder in Kombination mit der Antibiose Vancomycin in der Therapie weitaus effektiver als Vancomycin allein (Climo et al., 1998). Einen Bezug zu möglichen Effekten auf die Thrombozyten scheint es in vitro noch nicht zu geben. Interessant schien der mukolytische bzw. lysierende Aspekt des Toxins, speziell sein Einfluss auf den Thrombozyten oder seinen aktiven Zustand.

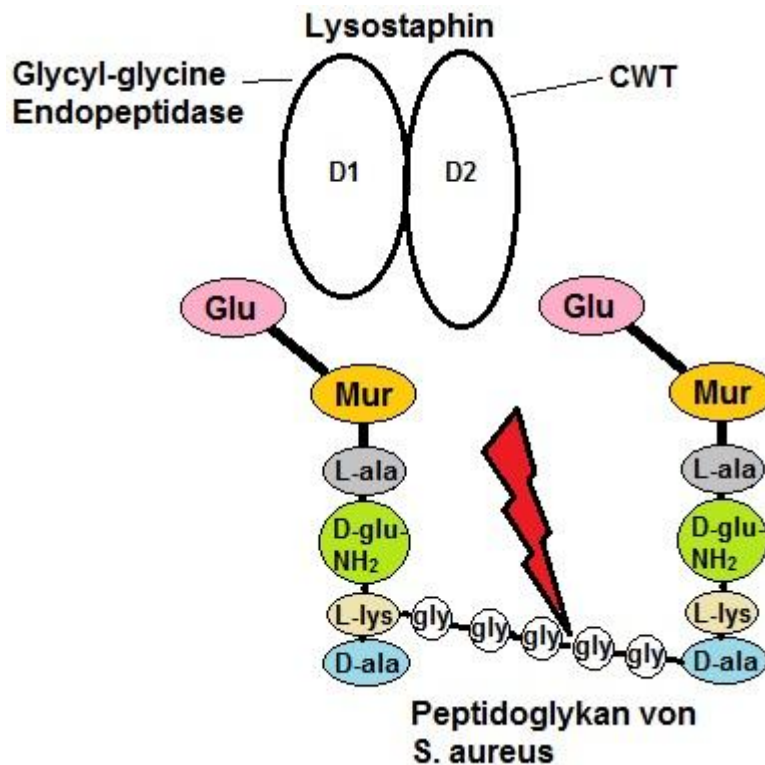


Abbildung 9: Lysostaphin dargestellt mit zwei Domänen, *glycyl-glycine endopeptidase* und *C-terminal cell wall-targeting domain*. Peptidoglykan von *S. aureus* besteht aus einer allgemeinen Baueinheit, wo N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure $\beta(1\rightarrow4)$ glycosidisch (nicht veranschaulicht) miteinander verknüpft sind. An N-Acetylmuraminsäure ist jeweils ein Tetrapeptid angeknüpft. Enzymatische Aktivität des Lysostaphins: Lysostaphin spaltet die Zellwand des *Staphylococcus aureus* zwischen dem dritten und vierten Glycin der Pentaglycin-Querbrücke (Kokai-Kun, 2007). *Mur* N-Acetylmuraminsäure, *Glu* N-Acetylglucosamin, *ala* Alanin, *gly* Glycin, *glu* Glutamin, *CWT* C-terminal cell wall-targeting domain, *lys* Lysin. (In Anlehnung an die Grafik von Kumar, 2008)

— LPS

Das Lipopolysaccharid (LPS) ist die Hauptkomponente der Zellwand von gramnegativen Bakterien. Aus drei Bestandteilen bestehend, dem hydrophoben Lipid A einerseits und dem Kernpolysaccharid sowie dem O-Antigen andererseits, wird es im Falle einer Bakteriolyse in die Blutzirkulation freigesetzt (Tran et al., 2008). Über die Stimulation der Blutzellen kommt es zu einer gewaltigen Überproduktion der Biomodulatoren (z.B. Interleukine, TNF- α , Plättchenstimulierender Faktor); das Immunsystem wird durch Ingangsetzen der Komplement- und der Gerinnungskaskade aktiviert; schließlich werden Prostaglandine und Leukotrine produziert. Indem es sich an Plasmaproteine bindet, formt LPS Komplexe, wodurch die toxische Aktivität und Affinität gegenüber Zellrezeptoren erhöht wird. (Saluk-Juszczak, Wachowicz, 2005)

1. Einleitung

Mehrere Studien beschreiben die Aktivierung der Thrombozyten durch Bindung von LPS an den Toll-like-receptor 4 (TLR 4), der über der Plättchenmembran lokalisiert ist, an CD 62 sowie durch Freisetzung von aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren, CD 40L und Fibrinogenbindung (Ståhl et al., 2006). Vorher scheint sich jedoch das LPS an das LPS-bindende Protein (LBP) anzulagern und wird durch dieses dem CD14 zugetragen (Andonegui et al., 2005; Shashkin et al., 2008; Zhang et al., 2009).

Hierdurch kommt vermutlich LPS mit dem TLR 4 in Berührung, wodurch es in Anwesenheit eines weiteren Proteins, dem Myeloid differentiation protein-2 (MD-2), zur LPS-induzierten transmembranen TLR-4-Signalwirkung kommt. Das MD-2 ist ein Glykoprotein; es bindet an die extrazelluläre Domäne vom TLR 4 und verstärkt dessen Signalwirkung. Die in Gang gesetzten Signalkaskaden scheinen bisher weitestgehend unbekannt zu sein. Auch ist unklar, ob die Plättchenaktivierung direkt oder über multiple Reaktionsketten mit schließlicher Stimulierung der Inflammation erfolgt. (Zhang et al., 2009)

Der TLR 4 scheint allerdings bezüglich der Plättchensekretion nicht in vitro nachweisbar zu sein (Jayachandran et al., 2007; Shashkin et al., 2008).

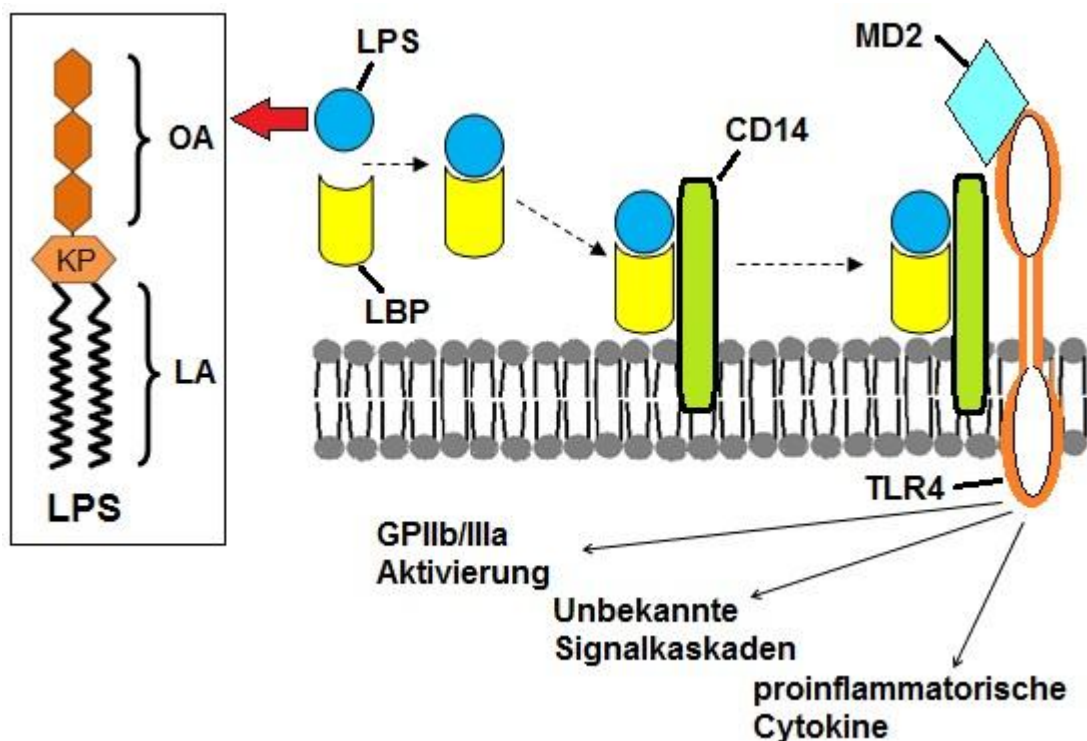


Abbildung 10: Darstellung des Lipopolysaccharid von E.coli im Detail (links). LPS bindet an LBP, welches das LPS zu CD14 führt. Dieser Rezeptor bringt den Kontakt von LPS mit dem TLR4 und MD2 zustande. Hierüber Aktivierung der Zelle mit Freisetzung proinflammatorischer Cytokine und GPIIb/IIIa Aktivierung. Aktivierung bisher unbekannter Signalkaskaden. *LPS* Lipopolysaccharid, *OA* O-Antigen, *KP* Kernpolysaccharid, *LA* Lipid A. *LBP* Lipopolysaccharid bindendes Protein, *CD14* CD14-Rezeptor, *TLR 4* Toll-like-receptor 4, *MD-2* Myeloid differentiation protein-2.

1.3.3 Antithrombozytäre Substanzen

Der wachsende Wissensstand führte zur Entwicklung einer Reihe von Medikamenten, die die Thrombozyten durch unterschiedliche Mechanismen an diversen Strukturen beeinflussen (Gawaz, 1999).

Um die Wirkungsweise der antithrombozytären Substanzen zu verstehen, ist es notwendig, die zahlreichen plättchenaktivierenden Mediatoren mit ihren jeweiligen Rezeptoren und Wirkmechanismen zu kennen.

— Prostazyklin (Iloprost)

Prostazyklin (Prostaglandin I_2 , (PGI_2)) gehört zur Substanzklasse der Eicosanoide, die aus Arachidonsäure z.B. in Endothel- und Muskelzellen synthetisiert werden, und wirkt als ein starker endogener Inhibitor der Thrombozytenaggregation. Das körpereigene Prostazyklin ist eine chemisch sehr instabile Substanz, wohingegen das synthetisierte Iloprost chemisch stabil ist. Physiologischer Antagonist des Prostazyklins ist das in Thrombozyten selbst zur Verfügung gestellte TxA_2 . (Gryglewski, 2008)

An den Prostaglandinrezeptor, der zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, kommt es aufgrund des G_s -Proteins (stimulierendes G-Protein) zur Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen AMP (Weiss, Turitto, 1979). Dieses führt wiederum zu einer Aktivierung der Proteinkinase A und damit zur Phosphorylierung verschiedener Substrat-Proteine (z.B. Membranproteine wie Rezeptoren und Kaliumkanäle). Auch verringert sich die Expression von Fibrinogen-Rezeptoren und P-Selektin auf den Plättchen. (Kozek-Langenecker et al., 2003)

Insgesamt wirkt sich diese Reaktion inhibitorisch auf die Plättchenaktivierung, -aggregation und -sekretion aus. Iloprost hat aufgrund der prostazyklinähnlichen Molekülstruktur ebenfalls eine hohe Affinität zum PGI_2 -Rezeptor und eine vergleichbare pharmakodynamische Wirkung. Auch führt es durch seine vasodilatatorische Wirkung zur Relaxation der glatten Muskelzellen, weshalb es auch zur Therapie der pAVK genutzt wird. Über eine G_q -Kopplung wird eine Stimulation des Rezeptors mit vermehrter Produktion von Inositoltriphosphat postuliert. (Ciufetti et al., 2003)

– Levosimendan

Levosimendan (Pyridazinon-dinitril-Derivat) ist ein noch nicht allzu lang auf dem Markt gehandelter Kalzium-Sensitizer (Handelsname: SIMDAX®) zur Therapie einer akut dekompensierten, schwer chronischen Herzinsuffizienz. Weiterhin wird durch eine intravenöse Gabe von Levosimendan eine Besserung der links- als auch rechtsventrikulären hämodynamischen Parameter bei einem durch einen akuten Herzinfarkt ausgelösten kardiogenen Schock beschrieben (Russ et al., 2007; Russ et al., 2009). Neuerdings findet es auch im Management des septischen Schocks Anwendung. (Morelli et al., 2005; Noto et al., 2005) Das Medikament zeichnet sich durch seine positiv inotropen und gleichzeitig vasodilatorischen Eigenschaften aus (Kamath et al., 2009). Es erhöht durch seine kalziumabhängige Bindung an die N-terminale Domäne des Troponin C die Kalziumsensitivität der myokardialen kontraktilen Proteine mit Erhöhung der kardialen Kontraktilität. Die vasodilatorischen Eigenschaften werden durch Öffnung mitochondrialer ATP-sensitiver Kaliumkanäle bewerkstelligt. (Morelli et al., 2005; Fotbolcu et al., 2010)

Ferner werden in der Literatur auch zusätzliche Effekte auf Thrombozyten, insbesondere Einflüsse auf ihre Funktion in der Hämostase, beschrieben; aus diesem Grunde kommt das Medikament auch in unseren In-vitro-Versuchen zum Einsatz (Kaptan et al., 2008). Levosimendan hat offenbar eine inhibitorische Wirkung auf die Phosphodiesterase III (Behrends, Peters, 2003). In Thrombozyten konnten drei Phosphodiesterasen identifiziert werden, wobei dem Typen III die größte Bedeutung zugeschrieben wird (Buerke et al., 1997). Sein reduzierter Abbau zu inaktivem 5'-Adenosinmonophosphat lässt den Spiegel von zyklischem Adenosin-Monophosphat (cAMP) ansteigen (Nieminen et al., 2005). Zyklisches AMP gilt als inhibitorisch fungierender sekundärer Messenger, der durch Inhibierung der Hydrolyse des Phosphoinosits mit anschließender verminderter IP₃-Bildung ein Absinken der Kalziumfreisetzung zur Folge hat (Buerke et al., 1997; Kehrel, 2003). Angesichts der Tatsache, dass experimentell eine Plättcheninhibition nachgewiesen werden konnte, scheinen weitere mögliche Ansatzpunkte zur Unterdrückung des Kalziumeinstroms aus dem extrazellulären Raum oder zu einer anderweitigen Reduktion der Kalziummobilisierung aus dem dichten tubulären System physiologisch begründet zu sein (Kaptan et al., 2008).

– **Abciximab (Reo Pro)**

Abciximab gehört zu den monoklonalen Antikörpern, die den für die Plättchenaggregation wichtigen Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex nicht kompetitiv blockieren. Auch bindet es nicht selektiv, da es im Weiteren auch an Vitronektin ($\alpha_v\beta_3$)- und Fibronektinrezeptoren andockt. (Glusa, 2000) Um die Immunogenität so niedrig wie möglich zu halten wurde dem murinen Antikörper einerseits der Fc-Anteil weggeschnitten sowie andererseits ein Teil des Fab-Stücks mit humanen Fab-Anteilen versehen (humanisiertes chimeres Fab-Fragment) (Coller et al., 1983; Gawaz, 1999).

Im Gegensatz zu den Plättchenfunktionshemmern ASS und Clopidogrel, die die thrombozytären Signalkaskaden hemmen, blockieren die Antiintegrine direkt die Fibrinogenbindung am Glykoprotein IIb-IIIa-Komplex und damit eben auch die Aggregation (Nannizzi-Alaimo et al., 2003). Der Rezeptor kann durchaus im inaktiven Zustand vorliegen, wobei lösliches Fibrinogen nur am aktiven Glykoprotein bindet (Kehrel, 2003). Entwickelt wurde das Präparat vor allem zur adjuvanten Therapie der lebensbedrohlichen intravasalen Plättchenaktivierungen, wie im Fall der instabilen Angina pectoris oder der Myokardinfarkte, wo die Kombination von ASS und Clopidogrel wegen hoher Konzentration von Thrombozytenaktivatoren nicht ausreicht (Lincoff et al., 2000; Schwarz et al., 2006). Um eine zuverlässige und optimale Hemmung der Thrombozytenaggregation gewährleisten zu können, müssen ständig über 80 Prozent der Gesamtrezeptorzahl blockiert werden (Steinhubel et al., 2001).

– **Eptifibatid (Integrilin)**

Der zweite Glykoproteinrezeptor-Antagonist hemmt die Fibrinogenbindung am thrombozytären Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor effektiv und ist auch für den Einsatz bei einem akuten Koronarsyndrom entwickelt worden (Schwarz et al., 2006). Eptifibatid ist ein aus sieben Aminosäuren zusammengesetztes, zyklisch entwickeltes Peptid. Die Bindung erfolgt dabei kompetitiv am Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor an der typischen Bindungsstelle von Fibrinogen. (Glusa, 2000)

Auch wird in der Literatur beschrieben, dass die proinflammatorischen und prothrombotischen Proteine CD40L und CD 40 durch die GP-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten speziell das Eptifibatid in ihrer Wirkung beeinflusst werden. Die Hydrolyse des CD40L und die Freisetzung der löslichen Form (sCD40L) aus stimulierten Thrombozyten wird gehemmt. (Nannizzi-Alaimo et al., 2003) Bei einer suboptimal verlaufenden Therapie wirkt der GP-IIb-IIIa-Antagonist deshalb eher proinflammatorisch (von Hundelshausen, Weber, 2007).

Im Krankheitsbild der Sepsis – wie auch in der infektiösen Endokarditis – spielen bakterielle Toxine (Endotoxine und Exotoxine) eine bedeutende Rolle. Bei einer Sepsis wird durch die Freisetzung von Toxinen das Immunsystem aktiviert; daraufhin setzt eine systemische Entzündungsreaktion das Gerinnungs- und Fibrinolyse-System in Gang. Neben Blutungen wurden dabei auch intravasale Mikrothrombenbildungen beobachtet. (Levi et al., 2002) Bei der bakteriellen Endokarditis treten charakteristische Vegetationen am Endothel des Klappenapparats auf, die aus einer Zusammenlagerung von Fibrin, Thrombozyten, Mikroorganismen und Entzündungszellen bestehen (Hoffmann, Hanrath, 2007). Derartige thrombotische Ablagerungen kommen ebenfalls durch inflammations-bedingte Immunreaktionen zustande (Levi et al., 2002).

Die Frage ist also, ob bakterielle Toxine einen Einfluss auf die Thrombozyten und – genauer betrachtet – auf die Plättchenaggregation haben. Wirken bakterielle Toxine eher aggregatorisch oder eher inhibitorisch auf die primäre Hämostase?

In vielen Studien untersucht, zeigt sich *Staphylococcus aureus* als ein hoch virulentes Bakterium, welches häufig Infektionserkrankungen wie bakterielle Endokarditis und Septikämien verursacht (Kerrigan et al., 2008). Neben anderen produziert es das so genannte α -Toxin, das auf die Thrombozyten einen pro-aggregatorischen Effekt hat (Bhakdi et al., 1988). Im Anschluss an den durch Kupferwasser et al. (1999) erbrachten Nachweis der Virulenzminderung von *Staphylococcus aureus* durch Salizylsäure, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob diverse Medikamente speziell die Wirkung des α -Toxin auf die Thrombozyten beeinflussen können. In Bezug auf die in der Klinik bewährten Thrombozytenaggregationshemmer ist auch zu fragen, ob der Kalzium-Sensitizer Levosimendan auf die α -toxin-induzierte Plättchenaggregation Wirkung zeigt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Ansatz für eine differenzierte therapeutische Intervention bei Sepsis und Endokarditis zu finden, durch die die Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation mittels antithrombozytärer Wirkstoffe inhibiert wird.

Durch die Anwendung verschiedener Medikamente mit gewisser und ungewisser antithrombozytärer Funktion soll ein Vergleich erzielt werden:

2. Ziel der Untersuchung

- a. Sind die Präparate in ihrer inhibitorischen Wirksamkeit auf die Plättchenaggregation mit ADP bzw. Kollagen induziert und in ihrer α -Toxin-Wirkung vergleichbar?
- b. Können eine Konzentrationsabhängigkeit bzw. eine effektive und inhibitorische Konzentration nachgewiesen werden?

Die herkömmliche Therapie der infektiösen Endokarditis besteht zumeist nach Empfehlung durch die Paul-Ehrlich-Gesellschaft aus einer zunächst ungezielten Initialtherapie mit Antibiotika. Durch vorherige Abnahme von aeroben und anaeroben Blutkulturen kann nach Diagnose des Keims nötigenfalls eine antibiotische Therapiekorrektur durchgeführt werden.

