

Aus dem Institut für Anatomie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**Die Beteiligung humaner Blutplättchen an der unspezifischen Abwehr-  
Untersuchungen an verschiedenen Borrelienstämmen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von  
Carola Clasing, geb. Wobker  
aus Bremen

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Matthias Klinger

2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Christoph Frohn

Tag der mündlichen Prüfung: 25.03.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.03.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meiner Familie

# *Inhaltsverzeichnis*

## **Abkürzungsverzeichnis**

VI

## **1. Einleitung**

1.1. Mechanismen der unspezifische Abwehr	1
1.2. Blutplättchen	5
1.2.1. Ultrastruktureller Aufbau	5
1.2.2. Inhalt der $\alpha$ - Granula	7
1.2.3. Plättchenaktivierung	8
1.2.3.1. Thrombin/SF	10
1.2.4. Funktionen	12
1.2.4.1. Blutstillung und Blutgerinnung	12
1.2.4.2. Beteiligung an Entzündungsreaktionen und Wundheilung	12
1.2.4.3. Bereits bekannte Abwehrmechanismen der Plättchen	14
1.2.4.4. Interaktion mit Leukozyten, Endothelzellen und Bakterien	16
1.3. Borrelien	17
1.3.1. Ultrastruktureller Aufbau	18
1.4. Reaktive Sauerstoffspezies	20
1.4.1. ROS	20
1.4.2. ROS im Blutplättchen	20
1.4.3. Antioxidantien	20
1.4.4. Vitamin C	21
1.4.5. Vitamin E	21
1.5. Fragestellung	23

## **2. Material und Methoden**

2.1. Borrelienkulturen	24
2.1.1. Borrelienisolate aus Zecken	24
2.1.2. Borrelienisolate aus Patienten	24
2.2. Thrombozytenpräparate	25
2.2.1. Thrombozytenkonzentrate aus Buffy-Coats	25
2.2.2. Apherese- Präparate	25
2.3. Plättchenstimulation	26
2.3.1. Plättchenvermittelte Bakterizidie gegenüber verschiedenen Borrelienstämmen	26
2.3.2. Experimente zur Ermittlung des Wirkmechanismus der Bakterizidie	27
2.3.2.1. Modelle zur Aktivierung der Plättchen	27
2.3.2.2. Untersuchungen zum Einfluss freier Radikale auf die Bakterizidie	27
2.4. Fluoreszenzmikroskopie	29
2.5. Mikroskopische Auswertung der Präparate	30
2.6. Auswertung der Ergebnisse und Statistik	30
2.7. Transmissionselektronenmikroskopie	31
2.8. Benutzte Chemikalien	33
2.9. Nährmedien und Pufferlösungen	34

<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1. Lichtmikroskopisch erkennbare Effekte	35
3.2. Quantitative Auswertung der plättchenvermittelten Abwehr am Fluoreszenzmikroskop	37
3.3. Inkubationen zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Bakterizidie	41
3.3.1. Unterschiedliche Modelle zur Aktivierung der Plättchen	41
3.3.2. Einflüsse freier Radikale auf die plättchenvermittelte Abwehr	44
3.3.2.1. Einfluss von L-Ascorbinsäure auf die plättchenvermittelte Abwehr	46
3.3.2.2. Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol auf die plättchenvermittelte Abwehr	48
3.3.2.3. Einfluss von Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl	50
3.4. Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop	52
3.4.1. Degranulation von Plättchen durch SF	55
<b>4. Diskussion</b>	
4.1. Geschichtlicher Rückblick	56
4.2. Bivalente Betrachtung	58
4.3. Plättchenvermittelte Abwehr gegenüber verschiedenen Borrelienstämmen	58
4.4. Die Mechanismen der Infektionsabwehr im Einzelnen	61
4.4.1. Mikrobiozide Peptide	61
4.4.2. Internalisierung/ Mögliche Phagozytose	63
4.4.3. Reaktive Sauerstoffspezies	64
4.4.4. Hemmung der Bakterizidie durch $\alpha$ -Tocopherol	66
4.5. Zusammenschau	69
4.5.1. Überlegungen zum Wirkmechanismus	69
4.5.2. Klinische Anwendung	70
4.5.3. Ausblick	71
<b>5. Zusammenfassung</b>	72
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	74
Danksagung	89
Lebenslauf	90
Publikationen	92

## *Abkürzungen*

ACD	ACD-Lösung zur Antikoagulation bei der Zellseparation
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Buffy- Coat
β-TG	Beta-Thromboglobulin
<i>B29</i>	<i>Borrelia garinii</i>
<i>B31</i>	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
ChltpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die in <b>Chloroform</b> vorinkubiert wurden
CP	Cacodylatpuffer
CPBStpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die mit Vitamin <b>C</b> in <b>PBS</b> vorinkubiert wurden
CTAP-III	connective tissue- activating protein
eA	experimentinduzierte Absterberate
EGF	epidermal growth factor
EChltpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die mit Vitamin <b>E</b> in <b>Chloroform</b> vorinkubiert wurden
EÖtpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die mit Vitamin <b>E</b> in <b>Öl</b> vorinkubiert wurden
FP-A	Fibrinopeptid A
FP-B	Fibrinopeptid B
GP	Glykoprotein
GPIb/IX	Rezeptor für den von Willebrand- Faktor
GPIIb/IIIa	= $\alpha_{IIb}\beta_3$ , Rezeptor für Fibrinogen
12-HETE	12- Hydroxyeicosatrenoate = 12-hydroxyeicosatetraenoic acid
MIP-1 $\alpha$	macrophage inflammatory protein- 1 $\alpha$
nA	natürliche Absterberate der Borrelien in der Kultur
NAP-2	neutrophil activating peptide 2
OCS	Open Canalicular System
ÖtpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die mit <b>Öl</b> vorinkubiert wurden
OSP	Outer Surface Protein
PAF	Plättchen- aktivierender Faktor
PAR 1-4	Protease Activated Receptor 1 bis 4
PAS 2	Plättchen additive Lösung
PBP	platelet basic protein
PBStpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen, die mit <b>PBS</b> vorinkubiert wurden
PDGF	platelet- derived growth factor
PF 4	Plättchenfaktor 4
<i>PKo38</i>	<i>Borrelia afzelii</i> Passage Nr. 38
<i>PKo81</i>	<i>Borrelia afzelii</i> Passage Nr. 81
<i>PKo345</i>	<i>Borrelia afzelii</i> Passage Nr. 345; keine Ausprägung von Osp C
<i>PLe</i>	<i>Borrelia afzelii</i>

---

PMN	polymorphonukleärer Leukozyt
PMP	platelet microbicidal protein
RANTES	regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted
ROS	reactive oxygen species = reaktive Sauerstoffspezies
SCCS	Surface Connected Canalicular System
SF	synthetisches Peptid mit der Aminosäuresequenz SFLLRNPNDKYEPF, Agonist am PAR-1
spA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von SF-stimulierten Plättchen
Tβ-4	Thymosin β-4
TC	Thrombocidine
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TK	Thrombozytenkonzentrat
tpA	Absterberate der Borrelien nach Hinzugabe von thrombin-stimulierten Plättchen
VEGF	vascular endothelial cell growth factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

## ***I. Einleitung***

Aufgrund der ständigen raschen Entwicklung von Antibiotikaresistenzen der Mikroorganismen und der zum Teil fatalen Verläufe von Infektionen mit einem multiresistenten Keim in der Klinik, ist es ein wichtiges Ziel in der medizinischen Forschung, neue Wirkweisen für Antibiotika zu finden. Um dieses Ziel zu erreichen, muss zunächst die körpereigene Immunabwehr möglichst genau erforscht werden.

Einen Beitrag zur angeborenen Immunität leisten auch die Blutplättchen, die primär für ihre Funktion in Blutstillung und Wundheilung bekannt sind. In den letzten Jahrzehnten fanden sie in vielen Studien zunehmend Beachtung aufgrund ihrer vielfältigen Beteiligung an Entzündungsreaktionen und Erregerabwehr.

### 1.1. Mechanismen der unspezifische Abwehr

Der menschliche Organismus ist ständig infektiösen Mikroorganismen ausgesetzt, die über die äußeren und inneren Körperoberflächen versuchen, in das Körperinnere einzudringen. Hierbei handelt es sich z.B. um Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren. In den meisten Fällen können sie durch die körpereigene Immunabwehr erkannt und zerstört werden. Man unterscheidet eine angeborene, unspezifische Immunität und eine erworbene, spezifische. Die angeborene kann sehr rasch zwischen körpereigen und körperfremd unterscheiden. Durch die angeborene Immunität werden pathogene Mikroorganismen sofort abgewehrt, auch wenn der Körper vorher noch nie mit dem entsprechenden Antigen konfrontiert war. Die Mechanismen der unspezifischen Immunabwehr können in humorale und zelluläre Komponenten unterteilt werden (Keller, 1987). Die humoralen umfassen: das Komplementsystem, Lysozym, C-reaktives Protein, Interferon, antimikrobielle Peptide, Interleukine. Zelluläre Komponenten sind: Phagozytose, Produktion freier Radikale, Zytolyse (Keller, 1987; Zander, 2007).

Im natürlichen Ablauf sind als erste Barriere für einen infektiösen Erreger die Epithelien der inneren und äußeren Körperoberflächen zu nennen, die ein mechanisches, chemisches und mikrobiologisches Hindernis für eindringende Mikroorganismen darstellen (Janeway et al., 2002). Die mechanische Abwehr besteht aus den tight junctions, die einzelne Epithelzellen fest zusammenhalten, sowie dem Luft- oder Flüssigkeitsstrom entlang des Epithels und der Schleimbewegung durch Zilien (Janeway et al., 2002). Chemische

Wirkstoffe der Epithelien sind Fettsäuren der Haut, Lysozym in Speichel, Schweiß und Tränen, Pepsin im Darm, ein niedriger pH-Wert im Magen sowie die Bildung von antibakteriellen Peptiden (Janeway et al., 2002). Diese Peptide haben unabhängig vom Gewebetyp einige Grundeigenschaften gemeinsam: Sie sind klein (bis 9 kD), bestehen aus ca. 20-40 Aminosäuren (Sima et al., 2003), sind kationisch und enthalten viele Cysteinreste verbunden durch Disulfidbrücken. Eine große Gruppe dieser Peptide in der unspezifischen Abwehr beim Menschen sind z.B. die Defensine, Cathelicidine und Histatine (Bals, 2000). Sie kommen in vielen verschiedenen Zellarten und Geweben vor. Sogar bei Insekten, Pflanzen und Fröschen konnte man antimikrobielle Peptide (AMP) finden (Schröder, 1999). So ist z.B. bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* das fungizide Peptid Drosomyzin bekannt (Lemaitre et al., 1996). Insbesondere für Lebewesen, die kein spezifisches Abwehrsystem haben, sind diese Peptide der unspezifischen Abwehr von großer Bedeutung (Sima et al., 2003). Aus der Zunge und dem Respirationstrakt von Rindern wurden antimikrobielle Peptide erstmals aus Zellen eines Säugetiers isoliert (Schröder, 1999). Man fand sie beim Menschen zunächst in Leukozyten und in verschiedenen epithelialen Geweben. Weiterhin fand man sie in den Paneth-Zellen im Darm von Mäusen (Oulette und Lualdi, 1990; Huttner et al., 1994), im Epithel der menschlichen Atemwege (Goldman et al., 1997) und des Urogenitaltraktes (Valore et al., 1998) sowie in der Haut (Harder et al., 1997; Schröder, 1999).

Zusätzlich zu den bisher genannten Zellen können auch die Blutplättchen von Säugetieren zur unspezifischen Abwehr beitragen. Sie enthalten antimikrobielle Peptide (Weksler und Nachman, 1971; Yeaman et al., 1992a; Yeaman 1997; Krijgsveld et al., 2000), speichern Immunglobuline (Harrison und Cramer, 1993; Klinger, 1997), setzen Radikale frei (Marcus et al., 1977; Iuliano et al., 1997) und nehmen mit einer Vielzahl von Mediatoren an Entzündungsreaktionen teil (Herd und Page, 1994; Klinger, 1997; Klinger, 2002; Klinger und Jelkmann, 2002). Auf die plättchenvermittelte Abwehr wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen (siehe Kap. 1.2.4.3.).

Die mikrobiologische Abwehr der Epithelbarrieren beinhaltet die normale Mikroorganismenflora, die um Nährstoffe und Bindungsstellen an Epithelzellen konkurriert und antibakterielle Substanzen synthetisieren kann (Janeway et al., 2002). Werden die Epithelien überwunden, treffen die Pathogene auf Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten). Diese binden die Eindringlinge über Rezeptoren, können sie dann aufnehmen und verdauen. Die Phagozyten können außerdem durch Cytokine und Chemokine eine Entzündungsreaktion und eine Reaktion der adaptiven Immunabwehr

auslösen (Janeway et al., 2002). Cytokine sind von Zellen gebildete Proteine, die das Verhalten anderer Zellen beeinflussen (Janeway et al., 2002). Sie werden nach ihrer biologischen Funktion eingeteilt in Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine (Heinrich et al., 2007). Chemokine sind Migration-auslösende Cytokine. Sie werden nach ihrer Aminosäuresequenz in CC- und C-X-C-Chemokine unterteilt (Heinrich et al., 2007).

Die Phagozyten sind bevorzugt zur Aufnahme von partikulären Stoffen befähigt. Sie verfügen über wirkungsvolle Instrumente zum Abtöten und Abbau des aufgenommenen Materials, wie z.B. niedriger pH, verschiedene Proteasen, Phosphatasen, Lysozym, Peroxidasen, Produkte des oxidativen Stoffwechsels (u.a. Superoxidanion; Babior et al., 1973; Wasserstoffperoxid; Keller, 1987). Auch bei Blutplättchen gibt es Hinweise auf Phagozytoseaktivität. Elektronenmikroskopische Studien konnten eine Internalisierung von Partikeln und Fremdkörpern aus der Blutstrombahn sichern (Lewis et al., 1976; Copley, 1979; White und Clawson, 1981; Herd und Page, 1994; Youssefian et al., 2002).

Eine weitere Komponente der unspezifischen, aber auch spezifischen, Abwehr ist das Komplementsystem, ein System aus Plasmaproteinen, das auf Oberflächen von Mikroorganismen aktiviert werden kann. Hier entstehen Poren, durch die manche Bakterien bereits lysiert werden können. Hauptsächlich dient das Komplementsystem jedoch dazu, die Oberfläche von Krankheitserregern zu bedecken, damit sie durch Phagozyten leichter erkannt und zerstört werden können (Janeway et al., 2002). Die Aktivierung des Komplementsystems löst eine Kaskade von rasch aufeinanderfolgenden, initial vorwiegend enzymatischen Vorgängen aus, in deren Verlauf verschiedene Stoffe mit biologischer Aktivität entstehen. Sie erfüllen u.a. die folgenden Funktionen: Aktivierung von Zellen (z.B. Neutrophilen), Elimination von Zellen (Zytolyse), Opsonisierung, Begünstigung der Phagozytose (Keller, 1987).

Die Blutplättchen arbeiten durch die Komplementrezeptoren C3b und C5b eng mit dem Komplementsystem zusammen (Yeaman und Bayer, 2002). Wesentliche Teilkomponenten des Komplementsystems sind der zytolytisch wirkende Komplex C5b-C9, der zur Porenbildung in der Zellmembran führt und einige Bakterien auf diese Weise schon direkt zerstören kann (Keller, 1987; Janeway et al., 2002). In Anwesenheit von Thrombin fördern Plättchen die Aktivierung des Komplementsystems und die Bildung dieses Komplexes (Zimmerman und Kolb, 1976; Polley und Nachman, 1978; Yeaman und Bayer, 2002). Andererseits werden Plättchen durch diesen Komplex stärker aktiviert, aggregieren und degranulieren (Polley und Nachman, 1978; Yeaman und Bayer, 2002).

Das Komplementsystem ist sowohl an der angeborenen, als auch an der erworbenen Immunität beteiligt. Können die Pathogene diese angeborenen Mechanismen der unspezifischen Abwehr überwinden, wird die erworbene spezifische Immunität aktiviert. Dieses Immunsystem reagiert jedoch nicht sofort, denn die für das eingedrungene Pathogen spezifischen B- und T- Zellen müssen sich zunächst durch klonale Expansion vermehren, bevor sie die Infektion durch spezifische Antikörper beseitigen (Janeway et al., 2002). Bis dahin wird über die erstgenannten Mechanismen versucht, die Infektion einzudämmen. Antikörper sind spezifische Produkte der adaptiven Immunantwort. Sie kommen im flüssigen Bestandteil des Blutes (Plasma) und in extrazellulären Flüssigkeiten vor (Janeway et al., 2002). Die Antikörper können sich auf drei Arten an der Immunabwehr beteiligen: Sie binden Antigene direkt, um deren Wechselwirkungen mit anderen Zellen zu blockieren, sie opsonisieren Krankheitserreger und Fremdpartikel, damit diese besser erkannt und phagozytiert werden können, und sie aktivieren das Komplementsystem (Janeway et al., 2002).