Bezüglich dieser korrekten Therapie ist nun in der experimentellen Untersuchung zu prüfen, inwiefern sie gegebenenfalls bei entsprechenden Vorkenntnissen der Pathophysiologie durch eine adjuvante Therapie erweitert werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen folgende Problemstellungen bearbeitet werden:

1. Einfluss bakterieller Toxine auf die Aggregation humaner Thrombozyten.
2. Vergleichbarkeit der Wirkung des Exotoxins α -Toxin von *Staphylococcus aureus* zu physiologischen Thrombozytenaggregatoren wie ADP und Kollagen.
3. Vergleichbarkeit der Toxine Lektin (*Pseudomonas aeruginosa*), Lysostaphin (*Staphylococcus stapholyticus*) und Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) in ihrer Wirkung mit physiologischen Aggregationsinhibitoren der Thrombozyten.
4. Wirkung von Medikamenten (Abciximab, Integrillin, Levosimendan und Iloprost) auf die ADP- und Kollagen-, d.h. die physiologisch induzierte Plättchenaggregation.
5. Einfluss von Medikamenten auf die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation.
6. Konzentrationsabhängige Wirkung medikamentöser Substanzen.

3.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

3.1.1 Allgemeine Laborgeräte und Materialien

- Pipetten: 2 – 20 µl; 10 – 100 µl; 100 – 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Mikropipetten: 10 U, 25 U und 50 U (Exmire Microsyringe, ITO Corporation, Japan)
- Pipettenspitzen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Zentrifugenröhrchen: 15 ml und 50 ml (LABCON, North America)
- Monovetten-Kanüle: 0,8 x 38 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
- Glasbecher 10 ml (Schott Duran, Mainz)
- Einmalspritzen: 10 ml, 5 ml und 2 ml (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Einmal-Injektions-Kanüle: Sterican (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Multi®-Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Zentrifuge (Rotina 48 RC)

3.1.2 Spezielle Materialien und Geräte

a) Blutentnahme

- Desinfektionsspray: Softasept® N (Braun Melsungen AG, Melsungen)
- Stauschlauch
- Tupfer (NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co, Wetter)
- Venenpunktionsbesteck: Multifly® Set (Sarstedt, Nümbrecht)
- S-Monovette 10 ml + Trinatriumcitrat-Lsg. 0,106 mol/l [0,3ml Citrat Lsg.] (Sarstedt, Nümbrecht)

b) Aggregationsmessung

- Computer
- Software: APACT (PASS Engineering GmbH, Bonn)
- Koagulometer-Aggregometer (APACT 4, Rolf Greiner Biochemics, Flacht)
- Mikroküvetten mit Mixer 1,0 x 4,0 mm (Rolf Greiner Biochemics, Flacht)
- Mikroküvetten ohne Mixer (LABiTec Biomedical Technologies GmbH, Ahrensburg)
- Mikromixer 500: 1,0 x 4,0 mm (LABiTec Biomedical Technologies GmbH, Ahrensburg)

3.2 Chemikalien und Lösungen

3.2.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

- Ethanol 96% (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- NaCl 0,9% (Baxter GmbH, Unterschleißheim)
- Aqua ad injectabilia (Baxter GmbH, Unterschleißheim)

3.2.2 Spezielle Chemikalien und Lösungen

a) physiologische Substanzen

- ADP-Reagenz (Rolf Greiner; Best.Nr.:5366, Flacht)
- Kollagen (Rolf Greiner; Best.Nr.:5368, Flacht)

b) Toxine (Sigma- Aldrich- Chemie GmbH, München)

- α -Toxin (α -Hemolysin) (Staphylococcus aureus) (C.- Nr.: H9395)
- Lektin (PA-1) (Pseudomonas aeruginosa) (C.- Nr.: L9895)
- Lysostaphin (Staphylococcus staphylolyticus) (C.- Nr.: L4402)
- Exotoxin A (Pseudomonas aeruginosa) (C.- Nr.: P0184)
- Lipopolysaccharide (Escherischia coli) (C.- Nr.: L3129)

c) Medikamente

- Integrilin 2 mg/ml (Eptifibatid) (GlaxoSmithKline GmbH, München)
- Reo Pro® 5 ml zur i.v. Inj. (Abciximab) (Lilly Deutschland GmbH, Gießen)
- Ventavis® 10 µg/ml (Iloprost-Analogon) (Schering, Berlin)
- Simdax TM 2,5 mg/ml (Levosimendan) (Abbott GmbH, Wien)

4.1 Versuchsvorbereitungen

4.1.1 Probengewinnung

Für die Gewinnung von Blutzellen bzw. Blutplasma wurde aus einer großkalibrigen Vene bei mäßiger Stauung von gesunden, freiwilligen Probanden (Alter: 18 bis 30 Jahre) Blut entnommen. Hierzu wurde als Venenpunktionsbesteck das Multifly-Set mit weitem Lumen verwendet. Eingeschlossen wurden nur Probanden, die in den letzten 14 Tagen keine acetylsalicylsäure-haltigen und in den letzten 2 Tagen keine nichtsteroidalen Medikamente oder andere die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Mittel eingenommen hatten. Gefüllt wurde das Vollblut in 10-ml-Monovetten, die als Antikoagulanzen 0,3 ml 0,106-mol/l-Citratlösung enthielten.

4.1.2 Probenverarbeitung

Nach Blutabnahme konnten die Citrat-Monovetten für 15 min mit 100 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert werden. Hierbei bildeten sich wie erwartet drei Phasen, wobei der Überstand mit dem plättchenreichen Plasma (PRP, *platelet rich plasma*) vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen werden konnte. Das PRP wurde gleich, durch Einstellung der Pipette auf 200 µl, dosiert und in die Messküvetten verteilt.

Der Rückstand kam erneut für 5 min bei 2.000 x g in die Zentrifuge zur Gewinnung des plättchenarmen Plasmas (PPP, *platelet poor plasma*). Dieses wurde in zwei Messküvetten pipettiert und für die Eichung des Aggregometers benötigt.

4.1.3 Herstellung der Verdünnungsreihen der Substanzen

a) ADP (200 µM) liegt als Lyophilisat vor und wird vor Gebrauch in 1 ml bidestilliertem Wasser aufgelöst. Um eine Konzentration-Wirkungskurve zu erzeugen wurden fünf ADP-Konzentrationen verwendet (20 / 10 / 5 / 2 / 1 µM).

b) Kollagen (100 µg/ml) kann dagegen für die höheren Konzentrationen gebrauchsfertig genutzt werden. Außer die benötigten geringeren Konzentrationen

4. Methoden

(0,1 und 0,05 µg/ml) wurden in 1:10-Verdünnungen (100 µl Kollagen + 900 µl NaCl 0,9%) mit NaCl 0,9% in Multi-Reaktionsgefäßen zusammengebracht.

Kollagen wurde auch wie ADP als Aggregationagonist gewählt und kam in sechs Konzentration (10 / 5 / 1 / 0,5 / 0,1 / 0,05 µg/ml) in Anwendung.

c) Als stimulierendes bakterielles Toxin wurde das α -Toxin von *Staphylococcus aureus* eingesetzt. Dieses wird auch α -Hemolysin genannt und gehört – wie anfangs beschrieben – zu den Exotoxinen. Vorgelegt hat das Toxin als 1 mg Trockensubstanz, der 1 ml Wasser hinzugefügt wurde. Anschließend kam die Lösung in sogenannte Multi-Reaktionsgefäße zu je 50 µl, um danach bei -20°C eingefroren zu werden und bei Bedarf nach mindestens 15-minütigem Auftauen (bei Raumtemperatur) zu gebrauchen. Nach dem Auftauen wurden dem aufgelösten Toxin noch 950 µl Wasser beigefügt. Anfangs wurde das Toxin in sieben Konzentrationen (10 / 5 / 3 / 1 / 0,5 / 0,3 / 0,1 µg/ml) angesetzt, wobei zu Beginn die beiden letzten Verdünnungen aufgrund des Aufwandes weggelassen wurden.

d) Als neu erprobte Toxine kamen hinsichtlich der Bedeutung auf die Plättchenaggregation erstens das Lektin (PA-1L, *Pseudomonas aeruginosa* 1-Lektin) von *Pseudomonas aeruginosa* und zweitens das Lysostaphin von *Staphylococcus stapholyticus* zum Einsatz. Bei beiden Präparaten wurde in der Weiterverarbeitung ähnlich wie beim α -Toxin verfahren.

Im Falle des PA-1L wurden zu 1 mg Trockensubstanz 1.000 µl NaCl hinzugefügt und in 1,7-ml-Tuben wie oben zu je 100 µl verteilt und eingefroren. Für den Gebrauch kamen zu diesen 100-ml-Aliquots noch zusätzlich 900 µl NaCl. Eingesetzt wurde Lektin in drei aufsteigenden Konzentrationen (1 / 2 / 4 µg/ml).

Lysostaphin, das synonym auch als Glycyl-glycine Endopeptidase bezeichnet wird, gehört zur Gruppe der Enzyme. Bekannt ist es vor allem durch seine lytische Aktivität gegenüber den Staphylokokken-Spezies, inklusive dem *Staphylococcus aureus*. Bereitet wurde das Enzym durch Hinzutun von 2 ml NaCl zu 2 mg Toxintrockensubstanz. Ansonsten verliefen die weiteren Prozederes wie beim Lektin. Lysostaphin wurde in den Versuchen in drei Konzentrationen (2 / 5 / 10 µg/ml) verwendet.

Als drittes in der Plättchenforschung unbekanntes Toxin kam das Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* in Anwendung. Durch Verdünnen konnten drei Konzentrationen (0,5 / 5 / 50 µg/ml) hergestellt und für die Pipettierung des PRP genommen werden.

In Bezug auf das letzte Toxin, die Lipopolysaccharide (LPS) vom Escherichia-coli-Bakterium (O127:B8), ist festzustellen, dass es – entgegen den Erkenntnissen aus anderen Studien– nicht den Erwartungen an seine (aktivierende) Wirkung auf die Plättchen entsprach. Nach Auflösen des Toxins (100 mg) in 10 ml Wasser wurde es in 10 Röhrchen zu je 10.000 µg/ml gefüllt. Anschließend konnte es durch erneute Verdünnung (1.000 µg/ml) mit 9 ml Wasser zur Pipettierung des PRP verwendet werden. Als Konzentrationen wurden aufsteigend 10, 50, 100, 300, 500 µg/ml getestet. Da sich dabei kein Effekt einstellte, wurden auch höhere Konzentrationen bis zu 25.000 µg/ml eingesetzt und versuchsweise mit ADP zusammengebracht. Zudem wurde versucht, durch unterschiedlich lange Vorinkubation von bis zu 60 Minuten eine Wirkung zu erzielen.

e) Zur Berechnung der in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen der Medikamente wurde von einem normgewichtigen Menschen mit 70 kg ausgegangen. Bekannt war zudem, in welcher Dosis pro Kilogramm Körpergewicht die diversen Medikamente in der Klinik an die Patienten verabreicht werden. Auch wurde angenommen, dass 1 kg 70 ml Blut enthält, sodass sich die einzelnen Konzentrationen der jeweiligen medikamentösen Substanzen körperlsgewichtsadaptiert berechnen ließen.

Wie oben beschrieben wurde zunächst der Effekt auf die ADP- und kollageninduzierte Plättchenaggregation untersucht. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse folgten Untersuchungen mit dem von Staphylokokken erzeugten α -Toxin hinsichtlich seines Einflusses auf den proaggregatorischen Effekt auf die Thrombozyten.

Darauf aufbauend wurden schließlich weitere Experimente unternommen, in denen dem ADP, dem Kollagen und dem α -Toxin medikamentöse Substanzen hinzugefügt wurden, die in der Literatur mit Thrombozyten in Zusammenhang gebracht werden. Diese Medikamente kamen der Reihe nach mit folgenden Konzentrationen zum Einsatz:

- Eptifibatid
 - mit α -Toxin: 0,5, 2, 10 µg/ml
 - mit ADP/Kollagen: 0,005, 0,05, 0,25, 0,5, 10 µg/ml
- Abciximab
 - mit α -Toxin: 1, 2, 5 µg/ml
 - mit ADP: 1, 2, 2,5, 4, 5 µg/ml
 - mit Kollagen: 0,5, 1, 2, 2,5, 4, 5 µg/ml
- Levosimendan
 - bei allen Aggregatoren: 2,5, 25, 250 µg/ml

- PGI₂-Analogon
 - mit α -Toxin : 0,000001, 0,00005, 0,0001, 0,0005, 1 $\mu\text{g/ml}$
 - mit ADP: 0,00005, 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,1 $\mu\text{g/ml}$
 - mit Kollagen: 0,0001, 0,0005, 0,001, 0,01, 1 $\mu\text{g/ml}$

Die einzelnen Konzentrationen der Substanzen wurden durch jeweilige Verdünnung der Stammlösung mit NaCl oder Wasser gewonnen. Im Falle des Levosimendan wurde zunächst die Stammsubstanz mit Ethanol verdünnt, wobei sich kein Effekt einstellte. Ethanol (24 μl / 0,018g; 72 μl / 0,054g), isoliert dem PRP gegeben, führte auch zu keiner Reaktion der Plättchen im Aggregometer. Deshalb wurde Levosimendan – erfolgreich – mit Wasser verdünnt.

4.1.4 Berechnung der Effektiven und der Inhibitorischen Konzentration bei 50 % (EC₅₀ / IC₅₀)

Definitionsgemäß ist EC₅₀ (EC = Effektive Konzentration) die Konzentration, bei der 50 % der Wirkung erzielt wird. Im Gegensatz dazu ist IC₅₀ (IC = Inhibitorische Konzentration) jene Konzentration, bei der 50 % der Wirkung aufgehoben wird. Effektive und Inhibitorische Konzentration werden ermittelt, um die Wirksamkeit der jeweiligen Substanz zu überprüfen und vergleichbar zu machen.

4.2 Aggregometrie

4.2.1 Messprinzip

Erstmals wurde die photometrisch verfahrenende Messmethode, mit der sich die Thrombozytenaggregation fortan quantitativ bestimmen ließ, 1962 durch Born beschrieben (Born, 1962). Dabei werden Zellsuspensionen, in unserem Fall das plättchenreiche Plasma, turbidimetrisch bestimmt. PRP wird bei 37 °C unter ständiger Bewegung mittels eines Magnetrührers (konstant 1.000 U/min) zur Aggregation gebracht. Das in der Mikroküvette enthaltene Plasma ist dabei zwischen Lichtquelle und Lichtdetektor in einem Messkanal platziert. Der Trübungsgrad im PRP ist, wegen der Plättchen, hoch und also die Lichtdurchlässigkeit äußerst gering. Andererseits lässt das plättchenarme Plasma (beinahe) ungehindert Licht durch, sodass die

Lichttransmission sehr hoch liegt. Die prozentuale Lichtdurchlässigkeit gilt deshalb als Maß für die Aggregation.

Das Ausmaß der Plättchenaggregation ist durch die optische Dichte des PPP genau definiert; es liefert zur Eichung die 0%-Referenz, während der Anfangswert des PRP den 100%-Wert ausmacht. Wenn nun dem PRP verschiedene Aggreganzien hinzugefügt werden, kommt es zum „Verbrauch“ der Thrombozyten durch Mikrothrombenbildung, sodass der Grad der Trübung abnimmt und die Lichtdurchlässigkeit erhöht wird. Dieser Vorgang wird, nach Weiterleitung der Messdaten an einen Computer, in einer Aggregationskurve dargestellt.

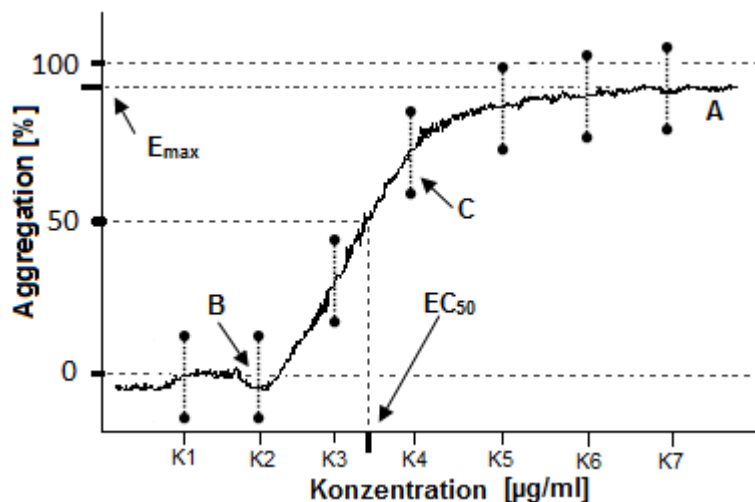


Abbildung 11: Graphische Darstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve (A). In Kurve A wurde der Zeitpunkt des *shape change* beschriftet (B = K2). Die Konzentration, bei der 50% der Wirkung erzielt wird, kann aus der Kurve ermittelt werden und wird als effektive Konzentration bezeichnet (EC₅₀). Zudem Darstellung der Vertrauensbereiche durch Ermittlung der Konfidenzintervalle (C), innerhalb derer zu 95% der Werte liegen. E_{max} Maximale Aggregation in Prozent, K1 - K7 Einzelne Konzentrationen.

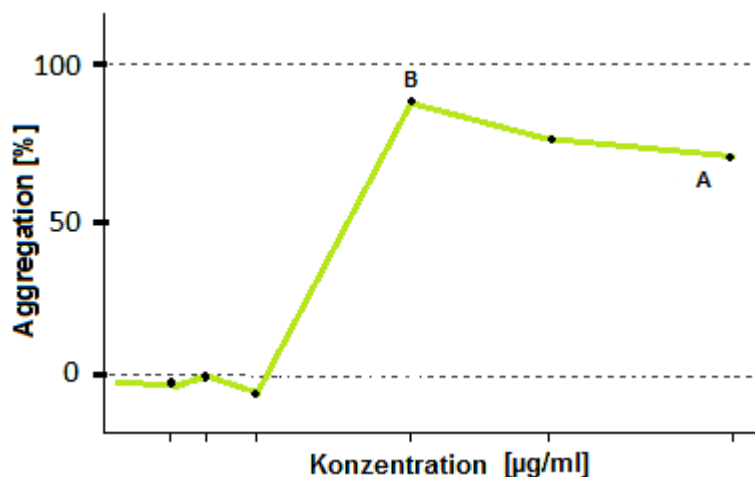


Abbildung 12: Graphische Darstellung des *slope* als Anstieg des Aggregationsverlaufs in % pro Zeiteinheit (A). Hier zeigt sich der Anstieg im mittleren Konzentrationsbereich des Wirkstoffs x mit einem maximalen %-Wert (B), um dann wieder prozentual gesehen abzusinken.

4.2.2 Durchführung

Zur Messung der Plättchenaggregation wurde das Aggregometer APACT 4 mit vier Messkanälen verwendet.

Nach Pipettierung der Mikroküvetten mit 200 µl PRP, wurden sie in dem dafür vorgesehenen Thermoblock bei 37,4° C aufbewahrt. Er ist im Aggregometer integriert und verhindert eine sekundäre Aktivierung der Thrombozyten durch Kälte. Die noch verbliebenen Küvetten lagerten bei Raumtemperatur und wurden als erste verbraucht. Der Eichung folgend, konnte nun das PRP in den 4 Geräteoptikkanälen gleichzeitig zur Reaktion gebracht werden.

Zu Beginn der *in-vitro*-Versuche wurde die Wirksamkeit der beiden Aggregatoren ADP und Kollagen an den Thrombozyten überprüft. Im weiteren Verlauf folgten Versuchsserien mit den Medikamenten Eptifibatid, Abciximab, Levosimendan sowie einem Prostazyklin-Analogen. Da zu Beginn die aggregatorische Wirksamkeit von ADP und Kollagen bestätigt worden war, konnten nun der Reihe nach die einzelnen Medikamente an den ADP- und kollagenstimulierten Blutplättchen getestet werden. Unter einigen schon in der Klinik eingesetzten Thrombozyteninhibitoren wurde auch eine Versuchsreihe mit Levosimendan, zu dem es hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf die Thrombozyten und auf das Gerinnungsgeschehen nur lückenhaft Studien gibt, durchgeführt.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe mit einem neuen, unbekannten Toxin erfolgte zunächst immer eine Testung, bei der dem PRP das Toxin isoliert hinzugefügt wurde. Dadurch konnte herausgefunden werden, ob das Toxin – wie im Fall des α -Toxins – einen möglichen proaggregatorischen Effekt auf die Thrombozytenaggregation zeigt. Da diese stimulierende Wirkung des α -Toxins bekannt war und in der vorliegenden Arbeit noch einmal bestätigt wurde, wurden nach einer Vorinkubation von 20 Sekunden mit dem Toxin die vorher mit ADP und Kollagen getesteten Medikamente hinzugefügt.

4.2.3 Standardisierung der Versuchsmethode

Um schließlich eine Komparabilität der Ergebnisse zu erreichen, wurde versucht, standardisiert zu arbeiten: durch routinierten Ablauf der Blutabnahme, Methoden der Pipettierung des PRP, Verwendung nur der angegebenen Messgeräte sowie vor allem der genau festgelegten Konzentrationsschemata in der Verwendung der Aggregationsinduktoren und Inhibitoren. Vereinfacht wurde die Standardisierung durch den Gebrauch von lyophilisierten Substanzen, die bei Bedarf in Wasser oder in

beigefügter Lösung aufgelöst wurden. Besonders zu beachten war die Haltbarkeit der diversen Substanzen. Im Fall des Levosimendan musste gemäß Beipackzettel nach Gebrauch auf einen schnellen Verbrauch geachtet werden. Chemische und physikalische Stabilität wurden dennoch für 24 Stunden bei 2 bis 8 °C zugesichert und bei der Aufbereitung unter Laborbedingungen noch länger, sodass erst nach zwei Versuchstagen ein jeweils neues Medikamentenfläschchen geöffnet werden musste. Da, wie oben erwähnt, in den Mikroküvetten ein magnetisch rotierender Rührer liegt, erfolgte vor Versuchsbeginn ein Check-up aller Küvetten, um keine Differenzen in den Ergebnissen zu provozieren. Allerdings wurden im Versuchsablauf die Thrombozyten nicht (durch die in der Literatur beschriebenen Verdünnung mittels PPP und Zählung der Thrombozyten) auf eine konstante Zahl von 200 bis 250/nl eingestellt, da dies mitunter als eine Fehlerquelle gelten könnte (Budde, 2002). Um keine Verunreinigungen über die Mikropipetten in die Messküvetten zu bringen, wurden erstere nach jedem Gebrauch gespült, und zwar zunächst in zwei mit 96-prozentigem Ethanol gefüllten 10-ml-Glasbechern, dann in NaCl[-0,9%-Lösung].

4.3 Statistische Methoden und Datenauswertung

Alle Daten aus den *in-vitro*-Versuchen werden als Mittelwerte $\pm$ Konfidenzintervall angegeben. Zur Ermittlung der Vertrauensbereiche für die vorliegenden Standardabweichungen wurden Konfidenzintervalle berechnet, innerhalb derer zu 95 % die Werte lagen. Die Daten wurden zunächst mit Microsoft Excel erfasst, statistisch ausgewertet und anschließend in das Programm Origin (Version 6.1) von OriginLab Coperation exportiert, das eine adäquate grafische Auswertung ermöglichte. Zur Vergleichbarkeit wurden außerdem die Maximalwerte, die in den höchsten Konzentrationen bei ADP, Kollagen und α -Toxin erreicht wurden, als 100-prozentige Aggregation definiert. Die restlichen Ergebnisse wurden zu diesen Werten in Relation gesetzt und in entsprechenden Prozentualwerten angegeben.

5.1 Aktivierende Effekte auf die Thrombozytenaggregation

5.1.1 Aggregationsuntersuchungen mit ADP und Kollagen

Zu Beginn der *in-vitro*-Versuche wurden ADP (n = 36) und Kollagen (n = 17) hinsichtlich ihrer thrombozytenstimulierenden Eigenschaft untersucht, um sie im Weiteren für die Induzierung der Plättchenaggregation einsetzen zu können. Beide Stimulatoren wurden gewählt, weil sie, wie in der Literatur schon oft beschrieben, über verschiedene Rezeptoren den Thrombozyten aktivierend beeinflussen. Aus den entstandenen Mittelwerten der verschiedenen Konzentrationen wurden Konzentrations-Wirkungskurven erzeugt (Abbildungen 10 und 11). Durch logarithmisches Auftragen der Konzentrationen auf der Achse entsteht eine sigmoide Kurve, deren Wendepunkt auf der Hälfte der durch die jeweilige Substanz erzielten Wirkung liegt. Dies wird wie schon beschrieben als Effektive Konzentration bezeichnet. Grafisch konnte die EC_{50} mit Standardabweichung für beide Substanzen ermittelt werden. Der Wert für EC_{50} für ADP beträgt $2,37 \pm 0,61 \mu M$ und für Kollagen $0,73 \pm 0,24 \mu g/ml$.

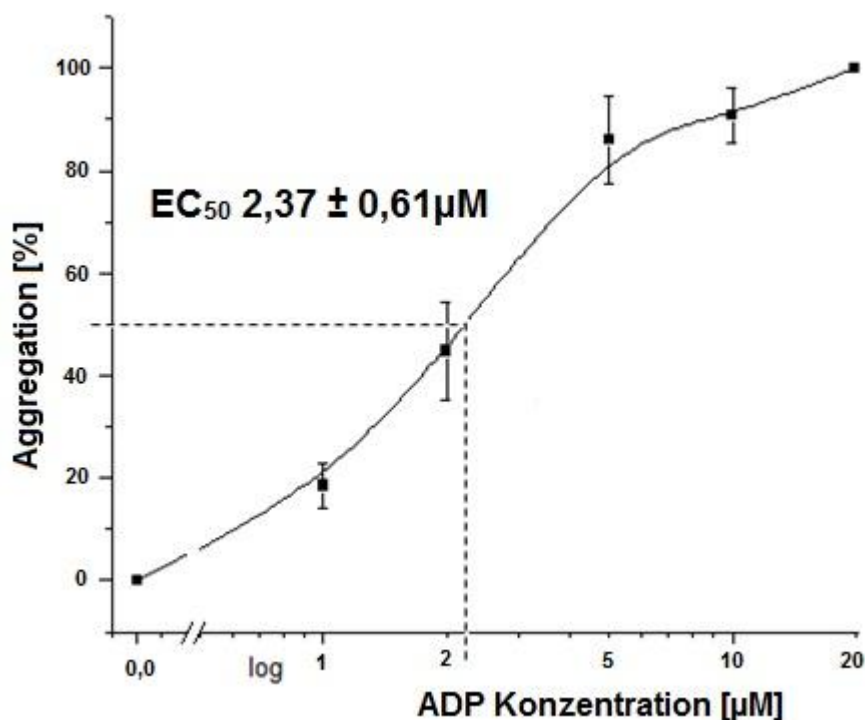


Abbildung 13: Konzentrationsabhängige Zunahme der Lichtdurchlässigkeit durch ADP. Durch Hinzufügen von ADP (1 / 2 / 5 / 10 / 20 μM) zum PRP kommt es zur Abnahme des Trübungsgrades bzw. zur Zunahme der Lichttransmission, was ein Maß für die Thrombozytenaggregation ist. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Konfidenzintervall. EC_{50} beträgt $2,37 \pm 0,61 \mu M$. n = 36

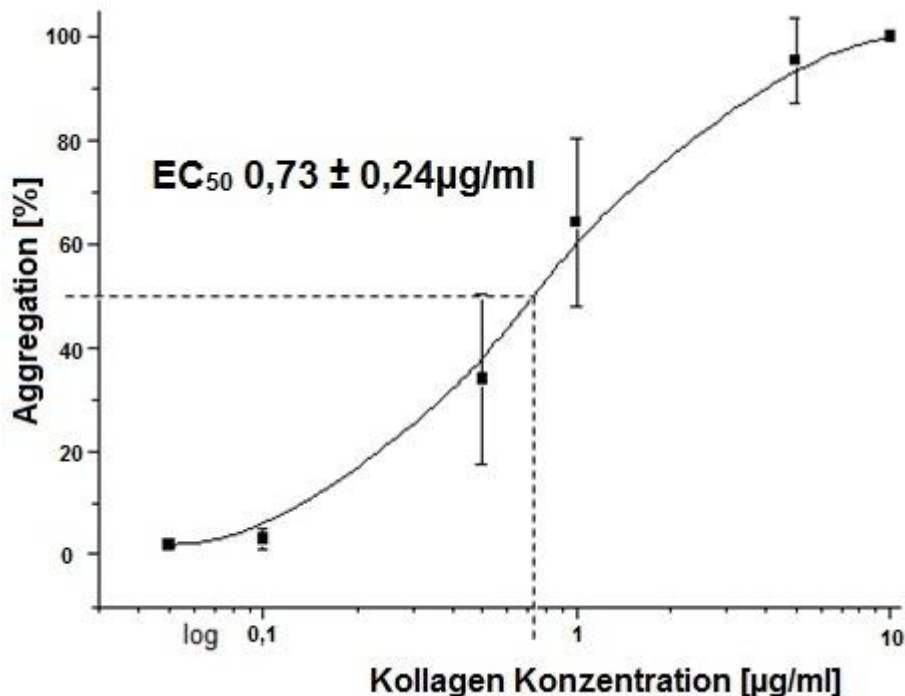


Abbildung 14: Konzentrationsabhängige Zunahme der Lichtdurchlässigkeit durch Kollagen. Durch Hinzufügen von Kollagen (0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 µg/ml) zum PRP kommt es zur Abnahme des Trübungsgrades bzw. zur Zunahme der Lichttransmission, was ein Maß für die Thrombozytenaggregation ist. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Konfidenzintervall. EC_{50} beträgt $0,73 \pm 0,24$ µg/ml. $n = 17$

5.1.2 Stimulation der Thrombozyten mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin

Das durch *Staphylococcus aureus* produzierte α -Toxin kann direkt zu einer Plättchenaggregation führen, was beim Krankheitsbild der Sepsis die dissiminierte intravasale Gerinnung mit Bildung von Mikrothromben verstärkt.

Eingesetzt wurde α -Toxin in den Konzentrationen 0,5, 1, 3, 5 und 10 µg/ml. Wie in den Konzentration-Wirkungskurven von ADP und Kollagen durch logarithmisches Auftragen der Werte ersichtlich wurde, entsteht auch bei α -Toxin eine Kurve mit sigmoidalem Verlauf. So kann im Wendepunkt ebenfalls eine Effektive Konzentration abgelesen werden. Sie beträgt $3,24 \pm 0,64$ µg/ml.

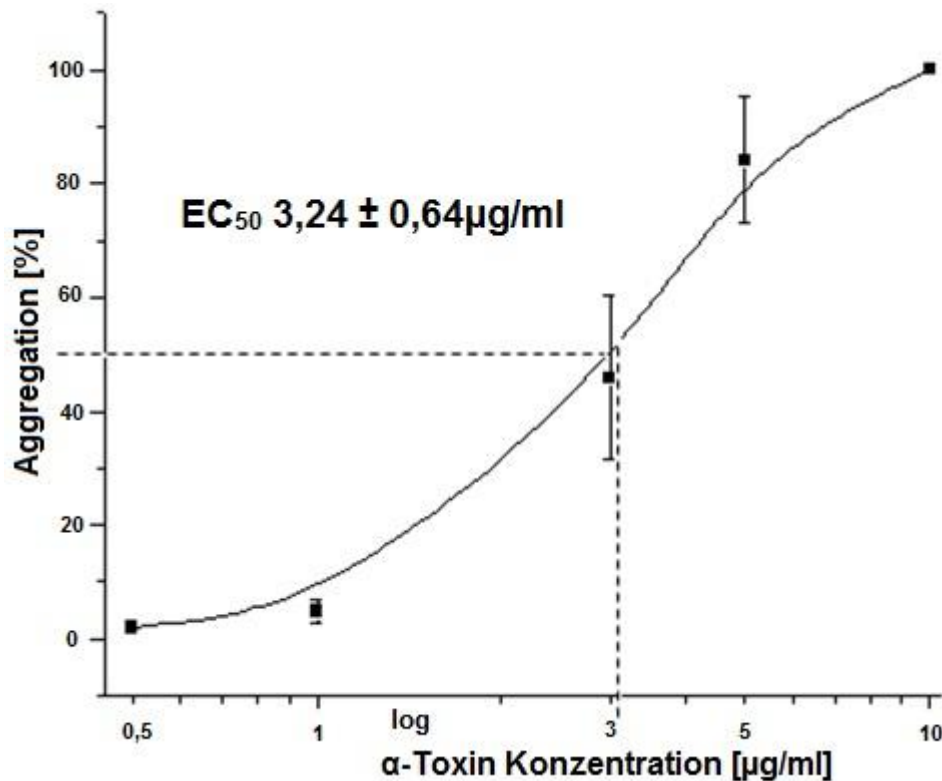


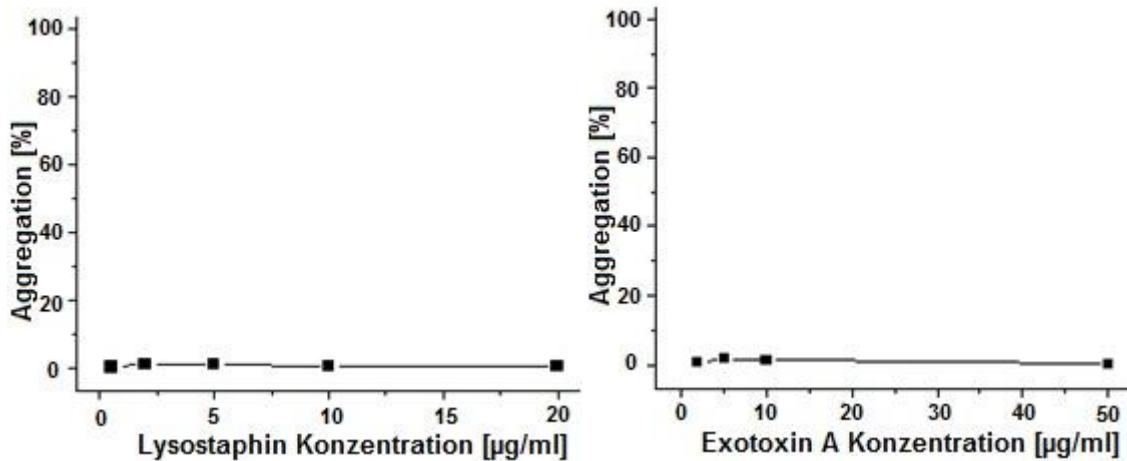
Abbildung 15: Konzentrationsabhängige Zunahme der Lichtdurchlässigkeit durch α -Toxin. Durch Hinzufügen von α -Toxin zum PRP kommt es zur Abnahme des Trübungsgrades bzw. zur Zunahme der Lichttransmission, was ein Maß für die Thrombozytenaggregation ist. α -Toxin wurde in verschiedenen Konzentrationen (0,5 / 1 / 3 / 5 / 10 $\mu\text{g/ml}$) eingesetzt. Dargestellt wurden Mittelwerte $\pm$ Konfidenzintervall. EC_{50} beträgt $3,24 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$.

5.2 Weitere Testungen an Thrombozyten mittels der Aggregometrie

5.2.1 Aggregationsuntersuchungen mit Lysostaphin, Lektin und Exotoxin A

Initial wurde isoliert Exotoxin A, Lysostaphin oder Lektin zum PRP gegeben. Da bei $n = 5$ keine Reaktion zu beobachten war, wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

5. Ergebnisse



Abbildungen 16 (links) und 17 (rechts): PRP wurde isoliert mit Lysostaphin (0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 / 20 µg/ml) und Exotoxin A (2 / 5 / 10 / 50 µg/ml) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Eine Auslösung der Plättchenaggregation fand nicht statt. Jeweils n=5.

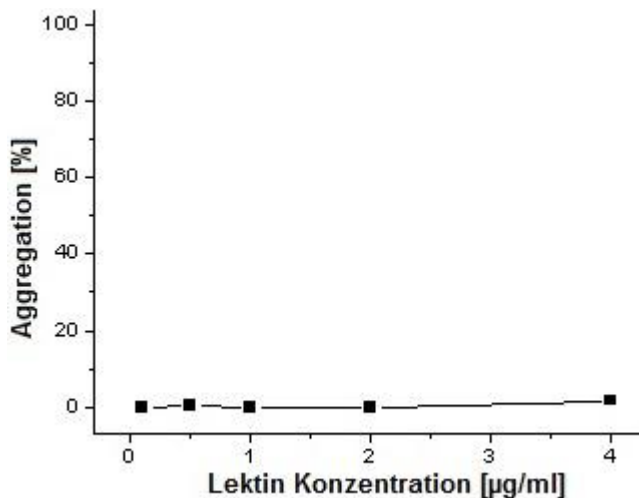


Abbildung 18: PRP wurde mit Lektin in verschiedenen Konzentrationen (0,1 / 0,5 / 1 / 2 / 4 µg/ml) inkubiert. Eine Auslösung der Plättchenaggregation fand nicht statt.

5.2.2 Untersuchungen mit Lipopolysacchariden von *E. coli* an Thrombozyten

LPS zeigten in den Untersuchungen keine signifikanten plättchenaggregierenden Eigenschaften im Konzentrationsbereich von 500 bis 2500 µg/ml. Auch eine Veränderung der Inkubationszeit der LPS mit PRP (an drei Punkten: 30 s, 3 min, 60 min) brachte nicht den erwünschten Erfolg. Auch bei einer LPS-Konzentration bis zu 1500 µg/ml waren keine inhibierenden Effekte mit auf die ADP-induzierte Aggregation zu erkennen. Nachdem sich der Null-Effekt bei n=5 bestätigt hatte, wurden keine weitergehenden Untersuchungen mit LPS verfolgt.

Auch in der Literatur finden sich keine Berichte, die im experimentellen Ansatz mittels der Aggregometrie das Gegenteil nachgewiesen hätten. Allerdings zeigt sich in dem Verfahren der Durchflusszytometrie ein neuer Ansatz zur Untersuchung der LPS, in der Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch an das zu untersuchende Molekül angedockt werden. Die sogenannten FACS-Analysen zeigen dabei, dass LPS am Thrombozyten über eine GP-IIb/IIIa-Aktivierung wirkt (Stahl et al., 2006).

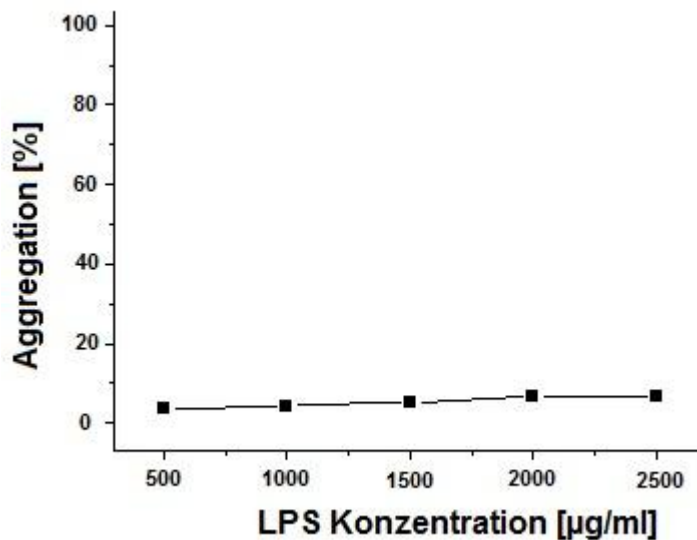


Abbildung 19: Das PRP wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen (500 / 1000 / 1500 / 2000 / 2500 µg/ml) der Lipopolysaccharide des E.coli inkubiert. Eine Auslösung der Plättchenaggregation fand nicht statt bzw. lag unter der Wirkung von 10%.

5.3 Hemmende Effekte auf die induzierte Thrombozytenaggregation

5.3.1 Testung verschiedener Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Plättchenaggregation

Medikamente spielen in der Prophylaxe und Therapie von thrombotischen Ereignissen eine große Rolle. Um zu erforschen, ob die für die *in-vitro*-Versuche gewählten Medikamente Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben, wurden sie den Plättchenaktivatoren ADP und Kollagen hinzugefügt. Es wurden in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt: Iloprost (Ventavis®), Eptifibatid (Integrilin®), Abciximab

5. Ergebnisse

(Reo Pro[®]) und Levosimendan (Simdax[®]). Diese fünf Substanzen entstammen diversen Arzneimittelgruppen, wobei Eptifibatid und Abciximab beide zur Klasse der GP-IIb/IIIa-Antagonisten gehören, aber den Rezeptor durch ihren unterschiedlichen Aufbau an verschiedenen Stellen binden bzw. blockieren.