Infektionen werden meistens unter Auslösung einer Entzündung bekämpft. Eindringene pathogene Organismen und Gewebeverletzungen initiieren über die lokale Wirkung von Mediatoren, Cytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren die Entzündungsreaktion. Diese ist im Allgemeinen durch *Calor* (Überwärmung), *Dolor* (Schmerzen), *Rubor* (Rötung), *Tumor* (Schwellung) und *Functio laesa* (Funktionseinschränkung) gekennzeichnet. Der physiologische Ablauf einer Entzündungsreaktion kann in drei Hauptereignisse unterteilt werden. An erster Stelle steht die Gefäßreaktion mit Vasodilatation und Exsudation, an zweiter Stelle die zelluläre Reaktion bestehend aus Migration, Adhäsion, Phagozytose, Degranulation und an dritter Stelle die Bindegewebsreaktion: Matrixbildung zur Defektreparatur, Angiogenese (Gefäßneubildung; Egger, 2005). Diese Abläufe einer Entzündung resultieren im Wesentlichen aus typischen Veränderungen der lokalen Blutgefäße. Sie werden durch Mediatoren bewirkt, die von Makrophagen und Blutplättchen produziert und freigesetzt werden, z.B. Prostaglandine, Leukotriene und der plättchenaktivierende Faktor (PAF). Auf diese und weitere Entzündungsmediatoren wird in den Unterkapiteln „Inhalt der  $\alpha$ -Granula“ und „Beteiligung der Plättchen an Entzündungsreaktion und Wundheilung“ (Kap. 1.2.2. und 1.2.4.2.) ausführlich eingegangen.

## 1.2. Blutplättchen

Im anglo-amerikanischen Sprachraum unterscheidet man zwischen kernhaltigen „thrombocytes“, die z.B. bei Vögeln und Reptilien vorkommen, und den kernlosen „platelets“ der Säugetiere. Daher soll in dieser vorliegenden Arbeit der missverständliche Ausdruck Thrombozyt vermieden und vorwiegend der Ausdruck **Blutplättchen** benutzt werden.

### 1.2.1. Ultrastruktureller Aufbau

Die Plättchen entstehen im Knochenmark durch Abschnürung aus dem Zytoplasma der Megakaryozyten. Im Ruhezustand sind sie diskusförmig. Sie sind 1-4  $\mu\text{m}$  groß und ihr Volumen beträgt etwa 6 fl. Von diesen flachen, kernlosen Blutplättchen findet man in einem Mikroliter Blut etwa 150.000 bis 300.000. Hier beträgt ihre Verweildauer etwa 5 bis 11 Tage, danach werden sie in Milz, Leber und Lunge abgebaut. Die Plättchen sind reich an Strukturproteinen. Zum einen zeigt sich ein marginales Mikrotubulusbündel, das sich radförmig peripher um das Zytoplasma zu wickeln scheint. Desweiteren befindet sich im Zytoplasma viel monomeres Aktin. Es ist besonders unter dem Plasmalemm als F-Aktin dicht gelagert und bildet hier ein Membranskelett, das in Verbindung mit den Membranglykoproteinen steht (Fox, 1993). Nach Stimulation bildet sich im Inneren des Plättchens das Zytoskelett aus polymerem Aktin. Im Zytoplasma kommen reichlich Glykogengranula vor und einige wenige Mitochondrien. Im humanen Blutplättchen finden sich über 30  $\alpha$ -Granula und etwa 5 „dense bodies“ (Wurzinger, 1990; Harrison und Cramer, 1993; Klinger, 1997). Sie entstehen während der Reifung im Megakaryozyten. Die  $\alpha$ -Granula haben einen Durchmesser von etwa 150 bis 250 nm und enthalten verschiedene Proteine, die man nach ihrer Funktion in unterschiedliche Gruppen einteilen kann. Sie sind zum einen im Megakaryozyten synthetisiert worden, zum anderen aus dem Blutplasma durch Endozytose in das Plättchen aufgenommen worden und werden hier gespeichert (storage granules). Im nächsten Abschnitt wird genauer auf den Inhalt der  $\alpha$ -Granula eingegangen.

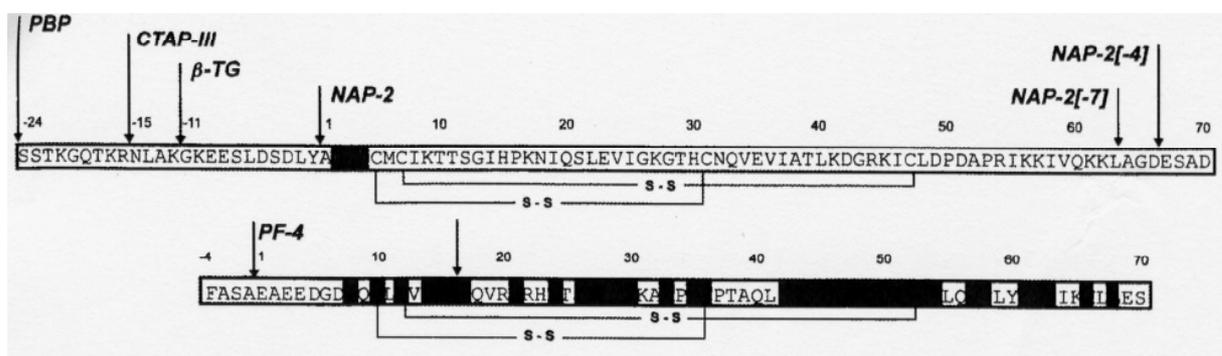
Außerdem gibt es im Plättchen die „dense bodies“ oder  $\delta$ -Granula. In diesen befinden sich u.a. Serotonin, Kalzium, Adenin- und Guaninnukleotide und anorganisches Phosphat. In

den Lysosomen oder  $\lambda$ -Granula befinden sich saure Hydrolasen und in den Peroxisomen Katalase.

Die Plättchen enthalten selten Golgi-Apparate oder endoplasmatisches Retikulum, dafür haben sie ganz spezielle Endomembransysteme: Das offene kanalikuläre System (open canalicular system, OCS) und das dense tubular system (DTS). Das DTS spielt eine wesentliche Rolle im  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt des Plättchens als Speicherort und präziser Regulator und ist der Hauptort des Arachidonsäurestoffwechsel. Das OCS, auch „Surface Connected Canalicular System“ (SCCS) genannt, besteht aus Kanälen und Höhlen innerhalb des Plättchens und hat Verbindung zur äußeren Oberfläche. Es ist wichtig für Endo- und Exozytoseprozesse. Das OCS dient der Endozytose von z.B. Plasmabestandteilen (Fibrinogen, Albumin, Immunglobuline) und kann auch andere Partikel aus dem Blut aufnehmen (Clawson und White 1971, Lewis et al. 1976, Klinger 1997). Es dient aber auch der Exozytose, indem z.B. ein aktiviertes Plättchen über das OCS im Rahmen der sogenannten Freisetzungsreaktion (release reaction) den Granulainhalt in das umgebende Plasma ausschütten kann. Deswegen wird das OCS auch als „two-way street“ bezeichnet (White und Escolar, 1991). Diese beiden Vorgänge können auch gleichzeitig ablaufen. Durch das OCS können die Plättchen außerdem auf Veränderungen des Außenmediums reagieren. Bei Aktivierung zeigen sie dann einen äußeren Formwandel (Deranleau et al., 1982; Hantgan, 1984). Die vorher diskoide Plättchenform erhält unregelmäßige Konturen. Über diese Zwischenform kommt es zur endgültigen Form des angeregten Plättchens mit langen Pseudopodien (Deranleau et al., 1982; Hantgan, 1984). Hierbei dient das OCS als Membranreservoir für die Ausbildung der Pseudopodien (Wurzinger, 1990). Durch diese kommt es vermehrt zu Berührungen der Plättchen untereinander und die Aggregation wird begünstigt. Während der Aktivierung kommt es auch zu einem inneren Formwandel der Plättchen, hierbei zentralisieren sich die Organellen (Wurzinger et al., 1987). So stehen die Speichergranula in engem Kontakt zum OCS und es kann zur Freisetzungsreaktion (release reaction) kommen, indem die Granula ihre Inhaltsstoffe in den Extrazellulärraum ausschütten. Hierbei hängt es von Art und Stärke des Stimulus ab, welche Granula ihren Inhalt freisetzen. Bei nur schwachen Stimuli sind es die  $\alpha$ -Granula und „dense bodies“, bei stärkeren auch die Lysosomen, die ihren Inhalt abgeben (Kaplan et al., 1979; Holmsen et al., 1982).

### 1.2.2. Inhalt der $\alpha$ -Granula

Die Vielfalt bekannter Moleküle aus  $\alpha$ -Granula wird immer größer und beinhaltet adhäsive Proteine, antimikrobielle Peptide, Entzündungsmediatoren, Gerinnungsfaktoren, gespeicherte Immunglobuline, Protease-Inhibitoren und Wachstumsfaktoren. Sie können grob in zwei Klassen unterteilt werden: Proteine, die während der Entwicklung des Plättchens im Megakaryozyten synthetisiert wurden, im Gegensatz zu Proteinen, die in anderen Zellen hergestellt wurden und in den Granula der Plättchen gespeichert werden, wie z.B. Faktor V, von-Willebrand-Faktor, Fibronectin, Fibrinogen, IgG (Harrison und Cramer, 1993). In der Membran der Granula gibt es einige Rezeptormoleküle, unter anderem Glykoprotein (GP) IIb/IIIa ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) und P-Selektin, die auch als dynamische Rezeptoren bezeichnet werden (Harrison und Cramer, 1993), da sie bei Aktivierung der Plättchen auf die Plasmamembran transloziert werden. Die  $\alpha$ -Granula entstehen schon während der Megakaryozytenreifung. Sie beanspruchen etwa 6 bis 15 % des Plättchenvolumens (Wurzinger, 1990). Ihre typischen Inhaltsstoffe sind PF4 und  $\beta$ -TG. Beide entstammen der C-X-C-Subfamilie der Chemokine und entstehen als Spaltprodukte des „platelet basic protein“ (PBP), einem 15 kD Protein. Vom PBP entstammen auch das „connective tissue activating protein-III“ (CTAP-III) und das „neutrophil activating peptide-2“ (NAP-2) (Ibelgaufs, 1992; Brandt et al., 2000a; Brandt et al., 2000b). Auf diese und weitere Entzündungsmediatoren wird im Unterkapitel „Beteiligung an Entzündungsreaktionen und Wundheilung“ (1.2.4.2.) ausführlicher eingegangen.



**Abbildung 1** Aminosäuresequenzen der  $\beta$ -TG Proteine und PF-4. Die Pfeile markieren die Lokalisation der Abspaltung vom PBP, nach der dann z.B. CTAP-III,  $\beta$ -TG oder NAP-2 übrig bleiben. Die schwarzen Balken markieren Sequenzhomologien von PF-4 mit NAP-2. Aus: Brandt et al.: Platelet-derived C-X-C chemokines: old players in new games. *Immunological Reviews* 177, 204-216 (2000)

<b>Funktionelle Gruppe</b>	<b>Protein</b>	<b>Funktion</b>
Adhäsive Proteine	Von-Willebrand-Faktor	Plättchenadhäsion
	Fibronektin	an Fibrin gebundenes F. begünstigt die Anlagerung von Zellen an Blutgerinnsel
	Thrombospondin	Regulation von Kollagenfibrillenbildung und Angiogenese, Plättchenaggregation
Gerinnungsfaktoren	Faktor V, VII, XI, XII, Fibrinogen	Blutgerinnungsfaktoren
Entzündungsmediatoren (die hier aufgelisteten Proteine sind Spaltprodukte des platelet basic protein, PBP)	PF-4*	wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und Monozyten
	β-TG*	wirkt chemotaktisch auf Fibroblasten, hemmt Prostacyclinproduktion d. Endothelzellen
	NAP-2**	Neutrophil-activating peptide-2
	CTAP-III**	Connective tissue-activating peptide-III Up- und Down-Regulation von Rezeptoren der Neutrophilen
Antimikrobielle Peptide	TC-1***	Spaltprodukt des NAP-2 mit mikrobiozider Wirkung
	TC-2***	Spaltprodukt des CTAP-III mit mikrobiozider Wirkung
	PMP****	Mikrobiozide Wirkung in Plättchen von Kaninchen
Gespeicherte Immunglobuline	IgG, IgA	unterstützen adaptive Abwehr
Wachstumsfaktor	PDGF*	stimuliert die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in Arterien
Membranglykoproteine	GPIIb/IIIa	unterstützt die Exozytose bei der Freisetzungreaktion
	P-Selektin*	die Expression unterstützt die Interaktion zwischen Plättchen und Leukozyten

**Tabelle 1** Proteine in den  $\alpha$ -Granula des Plättchens (nach \*Harrison und Cramer, 1993; \*\*Brandt et al., 2000a; Brandt et al., 2000b; \*\*\*Krijgsvelde et al., 2000; \*\*\*\*Yeaman et al., 1992a).

### 1.2.3. Plättchenaktivierung

Bereits im 19. Jahrhundert entdeckten Eberth und Schimmelbusch allein durch Lichtmikroskopie den Formwandel der Plättchen, der mit einem aktivierten Zustand einhergeht (Wurzinger, 1990). Am Ort einer Gefäßwandverletzung kommen die Plättchen mit der Basallamina und subendotheliale Bindegewebe in Berührung. Am freiliegenden Kollagen und Fibronektin binden nichtstimulierte Plättchen über Zelladhäsionsmoleküle

vom Integrintyp (Wurzinger und Zanner, 2005). Außerdem vermittelt der im Blutplasma enthaltene von-Willebrand-Faktor (vWF) die Bindung zwischen dem Glykoprotein GPIIb/IX der Plättchenmembran und Kollagen (Wurzinger und Zanner, 2005). ADP (Adenosindiphosphat), das aus geschädigten Zellen austritt, aber auch Kollagen, Katecholamine, Thrombin und viele andere Substanzen stimulieren die Plättchen. Dadurch führen sie innerhalb weniger Sekunden ihren Formwandel (shape change, visköse Metamorphose) durch und es entstehen kugelige Gebilde mit langen Fortsätzen (s.o.). Bei der Vergrößerung der Plättchenoberfläche dient das OCS als Membranreserve (Wurzinger, 1990). Das Integrin Glykoprotein IIb/IIIa wird aktiviert und bindet u.a. Fibrinogen. Es ist ein Rezeptor für zytoadhäsive Proteine mit RGD-Sequenz. Die RGD-Sequenz besteht aus Arginin, Glyzin, Asparagin. Diese ist z.B. in Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor enthalten (Jaschonek, 1991).

So kommt es zur Anlagerung weiterer Plättchen. Gleichzeitig mit dem Formwandel und der Aggregation sezernieren die Plättchen den Inhalt ihrer Granula (release reaction; Kaplan et al., 1979; Holmsen et al., 1982; Wurzinger und Zanner, 2005).

Typische Stimulatoren der Plättchen *in vivo* und *in vitro* sind u.a.:

- Kollagen
- ADP
- PAF
- Thromboxan A<sub>2</sub>
- Glasoberflächen
- mechanische Einflüsse
- fremde Mikropartikel im Blut (z.B. Latexpartikel, Bakterien)
- Thrombin
- das Peptid SFLLRN
- das Peptid SFLLRNPNDKYEPF

Mit dem Kollagen kommen die Plättchen wie beschrieben bei einer Gefäßwandverletzung in Kontakt, wenn die Endothelschicht defekt ist. Es veranlasst die Aktivierung der Plättchen (Clawson und White, 1971; Wurzinger und Zanner, 2005). Das ADP wird aus zerstörten Zellen, z.B. des Endothels, freigesetzt und führt zur Plättchenaktivierung. PAF, der plättchenaktivierende Faktor, ist ein Produkt stimulierter Zellen, z.B. von Makrophagen. Bereits durch sehr geringe Mengen kann die Plättchenaggregation ausgelöst werden (Petrides, 2007).

Das Thromboxan A<sub>2</sub> wird in den Plättchen synthetisiert und stimuliert wiederum weitere Plättchen zur Verformung, Aggregation und Freisetzung ihrer Inhaltsstoffe. Auf Glasoberflächen werden Plättchen *in vitro* aktiviert. Auch andere mechanische Einflüsse, wie z.B. pathologisch veränderter Blutfluß, führen zur Anregung der Plättchen (Wurzinger et al., 1987; Wurzinger, 1990). Treffen die Plättchen in den Blutgefäßen auf körperfremde Partikel wie z.B. Latexpartikel oder Bakterien, können sie aggregieren und werden aktiviert (Clawson und White, 1971; White und Clawson, 1981; Yeaman, 1997).