Um Konzentration-Wirkungskurven zu erzeugen, wurden von den einzelnen Substanzen mehrere Konzentrationen gewählt. Von den Thrombozytenstimulanzien kam die submaximale Konzentration zum Einsatz, welche bei ADP bei 10 µM/ml und bei Kollagen bei 5 µg/ml liegt. Alle getesteten Substanzen hemmten die ADP- und kollageninduzierte Thrombozytenaggregation in einem konzentrationsabhängigen Muster. In den folgenden zehn Grafiken sind die Resultate dargestellt.

a) Iloprost (Prostazyklin- Analogon; Ventavis[®])

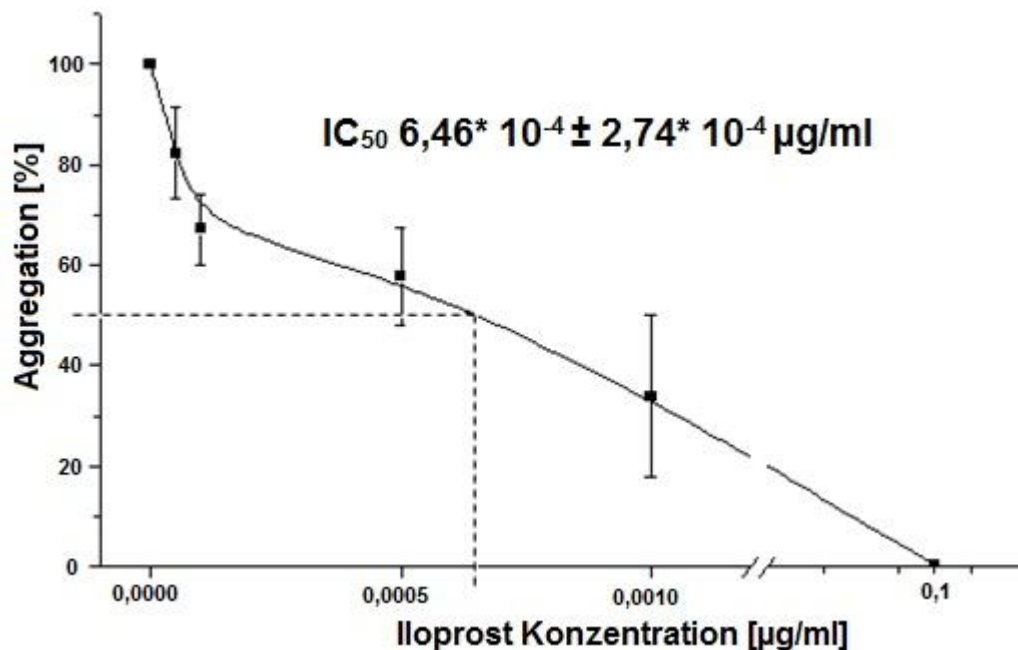


Abbildung 20: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Iloprost. PRP wurde mit Iloprost in verschiedenen Konzentrationen (0,00005 / 0,0001 / 0,0005 / 0,001 / 0,1 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC₅₀ liegt bei $6,46 \cdot 10^{-4} \pm 2,74 \cdot 10^{-4}$ µg/ml.

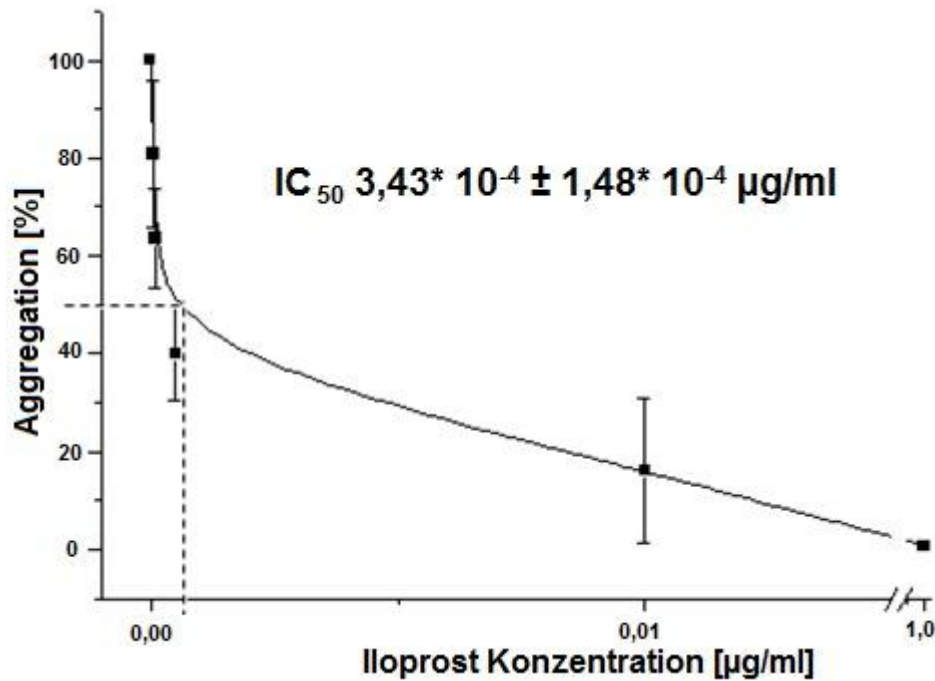


Abbildung 21: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Iloprost. PRP wurde mit Iloprost in verschiedenen Konzentrationen (0,0001 / 0,0005 / 0,001 / 0,01 / 1 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von Kollagen induziert. IC_{50} liegt bei $3,43 \cdot 10^{-4} \pm 1,48 \cdot 10^{-4}$ µg/ml.

b) Abciximab (Reo Pro®)

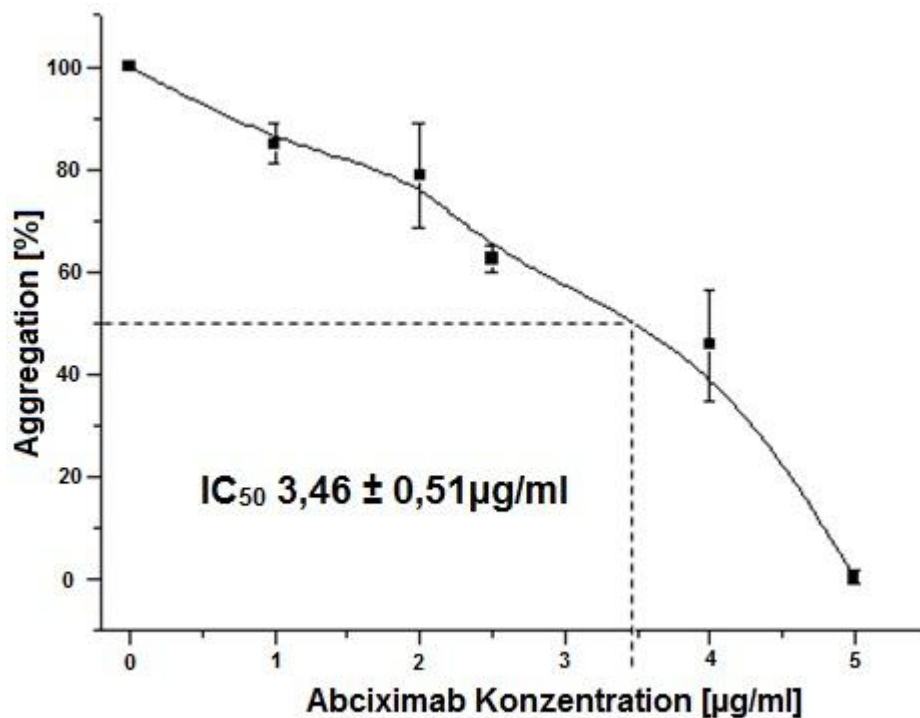


Abbildung 22: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Abciximab. PRP wurde mit Abciximab in verschiedenen Konzentrationen (1 / 2 / 2,5 / 4 / 5 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC_{50} liegt bei $3,46 \pm 0,51$ µg/ml.

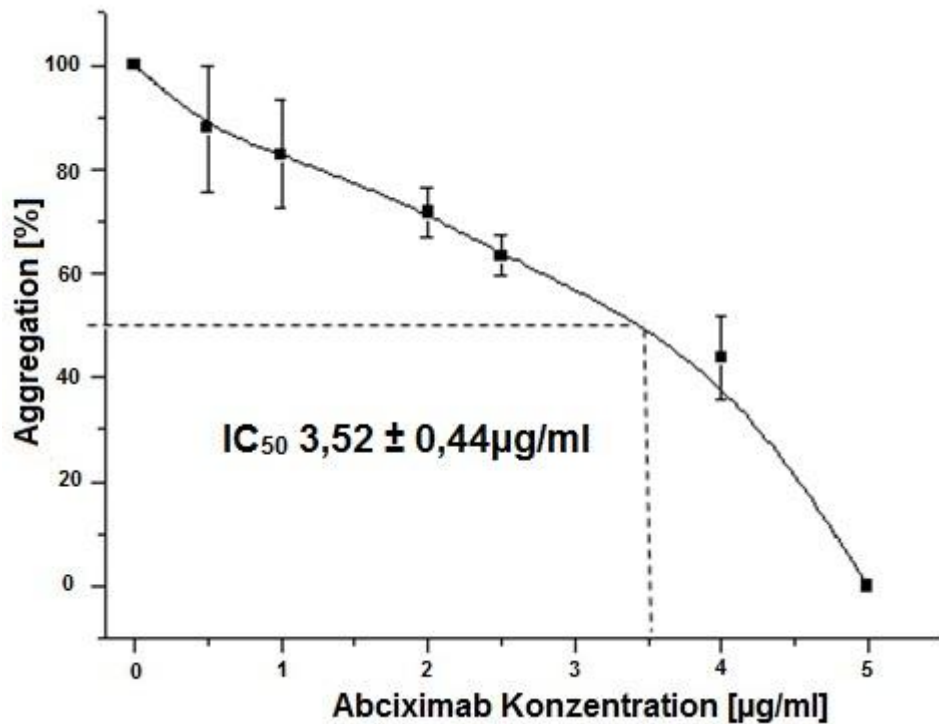


Abbildung 23: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Abciximab. PRP wurde mit Abciximab in verschiedenen Konzentrationen (0,5 / 1 / 2 / 2,5 / 4 / 5 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von Kollagen induziert. IC_{50} liegt bei $3,52 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$.

c) Eptifibatid (Integrilin®)

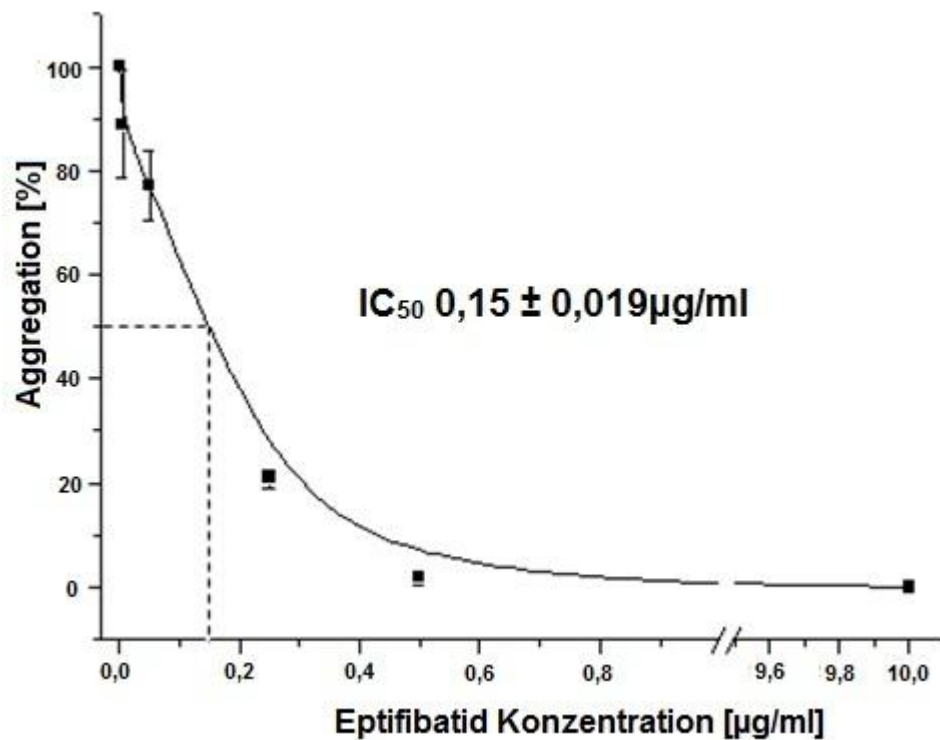


Abbildung 24: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Eptifibatid. PRP wurde mit Eptifibatid in verschiedenen Konzentrationen (0,005 / 0,05 / 0,25 / 0,5 / 10 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC_{50} liegt bei $0,15 \pm 0,019 \mu\text{g/ml}$.

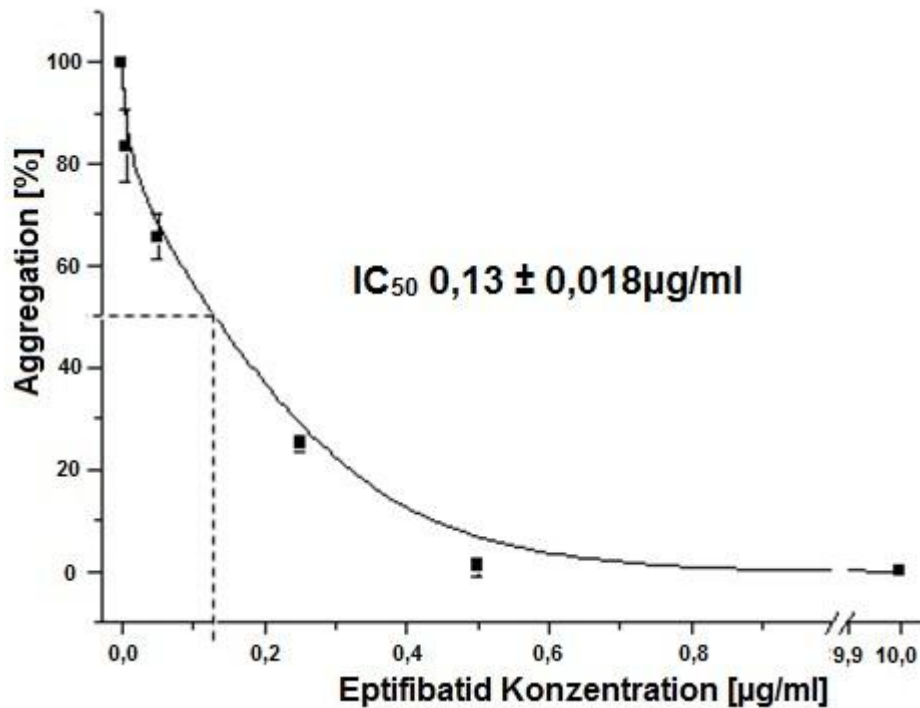


Abbildung 25: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Eptifibatid. PRP wurde mit Eptifibatid in verschiedenen Konzentrationen (0,005 / 0,05 / 0,25 / 0,5 / 10 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von Kollagen induziert. IC_{50} liegt bei $0,13 \pm 0,018 \mu\text{g/ml}$.

d) Levosimendan (Simdax®)

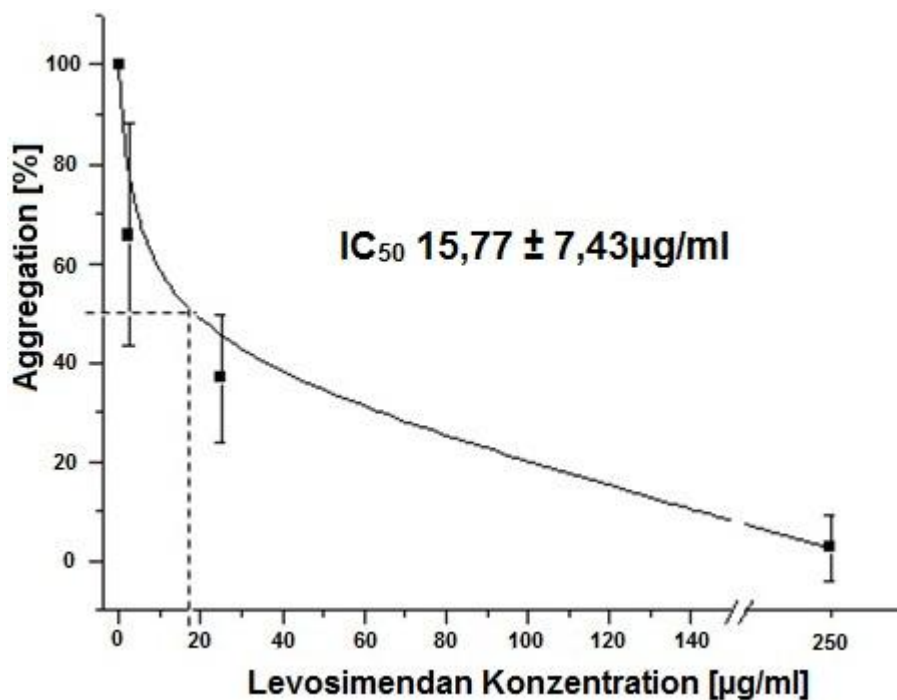


Abbildung 26: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Levosimendan. PRP wurde mit Levosimendan in verschiedenen Konzentrationen (2,5 / 25 / 250 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC_{50} liegt bei $15,77 \pm 7,43 \mu\text{g/ml}$.

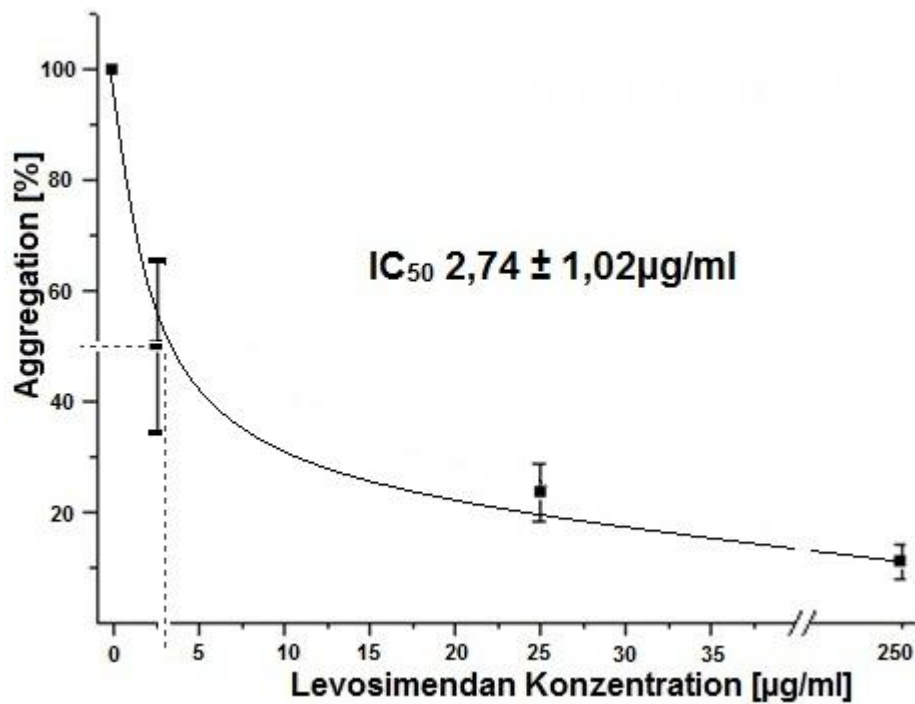


Abbildung 27: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Levosimendan. PRP wurde mit Levosimendan in verschiedenen Konzentrationen (2,5 / 25 / 250 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von Kollagen induziert. IC_{50} liegt bei $2,74 \pm 1,02 \mu\text{g/ml}$.