#### 1.2.3.1. Thrombin/ SF

Thrombin ist eine Peptidase, die Arginylbindungen spaltet und zu einer teilweisen Proteolyse des Fibrinogenmoleküls führt. Es spaltet die Arginylglyzinbindungen des Fibrinogen und setzt so Fibrinopeptide frei. Nach weiterer Abspaltung bleiben Fibrinmonomere zurück (Jelkmann, 2007). Insofern hat das Thrombin eine sehr wesentliche Aufgabe bei der Blutgerinnung. Thrombin ist aber auch ein potenter Stimulator zur Plättchenaktivierung *in vivo* und *in vitro* (Shuman, 1986; Tolentino u. Bahou, 2002).

Zunächst zur Thrombinbildung: Der Prothrombinaktivator-komplex aus FX<sub>a</sub>, FV<sub>a</sub>, Ca<sup>2+</sup> und Phospholipid spaltet proteolytisch aus dem Proenzym Prothrombin, das in der Leber gebildet wird, an der Plättchenplasmamembran (Tolentino und Bahou, 2002) das enzymatisch aktive Thrombin ab (Fenton, 1986; Jelkmann, 2007). Thrombin bindet an spezifische Rezeptoren der Plättchenmembran und induziert dadurch die Phosphorylierung intrazellulärer Proteine sowie die Abgabe von Ca<sup>2+</sup> aus den elektronendichten Granula. Dadurch wird die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Phospholipase A<sub>2</sub> aktiviert, welche die Freisetzung von Arachidonsäure katalysiert (Jaschonek, 1991; Jelkmann, 2007). Diese wird durch die Enzyme Zyklooxygenase und Thromboxan-Synthetase in die zyklischen Endoperoxide PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> und weiter in Thromboxane umgewandelt. Die Endoperoxide und Thromboxan A<sub>2</sub> lösen eine Verformung und Aggregation weiterer Plättchen aus, die daraufhin ebenfalls ihre Inhaltsstoffe freisetzen (Jelkmann, 2007). Infolge der Strukturauflösung der Plättchen werden negativ geladene Phospholipide der inneren Schicht der Zellmembran und der Granula nach außen gekehrt. Die Phospholipide (früherer Name: Plättchenfaktor 3) binden bestimmte Faktoren des Fibringerinnungssystems (z.B. Faktor V<sub>a</sub> und VIII<sub>a</sub>), die damit lokal angereichert werden (Jelkmann, 2007).

Thrombin führt am Plättchen insgesamt zur Aggregation und Sekretion (Tolentino u. Bahou, 2002). Thrombin bindet über bestimmte PAR-Rezeptoren an Zellen (Protease

Activated Receptors). Beim humanen Plättchen sind dies vor allem PAR-1 und PAR-4. Der PAR-1 Rezeptor wird durch eine proteolytische Spaltung durch die Protease Thrombin in der ersten extrazellulären Schleife aktiviert (Xu et al., 1998; Tolentino u. Bahou, 2002). PAR-1 ist der hauptsächliche Rezeptor für thrombinvermittelte Plättchenaktivierung und wird durch die Aminosäuresequenz SFLLR aktiviert (Tolentino u. Bahou, 2002).

Bereits 1993 untersuchten Kinlough-Rathbone et al. die synthetischen Peptide SFLLRN und SFLLRNPNDKYEPF, die ebenfalls am Thrombinrezeptor PAR-1 ansetzen. Sie sind Teil der Thrombinrezeptorsequenz, die durch die Endoprotease Thrombin am PAR-1 freigelegt wird. Bei einem Vergleich zwischen SFLLRN und Thrombin als Aktivatoren stellte sich insgesamt heraus: SFLLRN degranuliert hauptsächlich, wohingegen Thrombin die ganze Thromboxankaskade, Aggregation der Plättchen und Fibrinbildung initiiert. Das synthetische Peptid ist in der Lage, den Thrombin-Rezeptor PAR-1 zu aktivieren, indem es als Teil der Thrombin-Rezeptor-Sequenz das sonst durch die Endoprotease Thrombin freigelegte neue N-terminale Ende imitiert (Vu et al., 1991). Dem so über den PAR-1 aktivierten Plättchen ist es nun möglich, seinen Granulainhalt freizusetzen. Sowohl Thrombin als auch SF bewirken eine Freisetzung des Granulainhaltes der Plättchen von über 90%. Thrombin induziert außerdem die Synthese von großen Mengen von Thromboxan B<sub>2</sub>, demgegenüber bewirkt SFLLRN nur etwa 25% der Thromboxan B<sub>2</sub>-Syntheseleistung. Thromboxan B<sub>2</sub> entsteht aus dem Abbau von Thromboxan A<sub>2</sub>.

Beide Aktivatoren führten nach Stimulierung der Plättchen dazu, dass elektronenmikroskopisch Vakuolen anstelle der Granula zu sehen waren. Unter Thrombinwirkung ging jedoch die diskoide Form der Plättchen verloren und sie bildeten Aggregate. Unter Einwirkung von SFLLRN blieb die diskoide Form erhalten, es wurden keine Aggregate gebildet (Kinlough-Rathbone et al., 1993).

Für die Versuche in der hier vorliegenden Arbeit sollte das aus 14 Aminosäuren hergestellte synthetische Peptid SFLLRNDKYEPF Verwendung finden, in dem die Sequenz SFLLRN strukturell enthalten ist.

Aufgrund der verschiedenen Wirkungsweise gegenüber dem Thrombin sollte der Vergleich Aufschluss über den Wirkmechanismus der Bakterizidie geben.

## 1.2.4. Funktionen

### 1.2.4.1. Blutstillung und Blutgerinnung

Die wohl bekannteste Funktion der Plättchen ist die Teilnahme an der Blutstillung und Blutgerinnung. Sie dichten verletzte Gefäße ab und initiieren die Hämostase.

Hierbei spielen Kollagen, Thrombin und der von-Willebrand-Faktor eine wesentliche Rolle. Das Blutplättchen wird z.B. bei einer Gefäßverletzung durch subendotheliale Strukturen wie Kollagen, aber auch durch Thrombin aktiviert und vollzieht einen inneren und äußeren Formwandel oder visköse Metamorphose. Die Plättchen aggregieren und schütten ihre Granulainhalte aus. Hierbei werden u.a. vasokonstriktorische Substanzen wie Serotonin, Katecholamine und ADP frei. Die Gefäße werden also verengt und durch Plättchenaggregate verstopft. Diese zusammengeballten Plättchen bilden schließlich den „weißen“ Thrombus. Für eine endgültige Vernetzung ist Fibrinogen erforderlich, das mit dem GPIIb/IIIa der aktivierten Blutplättchen reagiert und diese irreversibel miteinander verknüpft. Fibrin bildet zusammen mit Erythrozyten und Plättchen den endgültigen „roten Thrombus“. Fibronektin und der von-Willebrand-Faktor (vWF) bewirken die Adhärenz der Plättchen an einem Defekt in der Gefäßwand (Wurzinger, 1990). So wird verletztes Gefäßendothel in wenigen Minuten abgedichtet.

### 1.2.4.2. Beteiligung an Entzündungsreaktionen und Wundheilung

Wie zuvor beschrieben enthalten die Plättchen in ihren  $\alpha$ -Granula eine große Anzahl von Mediatoren. Unter ihnen sind u.a. die Chemokine PF-4,  $\beta$ -TG, RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) sowie Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor), Angiopoietin und EGF (epidermal growth factor). Die Plättchen können jedoch nicht nur diese gespeicherten Mediatoren abgeben, sondern auch über den Arachidonsäuremetabolismus unter anderem Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  und 12-HETE (12-hydroxyeicosatetraenoic acid) herstellen (Herd und Page, 1994).

PF-4 und  $\beta$ -TG rekrutieren und aktivieren Leukozyten, Neutrophile, Monozyten, Fibroblasten und Eosinophile. Weiterhin veranlasst PF-4 Neutrophile zur Freisetzung von

Histamin und steigert die Expression von Fc-IgG- und Fc-IgE-Rezeptoren des Plättchens (Herd und Page, 1994).  $\beta$ -TG kann Neutrophile hemmen oder aktivieren. Wie  $\beta$ -TG sind auch CTAP-III und NAP-2 Spaltprodukte des platelet basic protein. Alle drei sind C-X-C-Chemokine. Chemokine sind kleine Chemoattraktor-Proteine, die besonders die Wanderung und Aktivierung von Phagozyten und Lymphozyten stimulieren (Janeway et al., 2002). Sie sind bei Entzündungsreaktionen von zentraler Bedeutung.