5.3.2 Inhibierende Auswirkungen von Medikamenten auf die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation

Nachdem in den Voruntersuchungen die inhibitorische Wirksamkeit diverser Medikamente auf die durch ADP und kollagen-induzierte Plättchenaggregation aufgezeigt werden konnte, ist der Versuch gemacht worden, mit eben diesen Medikamenten die α -Toxin-Wirkung zu beeinflussen. Dabei wurden die in den vorherigen Versuchen wirksamen Konzentrationen erneut angewendet. Wie bei den Plättchenstimulatoren kam auch beim α -Toxin die submaximale Konzentration von 5 µg/ml zum Einsatz.

a) **Abciximab (Reo Pro®)**

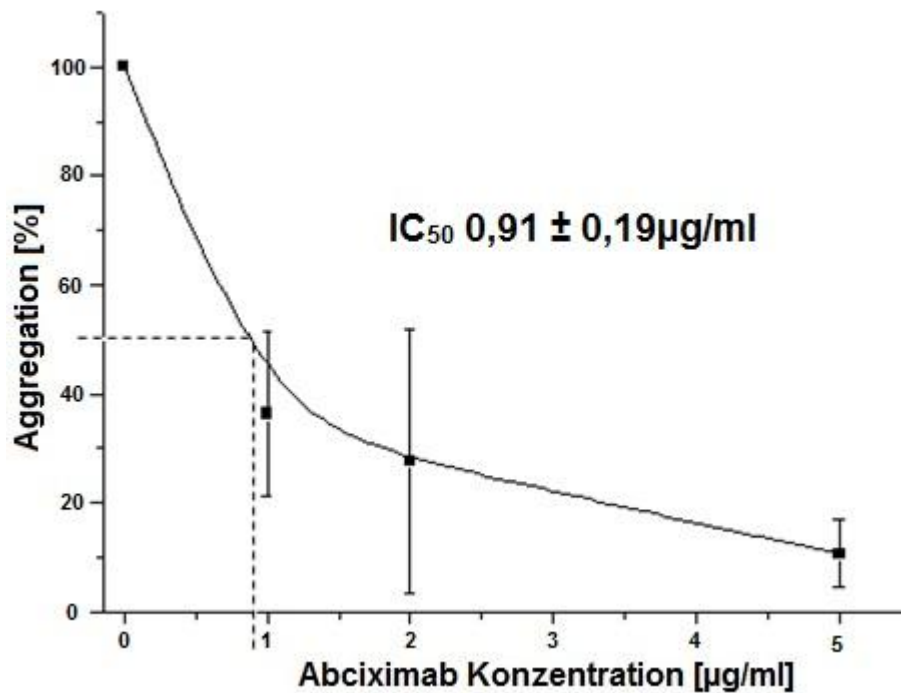


Abbildung 28: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Abciximab. PRP wurde mit Abciximab in verschiedenen Konzentrationen (1 / 2 / 5 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von α -Toxin induziert. IC_{50} liegt bei $0,91 \pm 0,19$ µg/ml.

b) **Eptifibatid (Integrilin®)**

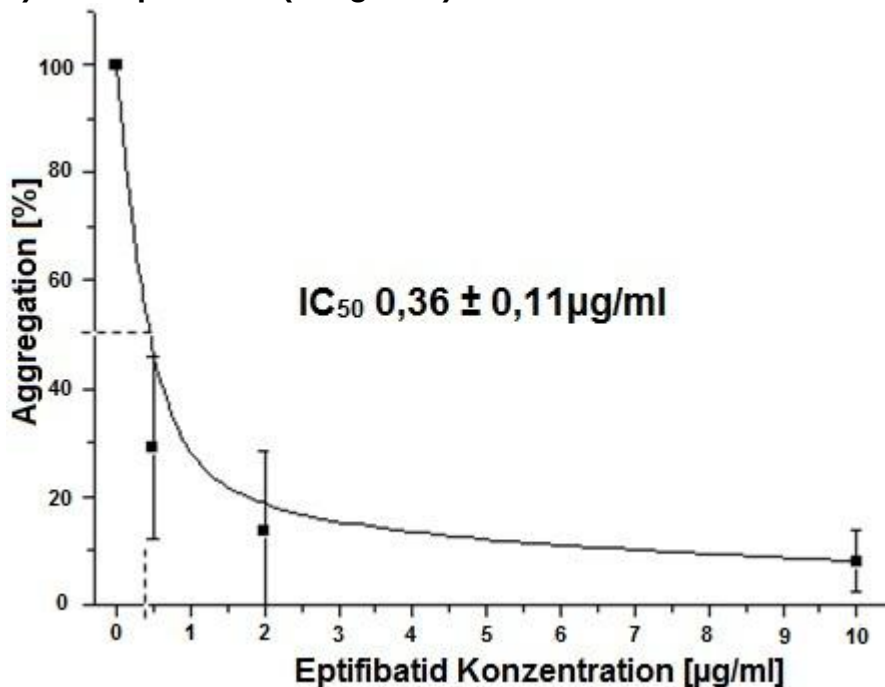


Abbildung 29: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Eptifibatid. PRP wurde mit Eptifibatid in verschiedenen Konzentrationen (0,5 / 2 / 10 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von α -Toxin induziert. IC_{50} liegt bei $0,36 \pm 0,11$ µg/ml.

c) Iloprost (Prostazyklin- Analogon)

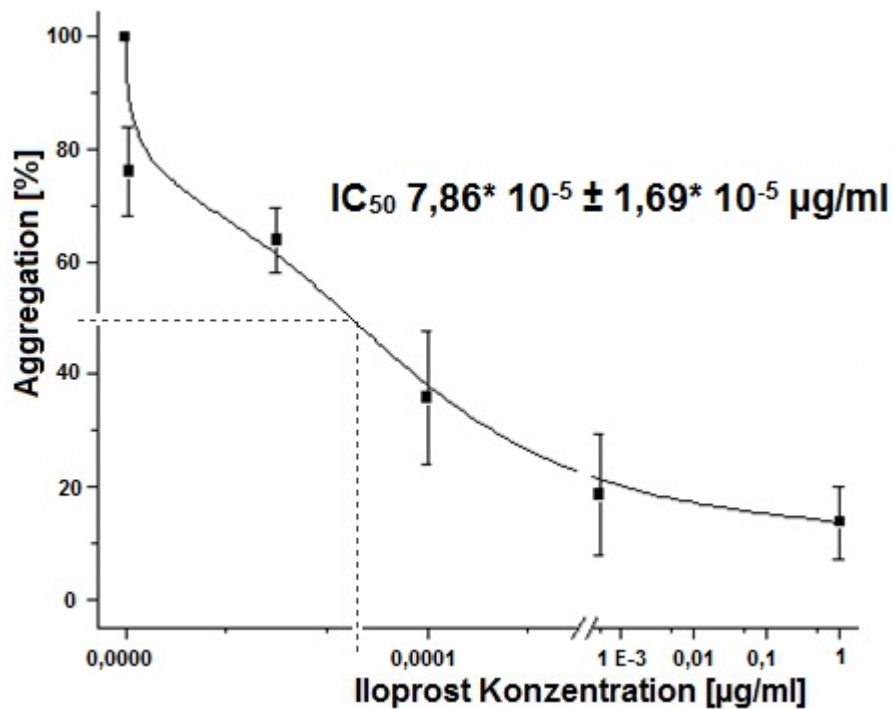


Abbildung 30: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Iloprost. PRP wurde mit Iloprost in verschiedenen Konzentrationen (0,000001 / 0,00005 / 0,0001 / 0,0005 / 1 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von α -Toxin induziert. IC₅₀ liegt bei $7,86 \cdot 10^{-5} \pm 1,69 \cdot 10^{-5} \mu\text{g/ml}$.

d) Levosimendan (Simdax)

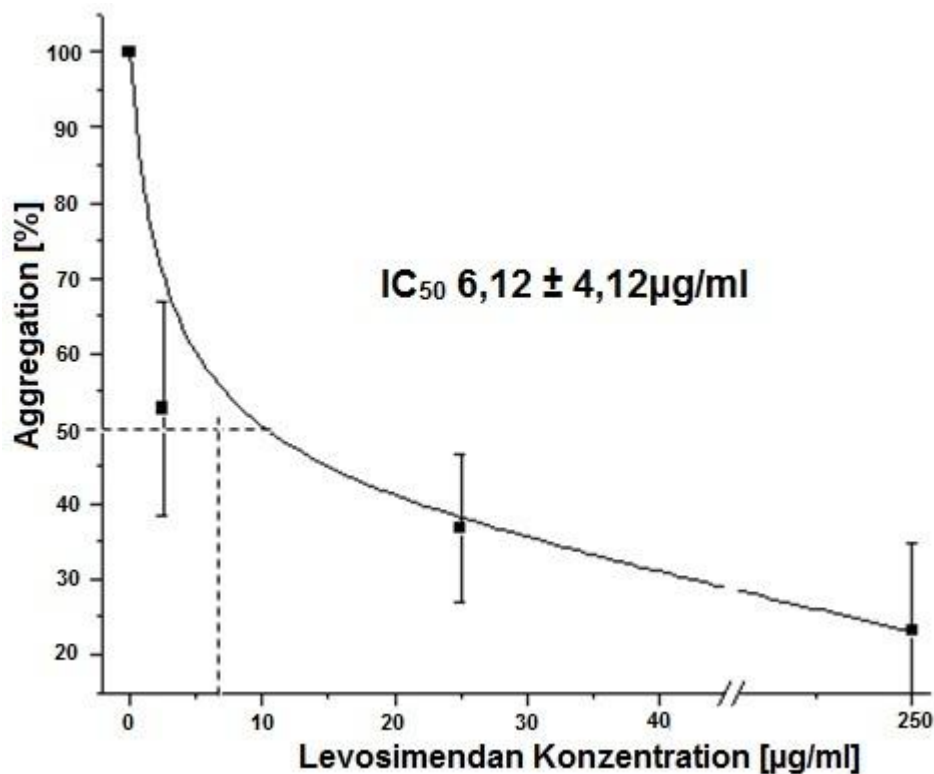


Abbildung 31: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Levosimendan. PRP wurde mit Levosimendan in verschiedenen Konzentrationen (2,5 / 25 / 250 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von α -Toxin induziert. IC₅₀ liegt bei $6,12 \pm 4,12 \mu\text{g/ml}$.

5.3.3 Hemmung der induzierten Plättchenaggregation durch Exotoxin A, Lysostaphin und Lektin

Zunächst wurde das PRP für mehrere Sekunden mit diversen Konzentrationen der einzelnen Toxine inkubiert. Anschließend wurde die Plättchenaggregation durch Hinzufügen von ADP (submaximale Konzentration: 10 μM) in Gang gesetzt, wobei die Lichtdurchlässigkeit (und damit das Maß der Aggregation) überraschend deutlich reduziert war. Folglich ist – wie in den angeführten Grafiken veranschaulicht – bei allen drei Toxinen eine Korrelation zwischen Plättcheninhibition und Toxinkonzentration mit je unterschiedlichem Schweregrad erkennbar. Entsprechend konnte die inhibitorische Konzentration jedes einzelnen Toxins bestimmt werden. Im Fall des Exotoxin A zeichnete sich zur Erhebung der Daten ein hoher Substanzverbrauch ab, sodass keine höheren Konzentrationen gewählt wurden.

a) Lysostaphin

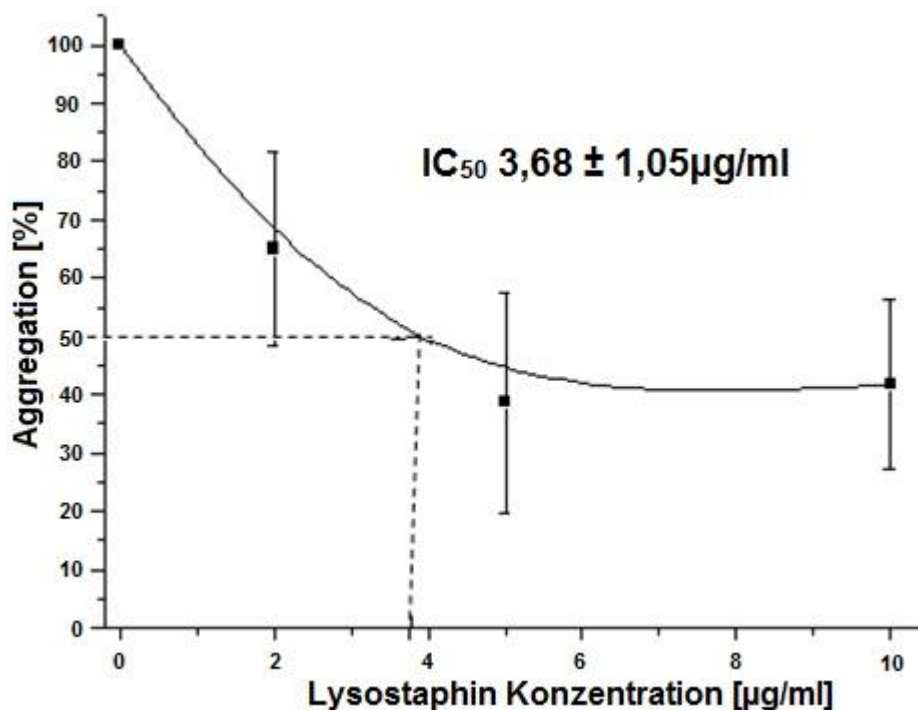


Abbildung 32: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Lysostaphin. PRP wurde mit Lysostaphin in verschiedenen Konzentrationen (2 / 5 / 10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC_{50} liegt bei $3,68 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$.

b) Lektin (LecA)

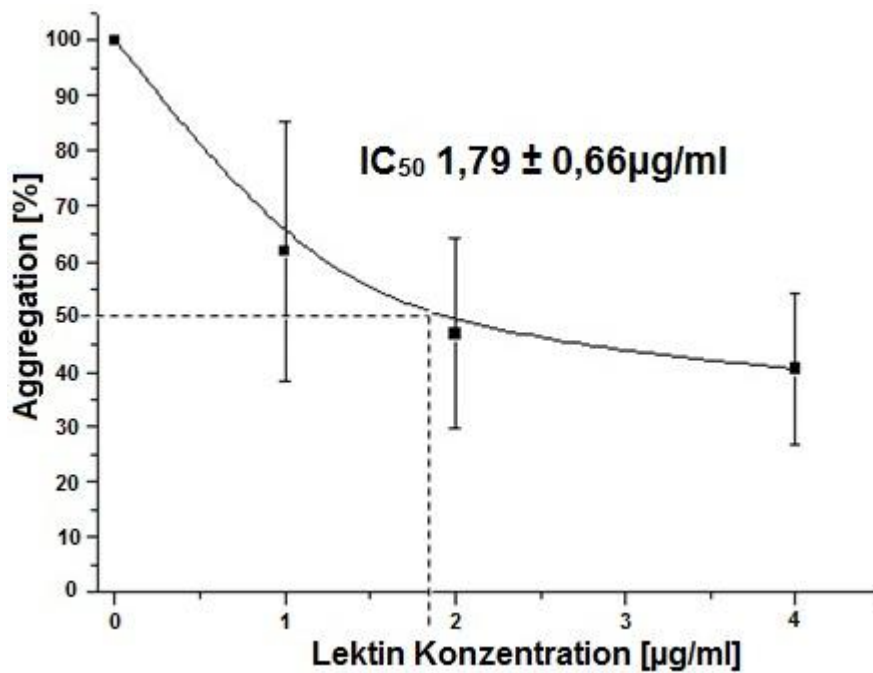


Abbildung 33: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Lektin (LecA). PRP wurde mit Lektin in verschiedenen Konzentrationen (1 / 2 / 4 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC₅₀ liegt bei 1,79 ± 0,66 µg/ml.

c) Exotoxin A

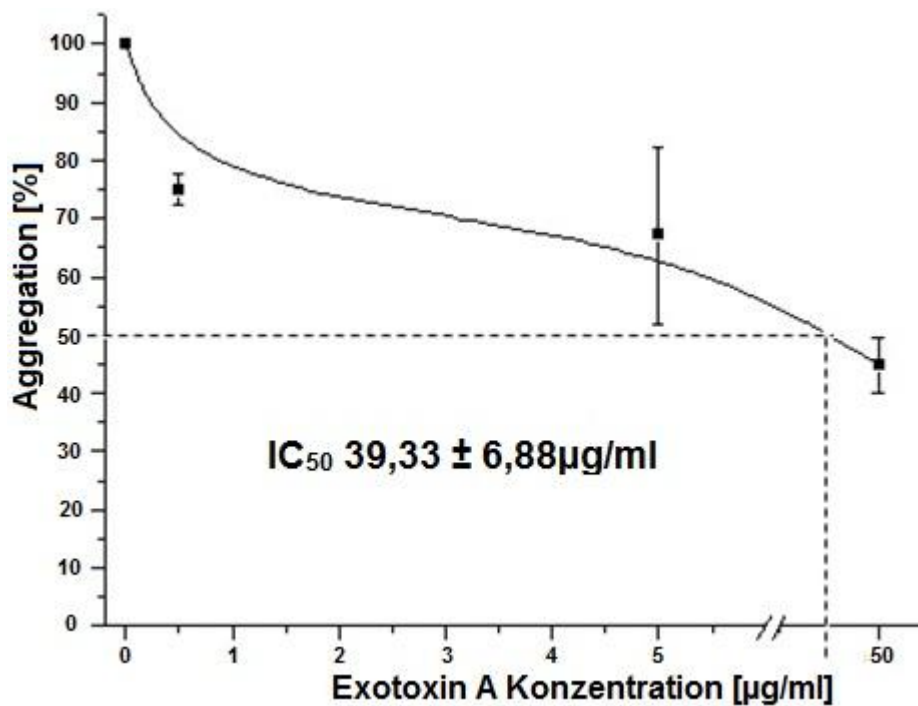


Abbildung 34: Konzentrationsabhängige Inhibition der Plättchenaggregation durch Exotoxin A. PRP wurde mit Exotoxin A in verschiedenen Konzentrationen (0,5 / 5 / 50 µg/ml) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Hinzufügen von ADP induziert. IC₅₀ liegt bei 39,33 ± 6,88 µg/ml.

6.1 Therapeutische Grundsätze in der Klinik

Grundsätzlich ist im Fall der Sepsis und auch der Endokarditis, infolge der meist auf bakterielle Reize entstehenden lokalen oder systemisch inflammatorischen Reaktion, als Hauptmaßnahme der Beginn einer antibiotischen Therapie indiziert. Hindernisse in der antibiotischen Therapie bestehen bekanntermaßen in dem Nichterkennen des Keims, in der Resistenzentwicklung sowie in der häufig schon stark vorangeschrittenen Mikrozirkulationsstörung mit Organdysfunktion. In einigen Fällen zeigt sich durch eine vor Beginn der antibiotischen Therapie vorgenommene Blutkultur ein Wachstum von zwei oder mehr Bakterien. Adjuvante therapeutische Optionen scheinen hier nötig zu sein (Nitsche-Schmitz et al., 2007), die den überschießenden inflammatorischen Prozess verhindern, sogar modulieren, aber nicht komplett unterdrücken. Denn bezüglich des letzteren Punkts liegt auf der Hand, dass im Fall eines entzündlichen Geschehens eine gewisse eigene Infektabwehr durchaus erwünscht ist.

6.2 Bedeutung der Thrombozyten in der Sepsis/ Endokarditis

Grundlage bildet die Tatsache, dass Inflammation und Gerinnungsaktivierung gemeinsam einhergehen. Im Krankheitsbild der Sepsis und Endokarditis kommt es zur Aktivierung der zellulären und plasmatischen Komponente des Hämostasesystems (Loew, Riess, 2005). Als sicher gilt, dass Thrombozyten in der Bildung von Mikrothromben bzw. im Falle der Endokarditis an der Bildung von Aggregaten am Endokard beteiligt sind (Kerrigan et al., 2008). Da dies eine pathogenetische Bedeutung besitzt, müssen Ansatzpunkte zur Therapie überlegt werden. Dabei bietet sich das Wissen über die Membranrezeptoren und das intrazelluläre Signalling der Blutplättchen an.

6.3. Antithrombozytäre Substanzen

Hierzu wurden in den letzten Jahrzehnten enorme Forschungsanstrengungen unternommen, wobei eine Reihe antithrombozytärer Substanzen entwickelt worden sind. Bezüglich ihrer spezifischen pharmakologischen Eigenschaften, den Thrombozyten zu inhibieren, lassen sich fünf Substanzklassen unterscheiden. Neben der Interaktion mit dem Arachidonsäuremetabolismus (COX- Hemmung, TxA₂-Synthese-Hemmung), der Erhöhung zyklischer Nukleotide (ACL- Aktivierung, Phosphodiesterasehemmung), der Interaktion mit Aktivierungsrezeptoren (Blockade des ADP-Rezeptors) sowie der Adhäsionsrezeptorblockade (Blockade des Kollagenrezeptors) spielt auch die Hemmung des Fibrinogenrezeptors (GP-IIb/IIIa-Antagonismus) eine Rolle (Gawaz, 1999).

6.4 Testung verschiedener Medikamente mit hemmender Wirkung auf die Plättchenaggregation

Abciximab und Eptifibatid gehören zur Gruppe der Fibrinogenrezeptorantagonisten, wohingegen Iloprost und wahrscheinlich Levosimendan jener Gruppe zuzurechnen sind, die eine Erhöhung der zyklischen Nukleotide bewirken (Glusa, 2000; Nieminen et al., 2005; Schwarz et al., 2006).

Zur Vorbereitung der Hauptuntersuchungen galt es, Ergebnisse durch in-vitro-Untersuchungen zu gewinnen. Nach Einwirkenlassen der oben genannten Medikamente auf die Kollagen- oder ADP-induzierte Plättchenaggregation, konnte der schon in der Vergangenheit gesicherte inhibitorische Effekt von Abciximab, Eptifibatid und Iloprost sowie der seltener beschriebene von Levosimendan bestätigt und im letzteren Fall nachgewiesen werden (Storey et al., 1998; Gryglewski, 2008; Kaptan et al., 2008). Auch die niedrigste Konzentration des jeweiligen Medikaments wie Levosimendan mit 2,5 µg/ml, Eptifibatid mit 0,005 µg/ml, Abciximab mit 1 µg/ml und Iloprost mit 0,00005 µg/ml weist diesen Effekt auf. Im Anschluss ließen sich die inhibitorischen Konzentrationen der einzelnen Medikamente berechnen, die bei 50 % die aggregatorische Wirkung des ADP oder Kollagen auf Thrombozyten aufheben. Die IC₅₀-Ergebnisse mit ADP und Kollagen unterschieden sich innerhalb der Experimente. Die eigene Datenlage wird hierzu im Folgenden tabellarisch dargestellt.

Tabelle 2: Vergleich der IC₅₀-Ergebnisse aus der eigenen Datenlage

Inhibitoren	Abciximab	Eptifibatid	Iloprost	Levosimendan
Aktivatoren				
ADP (10µM/ml)	IC ₅₀ = 3,46 ± 0,51 µg/ml	IC ₅₀ = 0,15 ± 0,019 µg/ml	IC ₅₀ = 6,46*10 ⁻⁴ ± 2,74* 10 ⁻⁴ µg/ml	IC ₅₀ = 15,77 ± 7,43 µg/ml
Kollagen (5µg/ml)	IC ₅₀ = 3,52 ± 0,44 µg/ml	IC ₅₀ = 0,13 ± 0,018 µg/ml	IC ₅₀ = 3,43* 10 ⁻⁴ ± 1,48* 10 ⁻⁴ µg/ml	IC ₅₀ = 2,74 ± 1,02 µg/ml

IC₅₀-Ergebnisse mit ADP und Kollagen als Aktivatoren und diversen Medikamenten wie Abciximab, Eptifibatid, Iloprost und Levosimendan als Inhibitoren.

Ausnahme bildet aus unklaren Gründen das Levosimendan mit der IC₅₀/ADP bei 15,77 ± 7,43 µg/ml und der IC₅₀/Kollagen bei 2,74 ± 1,02 µg/ml. Dies bedeutet, dass der aggregatorische Effekt des Kollagen im Vergleich zu dem des ADP schon bei einer sehr geringen Levosimendan-Konzentration zu 50% inhibiert werden kann.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass durch die grafische Darstellung der Inkubation des ADP-/Kollagen-PRP mit den einzelnen Medikamenten eine deutliche Insuffizienz der Signalfunktion des ADP und des Kollagen bezüglich ihrer Plättchenaktivierung zu erkennen ist.

Als Vergleich führt folgende Tabelle die aktuelle Datenlage in der Literatur auf. Es kann gezeigt werden, dass auch in der Vergangenheit über die Methode der Aggregometrie mit den o.g. Substanzen geforscht wurde. Problem ist hierbei, dass zumeist keine IC₅₀- Ergebnisse erhoben wurden, sondern allein die Aggregation in % aufgeführt wurde. Zudem kamen andere Konzentrationen der einzelnen Substanzen zum Einsatz, was eine direkte Vergleichbarkeit nicht erlaubt.

Tabelle 3: Datenlage über Aktivatoren und diversen Medikamenten in der Literatur

Inhibitoren	Abciximab	Eptifibatid	Iloprost	Levosimendan
Aktivatoren				(45ng/ml) (*4)
ADP	100%ige Inhibition um 7 bis 10 µg/ml (*1) IC50 = 74 nM (ADP = 20 µM) (*6)	~0,11 µg/ml = 50%ige Inhibition (ADP = 30 µmol/l) (*2) IC50 = 238nM (ADP = 20µM)(*6)	50%ige Inhibition bei <5 nM PGI ₂ (*3)	Maximum Aggregation (%): 24,33 ± 9,86 % (10 µM ADP) (*4)
Kollagen	Signifikante Reduktion der kollagen-induzierten Plättchen-aggregation (*5)	~0,15 µg/ml = 50%ige Inhibition (Kollagen = 2 µg/ml) (*2)	Verdünntes Kollagen: 50%ige Inhibition bei <5 nM PGI ₂ Konzentriertes Kollagen: 50%ige Inhibition bei ~20 nM PGI ₂ (*3)	Maximum Aggregation (%): 54,25 ± 11,07 % (5 µg/ml Kollagen) (*4)

Datenlage in der Literatur über ADP und Kollagen als Aktivatoren und diversen Medikamenten wie Abciximab, Eptifibatid, Iloprost und Levosimendan als Inhibitoren. Die Daten kommen dabei aus folgenden Quellen: *1 Schwarz et al., 2006; *2 Storey et al., 1998; *3 Weiss, Turitto, 1979; *4 Kaptan et al., 2008; *5 Kereiakes et al., 1996; *6 Wang et al., 2002.

6.5 Aggregatorische und inhibitorische Wirkung bakterieller Toxine auf Thrombozyten

Roger C. Bone et al. entwickelten 1992 eine noch heute anerkannte Definition der Sepsis, in der sie den Einstrom von Mikroorganismen und/oder ihren Toxinen im Zusammenspiel mit der wirtseigenen Immunantwort für die Entwicklung der Sepsis verantwortlich machen. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenspiel ist die direkte Wirkung der Bakterien selbst oder indirekt über ihre bakteriellen Toxine auf den Organismus und hier besonders auf die Thrombozyten. Eine Thrombozytenaktivierung geht dabei allen weiteren Prozessen, inklusive der Aggregation, voran. Im Detail besteht die Aktivierung der Blutplättchen aus multiplen Einzelaktivierungen von Rezeptoren und Signalkaskaden.

Im Fall der infektiösen Endokarditis ist *Staphylococcus aureus* eine bedeutende Ursache bei Patienten ohne einen Herzklappenfehler in der Anamnese. Die Fähigkeit, die Aktivität ruhender Plättchen zu stimulieren und folglich ihre Aggregation einzuleiten, wird als wichtiger Virulenzfaktor von Bakterien, die die infektiöse Endokarditis verursachen, angesehen (Sullam et al., 1996).

Eines dieser stimulierend wirkenden Toxine ist das α -Toxin. In unseren Ergebnissen konnte eine EC_{50} von $3,24 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$ ermittelt werden, was den grundsätzlich proaggregatorischen Effekt, der in Untersuchungen der letzten Jahrzehnte nachgewiesen worden ist, bestätigt (Siegel, Cohen, 1964; Bhakdi et al., 1988; Fitzgerald et al., 2006b).

Weitere Toxine wie das Exotoxin A und das Lektin (PA-IL) von *Pseudomonas aeruginosa* sowie das Lysostaphin von *Staphylococcus stapholyticus* zeigten in unseren Versuchen dagegen eine konträre Wirkung. Da sie sich in isolierter Form auf die Blutplättchen im PRP unwirksam erwiesen, wurden sie zum nachträglich ADP-stimulierten PRP zugegeben. Eine kurze Zeitspanne wurde eingehalten, um die jeweiligen Toxine im PRP einwirken zu lassen. Die Ergebnisse zeigten eine Korrelation zwischen Plättcheninhibition und Toxinkonzentration im Sinne einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Plättchenaggregation durch PA-IL, durch Lysostaphin und in weniger starker Ausprägung durch Exotoxin A. Die IC_{50} konnten für Lektin mit $1,79 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$, für Lysostaphin mit $3,68 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$ und für Exotoxin A mit $39,33 \pm 6,88 \mu\text{g/ml}$ bestimmt werden.

Letzteres entfaltet seine inhibitorische Wirkung erst bei einer höheren Dosis. Hierfür kommt als Ursache zum einen der prolongierte Wirkungsweg durch Endozytose des Exotoxins A in die jeweilige Zelle in Frage, weshalb es – um überhaupt eine Reaktionsmöglichkeit zu schaffen – einer vorherigen Inkubation des Toxins mit den Thrombozyten dringend bedarf. Allerdings enthalten Thrombozyten bekanntermaßen nur wenige Ribosomen, die das eigentliche Target einer Blockade der Proteinsynthese sind, sodass durch das Vorhandensein vieler anderer proaggregatorischer Mechanismen außerhalb der Ribosomen keine starke Wirkung des Exotoxins A möglich zu sein scheint.

Das Lektin ist, den Ergebnissen zufolge, dagegen eher ein thrombozytenbeeinflussendes Toxin. Die Wirkungsweise ist sicherlich – wie schon über den Respirations- und Intestinaltrakt beschrieben – über die Glykokalyx als Angriffspunkt erklärt (Mewe et al., 2005; Chemani et al., 2009). Möglich wäre der antiaggregatorische Effekt durch Angriff an die Glykoproteine mit ihrer Konformationsänderung und der damit erreichten Blockade von Rezeptoren. Eine weitere Erklärung wäre die einer leichten bis schwergradigen Zellschädigung des Thrombozyten über bisher unbekannte Mechanismen mit letzlicher Abnahme der Aggregationsfähigkeit, so wie es Bajolet-Laudinat et al. (1994) über die konzentrationsabhängige Wirkung des PA-IL auf respiratorische Epithelzellen

untersucht haben. Die beschriebenen zytotoxischen Effekte mit schweren Zellschäden traten da allerdings bei Konzentrationen um 100 µg/ml auf, die so in unserem experimentellen Ansatz nicht zur Anwendung kamen.

Dass bakterielle Toxine auch inhibitorisch auf die Plättchenaggregation und damit im Ganzen auch auf die Blutgerinnung wirken können, sollte also in die Kalkulation einer antithrombotischen Therapie eines septischen, zumeist bettlägerigen Patienten einbezogen werden. Größer scheint allerdings das Risiko einer Blutungskomplikation durch die so genannte Verbrauchskoagulopathie zu sein, in der neben einem starken Verbrauch an Gerinnungsfaktoren auch durch schon aggregierte Thrombozyten eine Thrombozytopenie besteht (Ragaller et al., 2007).

Allerdings scheinen die Toxine (α -Toxin, Exotoxin A, Lektin, Lysostaphin, LPS) auch einen Einfluss auf andere Zellen, wie Endothelzellen und PMN zu haben. Hierzu folgt eine Tabelle zum Vergleich der Wirkung der eben genannten Toxine auf Thrombozyten, PMN und Endothelzellen. Einige Wirkungen bleiben noch unklar, da bisher nicht erforscht.

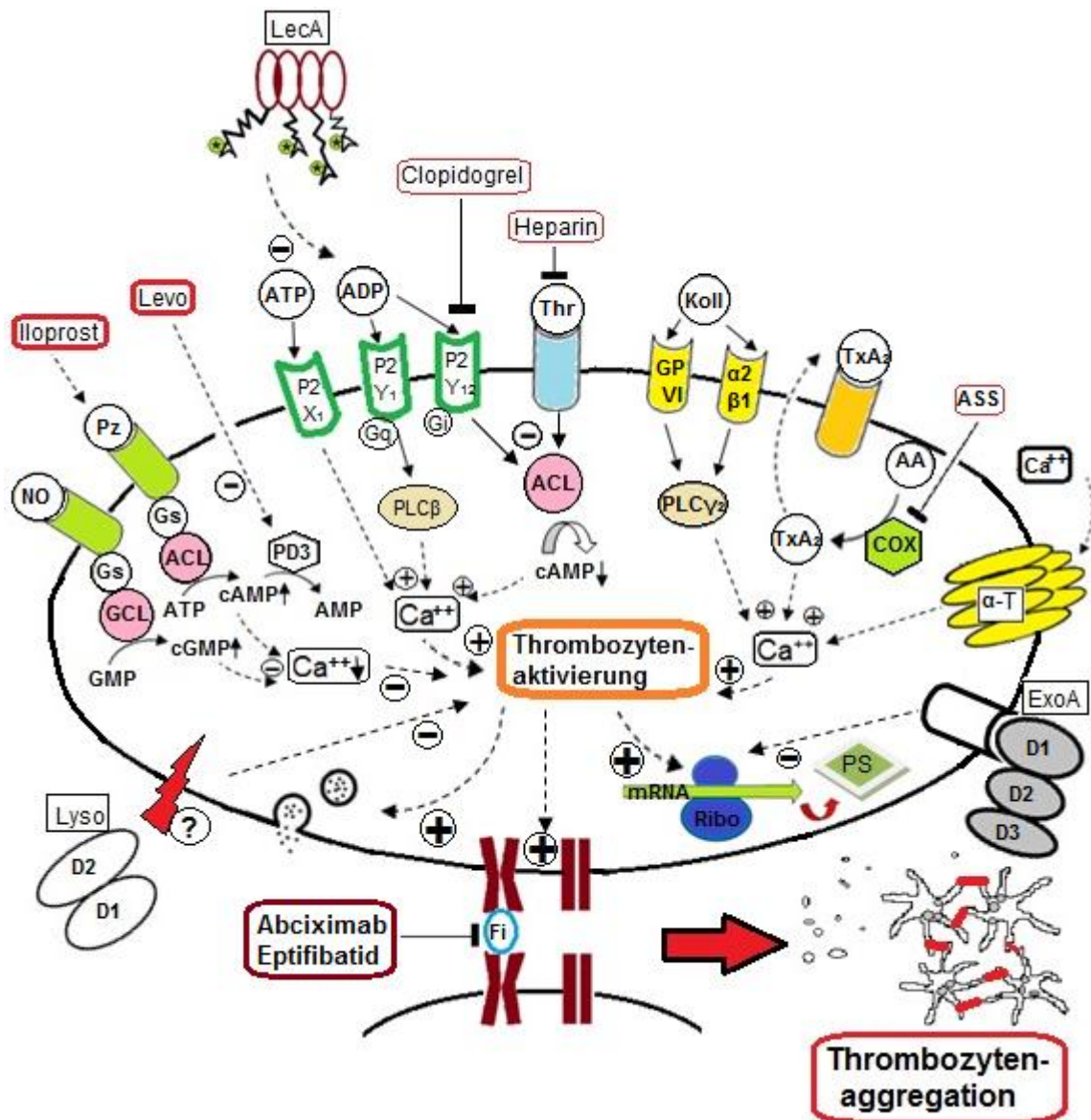


Abbildung 35: Schematische Darstellung aktivierender und hemmender Einflüsse auf die Thrombozytenaktivierung und letztlich auf die Thrombozytenaggregation. Inhibierende Einflüsse führen zur verminderten Plättchenaktivierung und damit zur verminderten Granulasekretion, Aktivierung des Fibrinogenrezeptors sowie verminderten Proteinsekretion. Dies wird durch die bakterielle Toxine wie Lysostaphin (unbekannter Signalweg), Exotoxin A (Blockade der Ribosomenfunktion) und Lektin 1 (unbekannter Signalweg) erwirkt. Physiologisch kommt die Inhibition durch NO (über GCL-Aktivierung) und Prostazyklin zustande. Analog kann die Wirkung von Prostazyklin über Stimulation der ACL auch durch Iloprost (synthetisches Prostazyklin) erzielt werden. Levosimendan führt über die Blockade der Phosphodiesterase III zum verminderten Abbau von cAMP und damit über Ca⁺⁺-Abfall zur verminderten Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Aktivierende Einflüsse kommen physiologisch durch ADP (Rezeptoren: P₂X₁, P₂Y₁, P₂Y₁₂), Thrombin (Thrombinrezeptor), Kollagen (GPVI, α₂β₁) und Thromboxan A₂ zustande. Aufgezeigt sind mögliche medikamentöse Blockierungen dieser jeweiligen Substanzen sowie deren Wirkungswege. Als stimulierendes bakterielles Toxin wird das α-Toxin von *Staphylococcus aureus* aufgeführt, was als Pore wie ein Ca⁺⁺-Kanal mit Ca⁺⁺-Einstrom fungiert. * Calcium, + stimulierende Wirkung, - hemmende Wirkung, ? unklare Wirkung NO Stickstoffmonoxid, Pz Prostazyklin, Fi Fibrinogen, Ca⁺⁺ Kalzium, ACL Adenylatzyklase, GCL Guanylatzyklase, COX Cyclooxygenase, TxA₂ Thromboxan A₂, PS Proteinsynthese, Exo A Exotoxin A, PDIII Phosphodiesterase III, PLCβ/PLCγ₂ Phospholipase Cβ/Cγ₂, ASS Acetylsalicylsäure, AA Arachidonsäure, Koll Kollagen, Thr Thrombin, α-T α-Toxin, Lyso Lysostaphin, Levo Levosimendan, Lec A Lektin 1, Ribo Ribosom, mRNA messenger RNA, cAMP/ cGMP zyklisches AMP/GMP, Gq/ Gi/ Gs inhibierende oder stimulierende G-Protein.

Tabelle 4: Wirkung von diversen Toxinen an PMN, Thrombozyten und Endothelzellen

Toxine	Effekte an:		
	Endothelzellen	Thrombozyten	PMN
α-Toxin	• Porenbildung mit Anstieg von Kalzium-Ionen im Zytosol (*1) • Freisetzung von PAF, NO, PGI₂ (*2) • Aktivierung der Arachidonsäure-Kaskade (*3) • Induktion der ICAM-1 Expression (*12)	• Porenbildung mit Anstieg von Ca⁺⁺-Ionen im Zytosol (*1) • Triggerung der Bcl-3 Proteinsynthese (*4) • Aktivierung von Phospholipiden und der Arachidonsäure-Kaskade mit Freisetzung von TxA₂ (*1) • Freisetzung von PF-4 (*3)	• Porenbildung mit Anstieg von Kalzium-Ionen im Zytosol (*1) • Aktivierung mit Steigerung der Endothel-PMN Interaktion (*12)
Exotoxin A	• In eukaryotischen Zellen: Blockade der Ribosomenfunktion und damit Hemmung der Proteinsynthese über Inaktivierung des ribosomalen Enzyms (*9)		• Reduktion der Proteinsynthese, aber keine Aufhebung der Phagozytose-aktivität (*10)
Lysostaphin	• unbekannt	• inhibierend wirksam auf ADP induzierte Plättchen-aggregation • unklarer Mechanismus	• wirkt gegen an PMN-Oberfläche gebundene und phagozytierte Staphylokokken (*8)
Lektin	• dient der Adhäsion der Pseudomonaden an Zelloberflächen (*6) • spezifische Carbohydrate (D-Galaktose) als Andockstelle verantwortlich (*7) • weiterer Mechanismus unklar	• inhibierend wirksam auf ADP induzierte Plättchen-aggregation • unklarer Mechanismus	• unbekannt
LPS	• NO-Freisetzung (*2)	• Freisetzung von aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren, CD 40L und Anstieg der Fibrinogen-bindungen an Thrombozyten (*5) • Eigene Daten zeigen keine Reaktion	• Steigerung der Expression von CD66b und CD11b (Oberflächen-rezeptoren) und damit Steigerung der Migrations- und Adhäsions-fähigkeit (*11)

Tabellarische Übersicht über Wirkungen, Wirkmechanismen sowie in der Literatur beschriebene Zusammenhänge von LPS, Exotoxin A, Lektin, Lysostaphin und α -Toxin an PMN, Thrombozyten und Endothelzellen. Die Daten kommen dabei neben eigenen Erkenntnissen aus folgenden Quellen: *1 Bahkdi, 1996; *2 Grimminger et al., 1997; *3 Bhakdi et al., 1988; *4 Schubert et al., 2011; *5 Ståhl et al., 2006; *6 Mewe et al., 2005; *7 Chemani et al., 2009; *8 Kumar, 2008; *9 Jørgensen et al., 2005; *10 Bishop et al., 1987; *11 Gomes et al., 2010; *12 Grandel et al., 2002

6.6 Bedeutsamkeit einer antithrombotischen Therapie bei bakteriellen Toxinen

Möglichkeiten, eine toxininduzierte Plättchenaktivierung und vor allem Aggregation zu beeinflussen, bestehen, im Hinblick auf die Auswirkungen bakterieller Toxine am Thrombozyten, in folgenden experimentellen Ansätzen: Zunächst ist die Verhinderung des Eindringens weiterer Bakterien mit ihren Toxinen in die Blutbahn durch Infektsanierung bzw. operative Fokusbeseitigung essentiell. Nun zeigt die Verhinderung der Adhäsion des Bakteriums bzw. im speziellen der Adhäsion des Toxins mit seiner oft verheerenden Wirkung an den Thrombozyten eine medikamentösthapeutische Relevanz. Ein weiterer bedeutsamer und hier genauer untersuchter möglicher Ansatzpunkt liegt in der gezielten und wenn möglich steuerbaren Abschwächung der Plättchenaktivierung sowie der Aggregation.

In dieser Arbeit wird das α -Toxin mit seinen proaggregatorischen Effekten auf die Blutplättchen hervorgehoben. Um die Wirksamkeit der o.g. Medikamente auf die proaggregatorisch wirkenden bakteriellen Toxine zu klären, fanden diese im Experiment Anwendung gegen das α -Toxin als den exemplarischen Aggregator (Bhakdi et al., 1988). Im Krankheitsbild der Sepsis und der Endokarditis kann es durch das häufige Vorkommen von *Staphylococcus aureus* bei diesen Erkrankungen mit seinem Repertoire an Toxinen die Bildung thrombozytärer Mikroaggregate beeinflussen. Im Aggregometer zeigt es eine klare konzentrationsabhängige Zunahme der Lichtdurchlässigkeit infolge des Verbrauchs an Thrombozyten durch Mikrothrombenbildung. Wie die in-vitro-Ergebnisse ergeben, scheint der Mechanismus des α -Toxins, der zur Aggregation führt, nicht auszureichen, um die ersichtlich wirkungsstärkeren Medikamente mit ihren inhibitorischen Effekten zu hindern. Vielmehr zeigen alle Ergebnisse ausnahmslos in konzentrationsabhängiger Weise eine signifikante Abnahme der durch α -Toxin induzierten Plättchenaggregation. Die Daten lassen mutmaßen, dass die Anwendung antithrombozytärer Substanzen eine nützliche Prävention und Behandlung gegen die Interaktion und aggregatorische Wirkung bakterieller Toxine im Falle der infektiösen Endokarditis und der Sepsis darstellt.