Die Neutrophilen haben mehr C-X-C-Rezeptoren als CC-Rezeptoren und reagieren deswegen besser auf die C-X-C-Chemokine (Brandt et al., 2000b). NAP-2, welches, durch Neutrophile konvertiert, aus  $\beta$ -TG entsteht, lockt wiederum Neutrophile an. Es bewirkt ihre Adhärenz und sorgt für die Ausschüttung lysosomaler Enzyme (Brandt et al., 2000b). Um die Neutrophilen-Aktivierung im Rahmen einer Entzündungsreaktion wieder zu limitieren, erfolgt über NAP-2 und CTAP-III später eine Down-Regulation der C-X-C-Rezeptoren der Neutrophilen (Brandt et al., 2000b).

Die CC-Chemokine RANTES und MIP-1 $\alpha$  stimulieren Plättchen dazu, cytosolisch den Kalzium-Spiegel zu steigern, zu aggregieren und den Inhalt ihrer Granula freizusetzen (Klinger und Jelkmann, 2002). RANTES lockt außerdem Basophile, Eosinophile und Monozyten an.

VEGF bewirkt eine Migration von Leukozyten und Endothelzellen, den Austritt von Plasmaproteinen aus den Gefäßen und die Bildung eines lokalen Ödems. PDGF wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und kontrolliert die Proliferation von Fibroblasten und glatten Muskelzellen (Deuel et al., 1982; Deuel und Huang, 1984). Angiopoietin bewirkt eine Proliferation der Endothelzellen. EGF unterstützt die Bildung von Granulationsgewebe.

Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  sind Vasokonstriktoren, PGE<sub>2</sub> wirkt vasodilatierend und moduliert Schmerzen (Herd und Page, 1994; Klinger, 2002).

Die elektronendichten Granula (dense bodies) setzen u.a. Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin und Histamin frei. Das ADP ist beteiligt an der Auslösung des „oxidative burst“ (= Radikalfreisetzung) der Neutrophilen (Ward et al., 1988). Serotonin und Histamin sorgen für eine zunehmende Gefäßpermeabilität im Rahmen der Entzündungsreaktion.

### 1.2.4.3. Bereits bekannte Abwehrmechanismen der Plättchen

Frühere Untersuchungen zeigten, dass eine weitere Aufgabe der Blutplättchen von Säugetieren in der Abwehr von körperfremdem Material liegt. Hirsch berichtete 1960, dass plättchenfreies Kaninchenserum nur nach Zugabe von Plättchen und Blutplasma bakterizid wurde, nicht aber nach Zugabe von Leukozyten. Nach diesem anfänglichen Hinweis gab es in den letzten fast fünf Jahrzehnten viele Untersuchungen, um den Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Bakterizidie genauer zu ergründen. Man stellte fest, dass Bakterien potente Stimuli der Plättchenaggregation sind und von diesen in Aggregate eingeschlossen werden (Clawson und White, 1971).

Dieses Zusammenhaften von Plättchen und Bakterien wurde als reinigende Funktion in der Blutzirkulation interpretiert, zur Reduzierung des Risikos einer Septikämie (Clawson und White, 1971; Page, 1989). Man fand außerdem eine hitzestabile bakterizide Aktivität des Blutes und konnte zeigen, dass diese von kationischen Proteinen der Plättchen stammte, die bei deren Aggregation in die Blutstrombahn abgegeben wurden (Weksler und Nachman, 1971). Dass Plättchen schnell blutfremde Partikel, auch Mikroorganismen, eliminieren konnten, nachdem diese in die Blutbahn gelangt waren, bestätigten auch Copley und Witte 1976. Am Beispiel von Latexpartikeln kam der Verdacht einer möglichen Phagozytose durch Plättchen auf (Lewis et al., 1976; White und Clawson, 1981).

Eine Abwehrfunktion durch Bildung von Plättchenaggregaten und Adhäsion von Mikroorganismen sowie eine mögliche Phagozytose vermutete auch Copley 1979. Allerdings gab er schon zu bedenken, dass die Phagozytose-ähnliche Aufnahme von Partikeln in das Plättchen möglicherweise nur eine Aufnahme in das OCS sein könnte (Copley, 1979).

Blutplättchen wurden bereits 1990 von Wurzinger als Teil des unspezifischen Abwehrsystems bezeichnet.

Herd und Page vermuteten 1994 ebenfalls, dass die Abwehr von Blutplättchen gegenüber körperfremdem Material, insbesondere Bakterien, mit ihrer Fähigkeit, sich an körperfremdem Material anzulagern und dies zu phagozytieren, zusammenhängt.

Dass Plättchen infektiöse Mikroorganismen binden und aufnehmen können, zeigten auch Youssefian et al. 2002 am Beispiel von *Staphylococcus aureus* und HIV.

Eine französische Arbeitsgruppe beschrieb eine weitere, bisher unbekannt Funktion der Blutplättchen: Eine IgE-abhängige zytotoxische Reaktion gegenüber *Schistosoma mansoni*

(Joseph et al., 1983; Joseph et al., 1985). Diese wird über einen spezifischen IgE- Rezeptor auf der Plättchenoberfläche und das Membranprotein GPIIb/IIIa vermittelt (Capron et al., 1985; Capron et al., 1987). Außerdem gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von freien Radikalen bei der Abwehr von Wurminfestationen durch Plättchen (Cesbron et al., 1987; Joseph et al., 1993).

Eine andere mögliche Strategie der Plättchen zur Abwehr von Mikroorganismen ist die Ausschüttung von antimikrobiellen Peptiden (AMP).

1992 isolierten Yeaman et al. die PMP (platelet microbicidal proteins) und untersuchten ihre Charakteristika. Sie fanden heraus, dass die PMP ein niedriges Molekulargewicht haben, hitzestabil sind, kationisch sind und eine starke bakterizide Wirkung auf einen hohen Anteil von *Staphylococcus aureus*-Isolaten haben (Yeaman et al., 1992a). Desweiteren stellten sie fest, dass die PMP die Wirkung von Antibiotika auf *S. aureus* verstärkten und den postantibiotischen Effekt in *S. aureus* verlängerten (Yeaman et al., 1992b).

Die PMP, die von Kaninchenplättchen nach Aktivierung mit Thrombin *in vitro* ausgeschüttet wurden, haben eine Größe von 6-9 kD. *In vitro* konnten die PMP *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* abwehren (Yeaman, 1997).

Auch in humanen Plättchen wurden antibakterielle Proteine gefunden, die sich mittels Thrombin-Aktivierung aus den  $\alpha$ -Granula freisetzen ließen (Tang et al., 1995; Krijgsveld et al., 2000; Tang et al., 2002). Aus thrombinstimulierten Plättchen bestimmten Tang und Mitarbeiter verschiedene, u.a. gegen *E.coli* antimikrobiell wirkende Proteine, und identifizierten diese als PAF-4, RANTES, CTAP-III, PBP, Thymosin  $\beta$ -4 (T $\beta$ -4), Fibrinopeptid A (FP-A) und Fibrinopeptid B (FP-B).

Krijgsveld et al. konnten 2000 zwei Proteine isolieren und bezeichneten sie als Thrombocidine (TC-1 und TC-2). Sie sind C-terminale Deletionsprodukte der C-X-C-Chemokine NAP-2 und CTAP-III und wirkten *in vitro* bakterizid gegenüber *B.subtilis*, *E.coli*, *S.aureus*, *Lactococcus lactis*, sowie fungizid gegenüber *Cryptococcus neoformans*.

Die Bedeutung der Plättchen in der Infektionsabwehr für die Situation *in vivo* lässt sich z.B. an folgender Studie erkennen: Thrombozytopenische Kaninchen reagierten empfindlicher gegenüber einer Streptokokken-Endocarditis als eine Vergleichsgruppe mit normaler Anzahl von Blutplättchen (Sullam et al., 1993).

PF-4, PBP und seine Spaltprodukte (z.B. CTAP-III), sowie RANTES sind als Kinozidine bezeichnet worden, diese Bezeichnung beinhaltet die Kombination aus ihren

mikrobioziden und chemokinen Funktionen (Yount et al., 2004). Sie haben Anteil an der Koordination der molekularen und zellulären antimikrobiellen Abwehr.

Die Verbindung zum leukozytären System wird durch PAF (Platelet Activating Factor) hergestellt, der von aktivierten Plättchen, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen sezerniert wird (Benveniste et al., 1982).

#### 1.2.4.4. Interaktion mit Leukozyten, Endothelzellen und Bakterien

Eine Entzündungsreaktion beinhaltet Chemotaxis, Adhäsion und Interaktionen zwischen Leukozyten, Endothelzellen und Plättchen an der Gefäßwand. Die Plättchen nehmen an diesen Abläufen teil, indem sie eine adhäsive Oberfläche zur Verfügung stellen, adhärente Leukozyten stimulieren und die Chemokinsynthese der Leukozyten und Endothelzellen regulieren (Klinger und Jelkmann, 2002).