Hierzu wurden zunächst zwei Medikamente im Vergleich aufgestellt, die beide aus der Gruppe der GP-IIb/IIIa-Antagonisten gehören. In vivo zeigt sich in der Therapie des akuten Myokardinfakts unter der Therapie eine deutliche Verringerung der Anzahl thromboembolischer Komplikationen periinterventionell und auch noch bis zu sechs Monate lang retrospektiv (Lincoff et al., 2000). Abciximab und Eptifibatid sind unterschiedlicher chemischer Natur, hemmen aber beide im Vergleich zur Gruppe der

Cyclooxygenasehemmstoffe oder der ADP-Rezeptorinhibitoren gleichermaßen vollständig die Thrombozytenaggregation.

Neben antithrombotischen Effekten beeinflusst Abciximab über Interaktion mit dem Vitronektinrezeptor außerdem auch die Thrombozytenadhäsion am durch die Inflammationsmechanismen aktivierten Endothel (Glusa, 2000). Beschrieben wird zudem eine Bindung an den auf Monozyten und neutrophilen Granulozyten vorkommenden Mac-1-Integrin, sodass ein antiinflammatorischer Effekt durch Verhinderung der Adhäsion von Monozyten und Neutrophilen an die aktivierte Endothelwand zu beobachten ist (Simon et al., 1997). Die Frage war nun, ob auch die toxininduzierte Plättchenaggregation abgebremst werden könnte, wie es mit der ADP- oder kollageninduzierten sichtbar gemacht werden konnte. In der Tat hemmen beide Substanzen diesen Aggregationsprozess im toxinstimulierten PRP bei schon relativ niedrigen Dosierungen. Die IC_{50} von Abciximab lag deutlich unter der inhibitorischen Konzentration, die im Zusammenspiel mit ADP oder Kollagen mit Abciximab ermittelt werden konnte, nämlich bei $0,91 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$. Eptifibatid erreichte bei einer fast doppelt so hohen Dosis eine IC_{50} von $0,36 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$ im Vergleich beim ADP- oder kollagenstimulierten PRP, allerdings mit gleichfalls nachweisbarem effektiven inhibitorischen Effekt.

Levosimendan ist mit seinen etwaigen adjuvanten Effekten wegen des immer öfteren Einsatzes in der Therapie der Sepsis mit ihren Schocksituationen und ihrer Einschränkung der Myokardfunktion von Interesse (Behrends, Peters, 2003; Morelli et al., 2005; Noto et al., 2005). Im in-vitro-Modell zeigte sich ein signifikanter inhibitorischer Effekt von Levosimendan auf die Plättchenaggregation, entweder durch ADP oder durch Kollagen induziert. Nun besteht in unseren weitergeführten Untersuchungen womöglich auch eine Beziehung zwischen der Levosimendan-Konzentration und der Schwere der Plättcheninhibition des durch vom α -Toxin stimulierten PRP. Es konnte deutlich ein dosisabhängiger inhibitorischer Effekt auf die durch das α -Toxin eingeleitete Aggregation im in-vitro-Modell aufgezeigt werden. Im Vergleich der effektiveren Wirksamkeit des Levosimendan in der kollagen-induzierten Aggregation zur ADP-induzierten, fand sich eine dazwischen liegende Dosis für diesen Effekt auch gegen die Wirkung von α -Toxin. Die IC_{50} lag dabei bei $6,12 \pm 4,12 \mu\text{g/ml}$. Diese relevante und vorteilhafte Zusatzeigenschaft des Levosimendan spricht somit zugunsten der Einsatzfähigkeit des Medikaments vor allem im septischen Geschehen mit toxininduzierter Mikroemboliebildung.

Schließlich kam als weiteres potentes Medikament das PGI_2 zum Einsatz, welches als Produkt der Cyclooxygenase und als eines der in vitro am stärksten wirkenden

Hemmstoffen gilt (Glusa, 2000; Cheng et al., 2002). In der Literatur ist kaum eine Beschreibung konkreter antiinflammatorischer Effekte von PGI₂ zu finden. Ermittelt wurde 2007 durch Zhou et al. eine hemmende Wirkung auf die Produktion multipler proinflammatorisch wirkender Cytokine und Chemokine in dendritischen Zellen über den IP-vermittelten Signalweg (Zhou et al., 2007). Aufgrund der starken inhibitorischen Wirkung auf die Thrombozytenaggregation von schon 1 µg/ml des PGI₂ auf die ADP- oder kollagenstimulierten Thrombozyten mussten im Weiteren zur grafischen Darstellung der konzentrationsabhängigen Wirkung und der weiteren Anwendung sehr niedrige Dosierungen des PGI₂ gefunden werden. Letztlich wurden auch niedrige, im Vierer-Potenzbereich liegende inhibitorische Konzentrationen gemessen. Auch beim Einwirken auf die α-Toxin-stimulierten Thrombozyten konnte eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung mit einer IC₅₀ von $7,86 \cdot 10^{-5} \pm 1,69 \cdot 10^{-5}$ µg/ml ermittelt werden.

6.7 Komplikationen und Nachteile in der klinischen Behandlung

Da günstige Effekte gegen die Inflammation bzw. gegen die Gerinnungsfunktion der Thrombozyten aufgezeigt wurden, ist es wichtig, auch die Nebenwirkungen und Nachteile der Medikamente näher ins Auge zu rücken. Obwohl in der heutigen Medizin viele Standards zur optimierten Therapie vorliegen, gilt dies sicherlich nicht im gleichen Maße für das Krankheitsbild der Sepsis. Vielmehr kommt allein durch die Variabilität der Ursachen einer Sepsis ein variabler Verlauf zustande. Zudem scheint die Steuerbarkeit der jeweiligen Medikamente bei einem Krankheitsbild, dass von jeher eine hohe Variabilität an Krankheitsverläufen (inklusive der Lage der Gerinnungssituation) beinhaltet, relevant. Vor allem hat das Wissen um plättcheninhibitorische Effekte eine Relevanz angesichts der Tatsache, dass in einigen Krankheitsbildern eine zusätzliche Gerinnungshemmung, wie zum Beispiel bei einer Hirnblutung oder anderweitigen lebensgefährlichen Spontaneinblutungen nicht erwünscht ist, dies aber andererseits als therapeutischer Vorteil genutzt werden könnte. So kann lediglich der experimentell ermittelte Einfluss benannt werden ohne letztlich therapeutisch wirklich empfehlenswert zu sein. Als Beispielsubstanz muss hier wohl die Acetylsalicylsäure genannt werden. Acetylsalicylsäure scheint in der Therapie der Endokarditis angesichts der Plättcheninhibitorischen Wirkung zur Reduktion der embolischen Komplikationen sinnvoll, zeigt allerdings in der klinischen Studie eher den Trend zu einem erhöhten Blutungsrisiko (Chan et al., 2003).

Die Möglichkeit einer Koinfektion von zwei Keimen sollte in die Betrachtung v.a. im Krankheitsbild der Endokarditis mit eingeschlossen werden. Dass es sich dabei auch um konträr wirkende Bakterien bzw. konträr wirkende Bakterientoxine handeln könnte, die sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Thrombozytenfunktion einwirken können, stellt die möglichen Pathomechanismen und auch die Möglichkeit, therapeutisch einzugreifen, komplexer dar.

Weiterhin besteht neben dem erwähnten Problem des Nachweises irgendeines krankheitsverursachenden Bakteriums im septisch kranken Patienten das Problem des konkreten Nachweises der tatsächlich vorliegenden Konzentration der Toxine. Eine Variabilität der Konzentrationen und das unterschiedlich starke Ansprechen des Toxins und damit die Schwere des Krankheitsverlaufs eines jeden Menschen muss vermutet werden.

Interessant wäre es, wenn partielle Funktionen des Thrombozyten, die hauptsächlich die Entzündungsreaktion in der Sepsis und Endokarditis unterhalten, beeinflusst werden könnten. Grundlage dafür ist die Entdeckung der aktiv stattfindenden Translation und Proteinsynthese im Thrombozyten, die zu Beeinflussen, zur Modifizierung der Inflammation, wünschenswert wäre. Allerdings steckt das genauere Verständnis für eben diese komplexen Mechanismen noch in seinen Anfängen. Weitere Studien in der Zukunft, insbesondere molekularbiologische Untersuchungen, würden möglicherweise mehr Informationen bringen.

Klar muss sein, dass eine Monotherapie an Antithrombotika meist unzureichend bleibt. Erst durch das Verstehen der Signalkaskade, woran auch weiter gearbeitet wird, kann in einer Kombination von diversen Mechanismen die Thrombozytenaktivierung und -aggregation mit Thrombenbildung unter Berücksichtigung der hämorrhagischen Nebenwirkungen beeinflusst werden.

Zusammenfassend ergibt sich aus den Ergebnissen eine Reihe möglicher weiterer experimenteller Ansätze und Überlegungen, die über eine Herdsanierung durch eine antibiotische Therapie hinausreichen. Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluss bakterieller Toxine auf die Plättchenaggregation. Dabei konnte durch die Aggregometrie gezeigt werden, dass das α -Toxin bezüglich der Eigenschaft, Thrombozyten zur Aggregation zu bringen, physiologischen Aggregatoren wie Kollagen und ADP ähnlich ist. Klinisch ist dieser Aspekt äußerst relevant, da es durch die Aggregatbildung im Organismus zur Bildung von Mikroembolien kommen kann, die sich typischerweise im Falle der Sepsis und Endokarditis auffinden lassen (Nitsche-Schmitz et al., 2007). In weiteren experimentellen Ansätzen konnte gezeigt werden, dass der aggregatorische Effekt des α -Toxins ($EC_{50} = 3,24 \pm 0,64 \mu\text{g/ml}$) durch Hinzugabe medikamentöser Substanzen reduziert werden konnte. V.a. zeigten die beiden verwendeten GP-IIb/IIIa-Antagonisten Eptifibatid ($IC_{50} = 0,36 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$) und Abciximab ($IC_{50} = 0,91 \pm 0,19 \mu\text{g/ml}$) konzentrationsabhängig eine beeindruckende inhibitorische Wirkung auf die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation. Auch Therapien die zur Kreislaufunterstützung eingesetzt werden können wie das Medikament Levosimendan ($IC_{50} = 6,12 \pm 4,12 \mu\text{g/ml}$), können die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation hemmen.

Es scheinen sowohl direkte als auch adjuvante Effekte einiger Medikamente im Falle einer bakteriell induzierten Plättchenaggregation mit inhibitorischen Eigenschaften wesentlich zu sein. Bedacht werden muss bei der Entwicklung von Therapieansätzen, dass es neben der z.T. toxininduzierten Steigerung der Gerinnung inklusive der Plättchenaktivierung und -aggregation auch wohl durch einige Toxine plättcheninhibitorische Effekte auftreten können. Denn die Untersuchungen mit Lektin ($IC_{50} = 1,79 \pm 0,66 \mu\text{g/ml}$), Lysostaphin ($IC_{50} = 3,68 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$) und dem Exotoxin A ($IC_{50} = 39,33 \pm 6,88 \mu\text{g/ml}$) ergaben eine der den physiologischen Inhibitoren der Thrombozytenaggregation vergleichbare Reaktion.

Auch zukünftig sollte an der Reduzierung der Patientensterblichkeit bei den Krankheitsbildern der Sepsis und Endokarditis gearbeitet werden, in denen der Aspekt einer überschießenden Entzündungsreaktion eine große Bedeutung hat.

Ziel sollte es weiter bleiben, Therapieansätze zu erforschen, die auf eine Modulation der durch bakterielle Toxine induzierten Inflamationsantwort zielen, um letztlich den Krankheitsverlauf günstiger werden zu lassen.

- Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P (2005) Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106:2417-2423.
- Arbuthnott JP, Freer JH, Bernheimer AW (1967) Physical States of Staphylococcal α -Toxin. *J Bacteriol* 94:1170-1177.
- Arvand M, Bhakdi S, Dahlbäck B, Preissner KT (1990) Staphylococcus aureus alpha-toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 265:14377-14381.
- Balaban N, Goldkorn T, Gov Y, Hirshberg M, Koyfman N, Matthews HR, Nhan RT, Singh B, Uziel O (2001) Regulation of Staphylococcus aureus pathogenesis via target of RNAIII-activating Protein (TRAP). *J Biol Chem* 276:2658-2667.
- Bajolet-Laudinat O, Girod-de Bentzmann S, Tournier JM, Madoulet C, Plotkowski MC, Chippaux C, Puchelle E (1994) Cytotoxicity of Pseudomonas aeruginosa internal lectin PA-I to respiratory epithelial cells in primary culture. *Infect Immun* 62:4481-4487.
- Bayer AS, Ramos MD, Menzies BE, Yeaman MR, Shen AJ, Cheung AL (1997) Hyperproduction of alpha-toxin by Staphylococcus aureus results in paradoxically reduced virulence in experimental endocarditis: a host defense role for platelet microbicidal Proteins. *Infect Immun* 65:4652-4660.
- Bayer AS, Sullam PM, Ramos M, Li C, Cheung AL, Yeaman MR (1995) Staphylococcus aureus induced platelet aggregation via a fibrinogen-dependent mechanism which is independent of principal platelet glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen-binding domains. *Infect Immun* 63:3634-3641.
- Behrends M, Peters J (2003) The calcium sensitizer levosimendan attenuates endotoxin-evoked myocardial dysfunction in isolated guinea pig hearts. *Intensive Care Med* 29:1802-1807.
- Bennett JS (2005) Structure and function of the platelet integrin α IIb β 3. *J Clin Invest* 115:3363-3369.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, Kehoe M, Palmer M (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165:73-79.
- Bhakdi S, Füssle R, Tranum Jensen J (1981) Staphylococcal α -Toxin: Oligomerization of hydrophilic monomers to form amphiphilic hexamers induced through contact with deoxycholate detergent micelles. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:5475- 5479.
- Bhakdi S, Muhly M, Mannhardt U, Hugo F, Klapetek K, Mueller-Eckhardt C, Roka L (1988) Staphylococcal α -Toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* 168:527- 542.
- Bhakdi S, Tranum Jensen J (1991) Alpha-Toxin of Staphylococcus aureus. *Mikrobiol Rev* 55:733-751.
- Bicanic TA, Eykyn SJ (2002) Hospital-acquired, native valve endocarditis caused by Pseudomonas aeruginosa. *J Infect* 44:137-139.
- Bishop MB, Baltch AL, Hill LA, Smith RP, Lutz F, Pollack M (1987) The effect of Pseudomonas aeruginosa cytotoxin and toxin A on human polymorphonuclear leukocytes. *J Med Microbiol* 24:315-324.

8. Literaturverzeichnis

- Blanchard B, Nurisso A, Hollville E, Tétaud C, Wiels J, Pokorná M, Wimmerová M, Varrot A, Imbert A (2008) Structural basis of the preferential binding for globo-series glycosphingolipids displayed by *Pseudomonas aeruginosa* lectin I. *J Mol Biol* 383:837-853.
- Blot S, Vandewoude K, Colardyn F, Conde A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R, Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:2025-2026.
- Boeynaems JM, Van Giezen H, Savi P, Herbert JM (2005) P2Y receptor antagonists in thrombosis. *Curr Opin Investig Drugs* 6:275-282.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ (1992) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus conference committee. American college of chest physicians/ society of critical care medicine. *Chest* Jun 101:1644-1655.
- Born GVR (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194:927-929.
- Brewer DB (2006) Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol* 133:251-258.
- Budde U (2002) Diagnosis of Platelet Function Defects with Platelet Aggregometers. *J Lab Med* 26:564-571.
- Buerke M, Cyrus T, Darius H (1997) Phosphodiesterase Inhibitors Piroximone and Enoximone inhibit platelet aggregation in vivo and in vitro. *Thrombosis Research* 88: 89-98.
- Cattaneo M, Gachet C (2001) The platelet ADP receptors. *Haematologica* 86:346-348.
- Chan KL, Dumesnil JG, Cujec B, Sanfilippo AJ, Jue J, Turek MA, Robinson TI, Moher D (2003) A randomized trial of aspirin on the risk of embolic events in patients with infective endocarditis. *J Am Coll Cardiol* 42:775-80.
- Chang FY (2000) *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *J Microbiol Immunol Infect* 33:63-68.
- Chemani C, Imbert A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery B P, Faure K (2009) Role of LecA and LecB Lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* 77:2065-2075.
- Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffmann TM, Groszer T, Lawson JA, Fitzgerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296:539-541.
- Ciufetti G, Sokola E, Lombardini R, Pasqualini L, Pirro M, Mannarino E (2003) The influence of iloprost on blood rheology and tissue perfusion in patients with intermittent claudication. *Kardiol Pol* 59:197-204.
- Clemetson KJ, Clemetson JM (2001) Platelet collagen receptors. *Thromb Haemost* 86:189-197.
- Climo MW, Patron RL, Goldstein BP, Archer GL (1998) Lysostaphin treatment of experimental methicillin-resistant *staphylococcus aureus* aortic valve endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 42:1355-1360.
- Coller BS, Perschke EI, Scudder LE, Sullivan CA (1983) A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glykoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 72:325-338.
- Cote AV, Berger PB, Holmes DR Jr, Scott CG, Bell MR (2001) Hemorrhagic and vascular complications after percutaneous coronary intervention with adjunctiv abciximab. *Mayo Clin Proc* 76:890-896.

8. Literaturverzeichnis

- Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW (2009) Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 102:711-718.
- Dempfle CE (2005) Sepsis-associated coagulation disorders. *Hämostasiologie* 25:183-189.
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2005) Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122:379-391.
- Emori TG, Gaynes RP (1993) An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 6:428-442.
- Farndale RW (2006) Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells Mol Dis* 36:162-165.
- Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D (2006a) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4:445-457.
- Fitzgerald JR, Loughman A, Keane F, Brennan M, Knobel M, Higgins J, Visai L, Speziale P, Cox D, Foster TJ (2006b) Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIa receptor. *Mol Microbiol* 59:212-230.
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P (2003) Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 108:989-995.
- Fotbolcu H, Duman D (2010) A promising new inotrope: levosimendan. *Anadolu Kardiyol Derg* 10:176-182.
- Fox JE (1993) The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 70:884-893.
- Francius G, Domenech O, Mingeot-Leclercq MP, Dufrêne YF (2008) Direct observation of *Staphylococcus aureus* cell wall digestion by lysostaphin. *J Bacteriol* 190:7904-7909.
- Füssle R, Bhakdi S, Sziegoleit A, Trantum Jensen J, Kranz T, Wellensiek H-J (1981) On the mechanism of membran damage by *Staphylococcus aureus*. *J Cell Biol* 91: 83-94.
- Gachet C, Léon C, Hechler B (2006) The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* 36:223-227.
- Gawaz MP: Das Blutplättchen – Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Thieme, Stuttgart, New York, 1999.
- Gawaz M, Langer H, May AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115:3378-3384.
- Gawaz M (2004) Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovascular Research* 61:498-511.
- Gerok W, Huber C, Meinertz T, Zeidler H (Hrsg): Die Innere Medizin - Referenzfachwerk für den Facharzt. 11. Auflage, Schattauer, Stuttgart, 2007.
- Glick J; Garber N (1983) The intracellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* lectins. *J Gen Microbiol* 129:3085-3090.
- Glusa E (2000) Review of platelet aggregation inhibitors. *Haemostasiologie* 20:173-177.

8. Literaturverzeichnis

- Gomes NE, Brunialti MK, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R (2010) Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Braz J Med Biol Res* 43:853-8.
- Gouaux JE, Braha O, Hobaugh M, Song L, Cheley S, Shustak C, Bayley H (1994) Subunit stoichiometry of staphylococcal alpha-hemolysin in crystals and on membranes: a heptameric transmembrane pore. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12828-12831.
- Grandel U, Reutemann M, Kiss L, Buerke M, Fink L, Bournelis E, Heep M, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U (2002) Staphylococcal alpha-toxin provokes neutrophil-dependent cardiac dysfunction: role of ICAM-1 and cys-leukotrienes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1157-65.
- Grimminger F, Rose F, Sibelius U, Meinhardt M, Pötzsch B, Priestersbach R, Bhakdi S, Suttrop N, Seeger W (1997) Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and staphylococcal α -Toxin. *J Immunol* 159:1909-1916.
- Gründling A, Schneewind O (2006) Cross-linked peptidoglycan lysostaphin binding to the cell wall envelope of *staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188:2463-2472.
- Gryglewski RJ (2008) Prostacyclin among prostanoids. *Pharmacol Rep* 60:3-11.
- Hoffmann R, Hanrath P: Krankheiten des Endokards. In: Gerok W et al. (Hrsg.) (2007), S. 216-226.
- Höcherl K, Schmidt Ch, Kurt B, Bucher M (2008) Activation of the PGI₂/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertension* 52:330-335.
- Iglewski BH, Liu PV, Kabat D (1977) Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. *Infect Immun* 15:138-144.
- Imberty A, Wimmerová M, Mitchell EP, Gilboa-Garber N (2004) Structures of the lectins from *Pseudomonas aeruginosa*: insight into the molecular basis for host glycan recognition. *Microbes Infect* 6:221-228.
- Jarvis GE, Best D, Watson SP (2004) Glycoprotein VI/Fc receptor gamma chain-independent tyrosine phosphorylation and activation of murine platelets by collagen. *Biochem J* 383:581-588.
- Jayachandran M, Brunn GJ, Karnicki K, Miller RS, Owen WG, Miller VM (2007) In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity: implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol* 102:429-433.
- Jäger D, Werdan K, Müller-Werdan U (2011) Endogenous ADP-ribosylation of elongation factor-2 by interleukin-1 β . *Mol Cell Biochem* 348:125–128.
- Jørgensen R, Merrill A, Yates SP, Marquez VE, Schwan AL, Boesen T, Andersen GR (2005) Exotoxin A–eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* 436:979-984.
- Jurk K, Kehrel BE (2005) Platelets and the new comprehension of haemostasis. *Haemostasiologie* 25:39-49.
- Kamath SR, Jaykumar I, Matha S (2009) Levosimendan. *Indian Pediatr* 46:593-596.
- Kaptan K, Erinc K, Ifran A, Yildirim V, Uzun M, Beyan C, Işık E (2008) Levosimendan has an inhibitory effect on platelet function. *Am J Hematol* 83:46-49.

8. Literaturverzeichnis

- Kato Y, Ohashi H, Tsutsumi Y, Murakami T, Takahashi Y (2009) Prosthetic valve endocarditis caused by metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *J Card Surg* 24:347-349.
- Kehrel BE: Platelets (2003) biochemistry and physiology. *Haemostasiologie* 23:149-158.
- Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, Farndale RW, Okuma M, Barnes MJ (1998) Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood* 91:491-499.
- Kereiakes DJ, Runyon JP, Kleiman NS, Higby NA, Anderson LC, Hantsbarger G, McDonald S, Anders RJ (1996) Differential dose-response to oral xemilofiban after antecedent intravenous abciximab. Administration for complex coronary intervention. *Circulation* 94:906-910.
- Kerrigan SW, Clarke N, Loughman A, Meade G, Foster TJ, Cox D (2008) Molecular basis for staphylococcus aureus mediated platelet aggregate formation under arterial shear in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:335-340.
- Kerrigan SW, Cox D (2009) The thrombotic potential of oral pathogens. *J Oral Microbiol* doi: 10.3402/jom.v1i0.1999.
- Kobayashi SD, Voyich JM, DeLeo FR (2003) Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. *Microbes Infect* 5:1337-1344.
- Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ (2007) Lysostaphin as a treatment for systemic *Staphylococcus aureus* infection in a mouse model. *J Antimicrob Chemother* 60:1051-1059.
- Kokai-Kun JF, Chanturiya T, Mond JJ (2009) Lysostaphin eradicates established *Staphylococcus aureus* biofilms in jugular vein catheterized mice. *J Antimicrob Chemother* 64:94-100.
- Kozek-Langenecker SA, Spiss CK, Michalek-Sauberer A, Felfernig M, Zimpfer M (2003) Effect of prostacyclin on platelets, polymorphonuclear cells, and heterotypic cell aggregation during hemofiltration. *Crit Care Med* 31:864-868.
- Kumar JK (2008) Lysostaphin: an antistaphylococcal agent. *Appl Microbiol Biotechnol* 80:555-561.
- Kupferwasser LI, Yeaman MR, Shapiro SM, Nast CC, Sullam PM, Filler SG, Bayer AS (1999) Acetylsalicylic acid reduces vegetation bacterial density, haematogenous bacterial dissemination, and frequency of embolic events in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis through antiplatelet and antibacterial effects. *Circulation* 99:2791-2797.
- Lau T-L, Kim C, Ginsberg MH, Ulmer TS (2009) The structure of the integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO Journal* 28:1351-1361.
- Laughlin RS, Musch MW, Hollbrook CJ, Rocha FM, Chang EB, Alverdy JC (2000) The key role of *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin on experimental gut-derived sepsis. *Ann Surg* 232:133-142.
- Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H (2003) Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 60:26-39.
- Levi M (2005) Platelets in Sepsis. *Hematology* 10:129-131.
- Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ (2000) Platelet glykoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 35:1103-1115.

8. Literaturverzeichnis

- Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154:485-490.
- Loew A, Riess H (2005) Therapeutic modulation of coagulation in sepsis. *Hämostasiologie* 25:191-199.
- Loughman A, Fitzgerald JR, Brennan MP, Higgins J, Downer R, Cox D, Foster TJ (2005) Roles for fibrinogen, immunoglobulin and complement in platelet activation promoted by *Staphylococcus aureus* clumping factor A. *Mol Microbiol* 57:804-818.
- Lowy FD (1998) *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* 339:520-532.
- Masek K, Libánská J, Nosál R, Rasková H (1969) The effect of staphylococcal alpha-toxin on blood platelets. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 262:419-427.
- Matot I, Sprung CL (2001) Definition of sepsis. *Intensive Care Med* 27:S3-S9.
- Menestrina G, Pederzoli C, Forti S, Gambale F (1991) Lipid interaction of *Pseudomonas* Exotoxin A. *Biophys J* 60:1388-1400.
- Mewe M, Tielker D, Schönberg R, Schachner M, Jaeger K-E, Schumacher U (2005) *Pseudomonas aeruginosa* lectins I und II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol* 119:595-599.
- Morelli A, De Castro S, Teboul JL, Singer M, Rocco M, Conti G, De Luca L, Di Angelantonio E, Orecchioni A, Pandian NG, Pietropaoli P (2005) Effect of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression. *Intensive Care Med* 31:638-644.
- Morlon-Guyot J, Méré J, Bonhoure A, Beaumelle B (2009) Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication. *Infect Immun* 77:3090-3099.
- Moroi M, Jung SM (1998) Integrin-mediated platelet adhesion. *Front Biosci* 3:d719-728.
- Murugppan S, Kunapuli SP (2006) The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci* 11:1977-1986.
- Mylonakis E, Calderwood SB (2001) Infektive Endocarditis in adults. *N Engl J Med* 345:1318-1330.
- Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Philipps DR (2003) Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirine on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 107:1123-1128.
- Niemann S, Spehr N, van Aken H, Morgenstern E, Peters G, Herrmann M, Kehrel BE (2004) Soluble fibrin ist the main mediator of *Staphylococcus aureus* adhesion to platelets. *Circulation* 110:193-200.
- Nieminen MS et al. (2005) Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 26:384-416.
- Nieswandt B, Schulte V, Zywiets A, Gratacap MP, Offermanns S (2002) Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signalling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem* 277:39493-39498.
- Nieswandt B, Watson SP (2003) Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 102:449-461.

8. Literaturverzeichnis

- Nitsche-Schmitz DP, Rohde M, Chhatwal GS (2007) Invasion mechanisms of gram-positive pathogenic cocci. *Thromb Haemost* 98:488-496.
- Nordera P, Dalla Serra M, Menestrina G (1997) The Adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A to Phospholipid monolayers is controlled by pH and surface potential. *Biophys J* 73:1468-1478.
- Noto A, Giacomini M, Palandi A, Stabile L, Reali-Forster C, Iapichino G (2005) Levosimendan in septic cardiac failure. *Intensive Care Med* 31:164-165.
- Nurden AT, Nurden P (1993) A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol* 6:653-690.
- Oldham ER, Daley MJ (1991) Lysostaphin: use of a recombinant bactericidal enzyme as a mastitis therapeutic. *J Dairy Sci* 74:4175-4182.
- Plotkowski M-C, Saliba AM, Pereira SHM, Cervante MP, Bajolet- Laudinat O (1994) *Pseudomonas aeruginosa* selective adherence to and entry into human endothelial cells. *Infect Immun* 62:5456-5463.
- Ragaller M, Theilen H, Koch T (2007) Therapeutic options to improve the microcirculation in sepsis and septic shock. *Hämostasiologie* 27:59-63.
- Reininger AJ (2006) Primary haemostasis and its assessment by laboratory tests. *Hamostaseologie* 26:42-47.
- Reuter H, Schenne J: Grundlagen und Praxis der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Science Data Supply, Köln, 2000.
- Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente V (2009) Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica* 94:700-711.
- Rivera J, Vannakambadi G, Höök M, Speziale P (2007) Fibrinogen-binding proteins of gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* 98:503-511.
- Rondina MT, Schwertz H, Harris ES, Kraemer BF, Campbell RA, Mackman N, Grissom CK, Weyrich AS, Zimmerman GA (2011) The Septic Milieu Triggers Expression of Spliced Tissue Factor mRNA in Human Platelets. *J Thromb Haemost* doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04208.x.
- Ruggeri ZM, Mendolicchio GL (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100:1673-1685.
- Russ MA, Prondzinsky R, Carter JM, Schlitt A, Ebel H, Schmidt H, Lemm H, Heinroth K, Söffker G, Winkler M, Werdan K, Buerke M (2009) Right ventricular function in myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: Improvement with levosimendan. *Crit Care Med* 37:3017-3023.
- Russ MA, Prondzinsky R, Christoph A, Schlitt A, Buerke U, Söffker G, Lemm H, Swyter M, Wegener N, Winkler M, Carter JM, Reith S, Werdan K, Buerke M (2007) Hemodynamic improvement following levosimendan treatment in patients with acute myocardial infarction and cardiogenic shock. *Crit Care Med* 35:2732-9.
- Sá MI, Mõço R, Cabral S, Reis AH, Pereira LS, Torres S, Sousa R, Pinho P, Gomes JL (2007) Isolated pulmonary valve endocarditis due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Port Cardiol* 26:43-48.
- Saluk-Juszczak J, Wachowicz B (2005) The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem* 51:280-287.

8. Literaturverzeichnis

- Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, van der Poll T (2008) Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *L Leukoc Biol* 83:536-545.
- Schwarz M, Meade G, Stoll P, Ylänne J, Bassler N, Yung CC, Hagemeyer CE, Ahrens I, Moran N, Kenny D, Fitzgerald D, Bode C, Peter KH (2006) Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: A novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circ Res* 99:25-33.
- Schubert S, Schwertz HJ, Weyrich AS, Franks ZG, 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.
- Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS (2006) Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 203:2433-2440.
- Shashkin PN, Brown GT, Ghosh A, Marathe GK, McIntyre TM (2008) Lipopolysaccharide is a direct agonist for platelet RNA splicing. *J Immunol* 181:3495-3502.
- Sibeliuss U, Grandel U, Buerke M, Mueller D, Kiss L, Kraemer HJ, Braun-Dullaeus R, Haberbosch W, Seeger W, Grimminger F (2000) Staphylococcal α -toxin provokes coronary vasoconstriction and loss in myocardial contractility in perfused rat hearts – role of thromboxane generation. *Circulation* 101:78-85.
- Siegel I, Cohen S (1964) Action of staphylococcal Toxin on human platelets. *J Infect Dis* 114:488- 502.
- Siljander PR, Munnix IC, Smethurst PA, Deckmyn H, Lindhout T, Ouwehand WH, Farndale RW, Heemskerk JW (2004) Platelet receptor interplay regulates collagen-induced thrombus formation in flowing human blood. *Blood* 103:1333-1341.
- Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK (1997) 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:528-535.
- Sinha B, Herrmann M (2005) Mechanism and consequences of invasion of endothelial cells by Staphylococcus aureus. *Thromb Haemost* 94:266-277.
- Smith G (1982) Ogston's Coccus 102 years and still going strong. *South Med J* 75:1559-1562.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE (1996) Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274:1859-1866.
- Ståhl AL, Svensson M, Mörgelin M, Svanborg C, Tarr PI, Mooney JC, Watkins SL, Johnson R, Karpman D (2006) Lipopolysaccharide from enterohemorrhagic Escherichia coli binds to platelets via TLR4 and CD62 and is detected on circulating platelets in patients with haemolytic uremic syndrome. *Blood* 108:167-176.
- Steinhubel SR, Talley JD, Braden GA, Tcheng JE, Casterella PJ, Moliterno DJ, Navetta FI, Berger PB, Popma JJ, Dangas G, Gallo R, Sane DC, Saucedo JF, Jia G, Lincoff AM, Theroux P, Holmes DR, Teirstein PS, Kereiakes DJ (2001) Point-of-care measured platelet inhibition correlates with a reduced risk of an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention: results of the GOLD (AU- Assessing Ultegra) multicenter study. *Circulation* 103:2572-2578.

8. Literaturverzeichnis

- Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S (1998) Differential effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet microaggregate and macroaggregate formation and effect of anticoagulant on antagonist potency: Implications for assay methodology and comparison of different antagonists. *Circulation* 98:1616-1621.
- Sullam PM, Bayer AS, Foss WM, Cheung AL (1996) Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infect Immun* 64:4915-4921.
- Thomas SG, Calaminus SD, Auger JM, Watson SP, Machesky LM (2007) Studies on the actin-binding protein HS1 in platelets. *BMC Cell Biol* 8:46.
- Trappe U, Riess H (2005) Pathophysiologische Grundsätze bei Sepsis. *Hämostasiologie* 25:175-182.
- Tran AX, Trent MS, Whitfield C (2008) The LptA protein of *Escherichia coli* is a periplasmic lipid A-binding protein involved in the lipopolysaccharide export pathway. *J Biol Chem* 283:20342-20349.
- Valentijn KM, van Driel LF, Mourik MJ, Hendriks GJ, Arends TJ, Koster AJ, Valentijn JA (2010) Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood* 116:1807-1816.
- Van Amersfoort AS, Van Berkel TJ, Kuiper J (2003) Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 16:379-414.
- Von Hundelshausen P, Weber C (2007) Platelets as Immune Cells: Bridging Inflammation and Cardiovascular Disease. *Circ Res* 100:27-40.
- Walker B, Braha O, Cheley S, Bayley H (1995) An intermediate in the assembly of a pore-forming protein trapped with a genetically-engineered switch. *Chem Biol* 2: 99-105.
- Walker B, Krishnasastri M, Zorn L, Bayley H (1992) Assembly of the oligomeric membrane pore formed by staphylococcal alpha-hemolysin examined by truncation mutagenesis. *J Biol Chem* 267:21782-21786.
- Wang X, Dorsam RT, Lauver A, Wang H, Barbera FA, Gibbs S, Varon D, Savion N, Friedman SM, Feuerstein GZ (2002) Comparative analysis of various platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists on shear-induced platelet activation and adhesion. *J Pharmacol Exp Ther* 303:1114-20.
- Watson SP, Auger JM, McCarty OJ, Pearce AC (2005) GPVI and integrin alphaIIb beta3 signaling in platelets. *J Thromb Haemost* 3:1752-1762.
- Weiss HJ, Turitto T (1979) Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53:244-250.
- Westphal N, Pflicht B, Naber C (2009) Endokarditis-Prophylaxe, Diagnostik und Therapie. *Dtsch Arztebl Int* 106:481-489.
- Weyrich AS, Denis MM, Schwertz H, Tolley ND, Foulks J, Spencer E, Kraiss LW, Albertine KH, McIntyre TM, Zimmerman GA (2007) mTOR-dependent synthesis of Bcl-3 controls the retraction of fibrin clots by activated human platelets. *Blood* 109: 1975-1983.
- Weyrich AS, Dixon DA, Pabla R, Elstad MR, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1998) Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5556-5561.

8. Literaturverzeichnis

Xiong YQ, Willard J, Yeaman MR, Cheung AL, Bayer AS (2006) Regulation of *Staphylococcus aureus* α -toxin gene (*hla*) expression by *agr*, *sarA*, and *sae* in vitro and in experimental infective endocarditis. *J Infect Dis* 194:1267-1275.

Yang G, Gao Y, Feng J, Huang Y, Li S, Liu Y, Liu C, Fan M, Shen B, Shao N (2008) C-terminus of TRAP in *Staphylococcus* can enhance the activity of lysozyme and lysostaphin. *Acta Biochim Biophys Sin* 40:452-458.

Yang J, Ma Y-Q, Page RC, Misra S, Plow EF, Qin J (2009) Structure of an integrin α IIb β 3 transmembrane-cytoplasmic heterocomplex provides insight into integrin activation. *PNAS* 106:17729-17734.

Yeaman MR, Sullam PM, Dazin PF, Bayer AS (1994) Platelet microbicidal protein alone and in combination with antibiotics reduces *Staphylococcus aureus* adherence to platelets in vitro. *Infect Immun* 62:3416-3423.

Yeaman MR (1997) The role of platelets in antimicrobial host defense. *Clin Infect Dis*. 25:951-970.

Zhang G, Han J, Welch EJ, Ye RD, Voyno-Yasenetskaya TA, Malik AB, Du X, Li Z (2009) Lipopolysaccharide stimulates platelet secretion and potentiates platelet aggregation via TLR4/MyD88 and the cGMP-dependent protein kinase pathway. *J Immunol* 182:7997-8004.

Zhang Y, Liu S, Lajoie G, Merrill AR (2008) The role of the diphthamide-containing loop within eukaryotic elongation factor 2 in ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Biochem J* 413:163-174.

Zhou W, Hashimoto K, Goleniewska K, O'Neal JF, Ji S, Blackwell TS, Fitzgerald GA, Egan KM, Geraci MW, Jr. Peebles RS (2007) Prostaglandin I₂ analogs inhibit proinflammatory cytokine production and T cell stimulatory function of dendritic cells. *J Immunol* 178:702-710.

1. Durch das von *Staphylococcus aureus* stammende α -Toxin wird die Thrombozytenaggregation induziert.
2. Lektin 1 (*Pseudomonas aeruginosa*), Lysostaphin (*Staphylococcus stapholyticus*) und Exotoxin A (*Pseudomonas aeruginosa*) führen isoliert auf die Thrombozyten zu keiner aggregatorischen Reaktion.
3. Lektin 1, Lysostaphin und Exotoxin A führen zur Inhibition der ADP induzierten Thrombozytenaggregation.
4. LPS haben keinen Effekt auf die Plättchenaggregation.
5. Sowohl die Wirkung von α -Toxin, als auch diese von Lektin 1, Lysostaphin und Exotoxin A ist konzentrationsabhängig.
6. Abciximab, Eptifibatid, Levosimendan und Iloprost inhibieren konzentrations-abhängig die ADP- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation.
7. Abciximab, Eptifibatid, Levosimendan und Iloprost inhibieren konzentrationsabhängig die α -Toxin-induzierte Plättchenaggregation.

Lebenslauf

Name: Maria Bernadette Focke

Geburtsdatum: 02.11.1981

Adresse: Parkstrasse 1e, 49080 Osnabrück

Geburtsort: Dessau

Eltern: Stephanie Focke (geb. Müller) und Wolfgang Focke

Schulbildung: 1988-1991 Grundschule Alten, Dessau
1991-1992 Grundschule Schaftrift, Dessau
08/1992-06/2000 Liborius-Gymnasium in Dessau,
Abschluss: Abitur

Studium: 10/2000-11/2006 Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Praktisches Jahr: (10/2005-09/2006) Dermatologie bei Prof. Marsch, Klinik für Dermatologie und Venerologie, MLU Halle
Innere Medizin bei Prof. Osten, Klinik für Innere Medizin II, MLU- Halle
Chirurgie bei Prof. Dralle, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, MLU-Halle

Approbation: 12/2006 MLU- Halle-Wittenberg

Promotion: seit 10/2003 Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Direktor: Prof. Dr. med. K. Werdan

Thema: "Einfluss bakterieller Toxine auf die Thrombozytenaggregation in vitro" unter der Betreuung von Prof. Dr. med. Michael Buerke

Beruf: 04/2007-09/2013 Assistenzärztin der Medizinischen Klinik I für Kardiologie, Pulmologie, Nephrologie, Angiologie und Intensivmedizin im Klinikum Osnabrück
09/2013 Fachärztin für Innere Medizin
seit 10/2013 Nephrologische Weiterbildung, Klinikum Osnabrück

Ort, Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus den fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Recht herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Buerke für die Überlassung des Themas und für die profunde konstruktive Kritik, die ein langsames aber sicheres Wachsen der Arbeit gewährleisteten. Dank sagen möchte ich auch in diesem Zusammenhang Herrn Prof. K. Werdan, Herrn Prof. P. Presek und nicht zuletzt das geduldige Laborteam unter der Leitung von Frau Schulz und Herrn Dr. S. Schubert.

Weiterhin ist allen freiwilligen Probanden zu danken, die für diese Arbeit einen gewissen Blutzoll leisteten um die *In-vitro*-Untersuchungen bewerkstelligen zu können.

Schließlich danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich stetig zur Fertigstellung ermuntert haben.

Zuletzt möchte ich meine herzliche Dankbarkeit meinen Eltern kundtun, da ohne ihnen das Studium und letztlich damit auch die Doktorarbeit undenkbar gewesen wären.