In den Komplexen aus Plättchen und Neutrophilen im zirkulierenden Blut sind Interleukin 1 (IL-1),  $\beta$ -TG und Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF) von Plättchen stammende Mediatoren, welche die Leukozyten stimulieren (Peters et al., 1999). Diese Plättchen-Neutrophilen-Komplexe haben stärker ausgeprägte Adhäsionsmoleküle, größere Fähigkeit zur Phagozytose und produzieren mehr freie Sauerstoffradikale als Neutrophile alleine (Peters et al., 1999).

Die hauptsächlichen Plättchenrezeptoren für Zell-Zell-Kontakte sind das Glykoprotein IIb/IIIa und P-Selektin. Wird das Plättchen stimuliert, werden beide Rezeptoren im aktiven Zustand an der Oberfläche exprimiert. Z.T. binden sie direkt an andere Zellen, z.T. erfolgt die Bindung über Brückenmoleküle, wie z.B. Fibrinogen.

Stimulierte Plättchen induzieren die Sekretion von Mediatoren aus Endothelzellen und die Expression inflammatorischer Adhäsionsmoleküle auf der Endotheloberfläche. So tragen die Plättchen direkt zur Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion bei, indem sie adhäsive Rezeptoren auf ihrer eigenen Membran exprimieren und indirekt, indem sie die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren (Gawaz et al., 1998; Henn et al., 1998).

Blutplättchen können außerdem eine Bindung mit Bakterien eingehen. Beispiele hierfür sind die Bindung von *Yersinia pseudotuberculosis*, die über Invasin vermittelt wird (Simonet et al., 1992), und die Bindung von *Borrelia burgdorferi* an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Coburn et al., 1993; Coburn et al., 1994).

Ergänzend spielen Plättchen eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen, z.B. der Hyperreagibilität der Atemwege (Herd und Page, 1994), und es wurde eine Beteiligung bei der Bekämpfung von Tumorzellen *in vitro* beobachtet (Sagawa et al., 1990).

Die Teilnahme an Blutungsstillung und Wundheilung ist also nur eine der Funktionen der Plättchen. In dieser vorliegenden Arbeit soll insbesondere auf die Abwehrfunktion gegenüber Bakterien eingegangen werden.

### 1.3. Borrelien

Nachdem sich in Lyme, Connecticut (USA) 1974 und 1975 Fälle von Arthritis bei Kindern häuften, fiel im Rahmen von Nachforschungen ein Zusammenhang mit vorausgegangenen Zeckenbissen auf. Hinzu kamen in den Monaten von Juni bis September vermehrt typische Hauterscheinungen, neurologische und kardiale Beschwerden. Diese Beobachtungen wurden vorwiegend in waldreichen Gebieten gemacht.

1981 gelang es erstmals Willy Burgdorfer, eine bis dahin unbekannte Spirochäte aus dem Darm von Zecken (*Ixodes dammini*) anzuzüchten und mit der „Lyme Disease“ in Verbindung zu bringen (Burgdorfer et al., 1982). Sie wird *Borrelia burgdorferi* genannt. Die einzelnen Aspekte der vielgestaltigen Systemerkrankung, deren Erreger *B.burgdorferi* ist, waren schon vorher bekannt. Man hatte sie jedoch bislang noch nicht miteinander und mit einem Bakterium in Verbindung gebracht (Burgdorfer et al., 1982; Hayes et al., 1983).

Borrelien verursachen über Vektoren übertragene Zoonosen. *Borrelia burgdorferi* ist der Erreger der Lyme-Borreliose. Sie ist die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit in der nördlichen Hemisphäre (Wilske, 2005). Als Vektor dient die Schildzecke, auch Holzbock genannt. In Mitteleuropa ist es *Ixodes ricinus*.

Als Erregerreservoir werden kleine Nagetiere und Vögel angesehen. Hier infizieren sich die Zecken, die den Erreger zunächst in ihren Darm aufnehmen und dann auf ein anderes Tier oder auf den Menschen übertragen. Andere Tiere wie Rehe und Hirsche spielen eine wichtige Rolle als Wirtstiere für Zecken (RKI, 2007). Die Zecken sind dreiwirtig, d.h. sie durchlaufen die Stadien Larve, Nymphe, adulte Zecke und befallen jeweils einen frischen Wirt (Bennet, 1995). Im Körper der Zecke können sich die Borrelien vermehren (Barbour und Hayes, 1986).

Die Lyme-Borreliose, die aufgrund der Vielfalt ihrer Symptome schon als „Chamäleon aller Infektionskrankheiten“ bezeichnet wurde (Wilske und Fingerle, 2000), verläuft in Stadien. Die klinischen Manifestationen können isoliert oder in unterschiedlichen

Kombinationen auftreten (Wilske und Fingerle, 2000). Nachdem es für einige Tage bis Wochen zunächst zu einer um den Zeckenstich lokalisierten Hautinfektion kommt (Erythema migrans), die sich im weiteren Verlauf als Wanderröte verbreitet, disseminiert die Spirochäte in viele verschiedene Gewebe. Diese sind unter anderem die Synovia der Gelenke, das zentrale Nervensystem und das Herz (Stanek und Strie, 2003). Von den Geweben aus sind die Borrelien in der Lage, Endothel zu durchwandern und so in die Blutbahn zu gelangen (Wooten und Weis, 2001). Daher besteht *in vivo* die Möglichkeit zum direkten Kontakt mit den Blutplättchen. Aus diesem Grund boten sich für die hier durchgeführte Untersuchung insbesondere die Borrelien an. Außerdem war bekannt, dass sie an Plättchen binden können (Coburn et al., 1993; Coburn et al., 1994; Leong et al., 1998; Coburn, 2001).

Die infektiösen Stämme binden am aktivierten Plättchen an das Membranintegrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , auch als Glykoprotein IIb/IIIa bezeichnet. Die Stämme, die nicht an das Integrin gebunden haben, waren nicht infektiös (Coburn et al., 1994). Untersucht wurden in einer Studie Stämme der Spezies *Borrelia afzelii*, *garinii* und *sensu stricto*. Ein eindeutiger Zusammenhang mit OspA, OspB oder OspC für das Bindungsverhalten ließ sich nicht nachweisen (Coburn et al., 1994). Für die Bindung müssen die Plättchen vorher aktiviert sein (Coburn, 2001). Von Seiten der Borrelien kommt es vermutlich über das Oberflächenprotein p66 zur Bindung an das GP IIb/IIIa der Plättchen (Defoe und Coburn, 2001). Außerdem sind die Borrelien groß und eigenbeweglich, sie lassen sich also durch das Lichtmikroskop im Dunkelfeld gut beurteilen. Fluoreszenzmikroskopisch erscheinen sie besonders prägnant. Da es bislang mehr Untersuchungen bezüglich der plättchenvermittelten Abwehr gegen grampositive Erreger gab, waren die Untersuchungen an diesen gramnegativen Erregern vielversprechend.

### 1.3.1. Ultrastruktureller Aufbau

Borrelien sind gramnegative Schraubenbakterien. Die mikroaerophilen Spirochäten sind ungefähr 10 bis 30  $\mu\text{m}$  lang, haben lockere Windungen und einen Durchmesser von ca. 0,18 bis 0,25  $\mu\text{m}$  (Burgdorfer et al., 1982). Sie sind sehr beweglich. Lichtmikroskopisch sind sie als Nativpräparat im Dunkelfeld gut zu beobachten. Elektronenmikroskopisch zeigt sich in der Borrelie ein Plasmazyylinder, umgeben von einer äußeren Membran. Zwischen Zylinder und Membran gibt es sogenannte Endoflagellen. Es kommen bis zu 18 dieser Flagellen vor (Brade et al., 2005). Diese sind ursächlich für die Beweglichkeit

(Barbour und Hayes, 1986). Die Windungen der Schraubenbakterien entstehen durch die Endoflagellen, die an beiden Enden des Protoplasmazyinders verankert sind.

Die Art *B. burgdorferi sensu lato* kann in mindestens drei Genospezies unterteilt werden:

*B. burgdorferi sensu stricto*, *afzelii* und *garinii* (Sigal, 1998; Wilske u. Fingerle, 2000).

Für die Untersuchungen in dieser vorliegenden Arbeit wurden die Stämme *B. burgdorferi sensu stricto* B31, *B. burgdorferi garinii* B29 und *B. burgdorferi afzelii* PKo38, PKo81, PKo345 und PLe verwendet. B31 ist ein typischer nordamerikanischer Stamm aus Zecken (*I. dammini*) isoliert, B29 kommt aus europäischen Zecken (*I. ricinus*). Die übrigen Stämme sind von europäischen Patienten mit Erythema migrans (Wilske et al., 1993).

Auf molekularer Ebene konnten verschiedene für die Borrelien typischen Proteine identifiziert werden. Es finden sich spezielle Oberflächenproteine, sogenannte „outer surface proteins“ (Osp) A-G und Flagellin (Sigal, 1998). Die Osp werden je nach Fütterungszustand der Zecke und je nach Temperatur des umgebenden Milieus unterschiedlich exprimiert: Im Darm der Zecke prägen die Borrelien hauptsächlich Osp A aus. Wandern sie jedoch während des Zeckenbisses in die Speicheldrüsen der Zecke oder den menschlichen Körper, sinkt die Expression von Osp A, dafür wird vermehrt Osp C ausgeprägt (de Silva und Fikrig, 1997; Fingerle et al., 1998; Obonyo et al., 1999; Fingerle et al., 2000; Kramer et al., 2000). Osp C wird auch bei Anstieg der Temperatur von 31°C auf 37°C vermehrt ausgeprägt (Obonyo et al., 1999). In der Zellkultur exprimieren die Borrelien vorwiegend Osp A und Osp B (de Silva und Fikrig, 1997). Bei hohen Passagen in der Zellkultur verändern sich die Eigenschaften der Borrelien, so kommt es zu einem Verlust von Pathogenität und Infektiösität der Erreger (Johnson et al., 1984; Güner, 1994). Der Wandel der Osp-Expression während der Mahlzeit der Zecke von Osp A zu Osp C korreliert ebenfalls mit steigender Infektiösität für Säugetiere (Obonyo et al., 1999).

## 1.4. Reaktive Sauerstoffspezies

### 1.4.1. ROS

Die Abkürzung ROS steht für reactive oxygen species (= reaktive Sauerstoffspezies). Sie umfasst unterschiedliche Moleküle, wie z.B. die toxischen Sauerstoffprodukte Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder das Stickstoffmonoxid NO. Diese wirken, in phagozytierenden Zellen produziert, direkt toxisch auf Bakterien (Janeway et al., 2002). Sie werden von lysosomalen NADPH-Oxidasen und anderen Enzymen abgegeben. Dieser Prozeß ist bekannt als „respiratory burst“ (=Radikalfreisetzung), da währenddessen der Sauerstoffverbrauch vorübergehend zunimmt (Janeway et al., 2002).

### 1.4.2. ROS im Blutplättchen

Nicht nur die primär als Phagozyten bekannten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen produzieren die reaktiven Sauerstoffspezies, sondern auch Plättchen (Marcus et al., 1977; Iuliano et al., 1997). Die ROS entstehen vorwiegend durch die NAD(P)H-Oxidase (Pulcinelli et al., 2001; Krötz et al., 2002). Die Bildung von z.B.  $O_2^-$  ist außerdem abhängig vom Arachidonsäuremetabolismus (Caccese et al., 2000).

In Anlehnung an die bakteriziden Fähigkeiten der Phagozyten lag also der Verdacht nahe, dass die ROS der Plättchen Einfluss auf die plättchenvermittelte Abwehr haben würden, bzw. sogar deren Ursache sein könnten. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, sollten den Plättchen Antioxidantien hinzugefügt werden, damit möglicherweise ein verändertes Abwehrverhalten auffallen würde.

### 1.4.3. Antioxidantien

Die Vitamine C und E sind als Antioxidantien und Radikalfänger bekannt (Löffler und Brigelius-Flohe, 2007). Damit der Einfluss freier Radikale aus Stoffwechselvorgängen der humanen Blutplättchen auf das plättchenabhängige Killing der Bakterien ausgeschlossen werden konnte, wurden diese Antioxidantien in einer Versuchsreihe zur Hemmung der freien Radikale eingesetzt.

#### 1.4.4. Vitamin C

L-Ascorbinsäure ist ein wasserlösliches Vitamin, das in großen Mengen z.B. in grünen und roten Paprikaschoten, Tomaten, Petersilie, Zitronen und Spinat vorkommt. Der tägliche Bedarf in der Nahrung eines Erwachsenen beträgt im optimalen Fall etwa 75 mg pro Tag, der tägliche Minimalbedarf zur Verhinderung des Skorbut beträgt 10 mg. Ascorbinsäure wirkt biochemisch als starkes Reduktionsmittel.

Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wird eine protektive Eigenschaft der Ascorbinsäure vermutet, da sie am Kollagenstoffwechsel beteiligt ist (Schindler et al., 2002). Auch ein direkter Effekt auf Plättchenaggregation und –adhäsion ist schon untersucht worden. So fanden Bordia und Verma 1985 bei oraler Ernährungsergänzung von 1g Vitamin C alle 8 Stunden über 10 Tage bei Versuchspersonen eine verminderte Plättchenaggregation und -adhäsion gegenüber der Kontrollgruppe. Daraufhin vermuteten sie, dass Vitamin C einen präventiven Effekt auf arteriosklerotische Prozesse haben kann. 2002 untersuchten Schindler et al. die Wirkung von Vitamin C als Antioxidans im humanen Plasma auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern. Es wurden einmalig 3 g Vitamin C gelöst in physiologischer Kochsalzlösung intravenös verabreicht. Sie fanden einen hemmenden Einfluß auf die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation. Dies deutete ebenfalls auf eine protektive Wirkung von Vitamin C bei der Entwicklung der koronaren Herzerkrankung hin. Bekannt ist auch die antioxidative Wirkung gegenüber Guanin (Bland, 1998) nach Supplementierung von 500 mg Vit. C täglich.

Diese bekannten Ergebnisse ließen vermuten, daß L-Ascorbinsäure für Versuche an den Plättchen zur Ermittlung des Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Abwehr als Radikalfänger bzw. Antioxidans dienen könnte.

#### 1.4.5. Vitamin E

Vitamin E wurde vor etwa 80 Jahren entdeckt und ist als effektives Antioxidans bekannt (Steiner, 1993). Tocopherol (Vitamin E) ist ein lipidlösliches Vitamin. Der tägliche Bedarf für einen Erwachsenen beträgt 25-30 mg. Besonders viel Tocopherol ist in Weizen enthalten. Tocopherole können in Tocoquinone umgewandelt werden und bei diesen Reaktionen insgesamt zwei Elektronen abgeben und so die Reaktionspartner reduzieren. So können sie freie Radikale von der oxidativen Schädigung von Membranfettsäuren

abhalten (Tappel, 1972; Löffler und Brigelius-Flohe, 2007). Hierbei muss allerdings in einem Zwischenschritt das Tocopherylradikal mit Ascorbat oder Glutathion reduziert werden. Diskutiert werden derzeit präventive Effekte von Vitamin E bei kardiovaskulären Erkrankungen oder Neoplasien. Im Zusammenhang von Vitamin E mit Plättchen ist bereits ein hemmender Einfluss auf Plättchenaggregation (Steiner, 1991; Calzada et al., 1997; Williams et al., 1997), Plättchenadhäsion (White et al., 1979; Jandak et al., 1988 und 1989; Steiner, 1992) und auf die Thromboxansynthese (White et al., 1977 und 1979) festgestellt worden. Die Präinkubation von Plättchen mit  $\alpha$ -Tocopherol, der biologisch aktiven Unterform, inhibierte *in vitro* die Plättchenaktivierung durch z.B. ADP, Fibrinogen, Kollagen, Thrombin. Das zeigte sich in verminderter Freisetzung von Granula (Steiner, 1993), verminderter Aggregation (Calzada et al., 1997; Williams et al., 1997) und verminderter Ausbildung von Pseudopodien und Adhäsion (White et al., 1979; Jandak et al., 1989; Steiner, 1992). Die durch  $H_2O_2$  ausgelöste Plättchenaggregation konnte ebenfalls durch Vitamin E unterbunden werden (Higashi und Kikuchi, 1973).

1999 untersuchten Williams et al. die Effekte von Vitamin E und Vitamin C auf Plättchen *in vitro*. Auch in dieser Studie wiesen mit Vitamin E präinkubierte Plättchen, die mit ADP, Kollagen oder Thrombin stimuliert worden waren, eine signifikant geringere Aggregation, Adhäsion und Pseudopodienbildung auf. Es fiel jedoch auf, dass sich Aggregation und Adhäsion durch Vitamin C nicht signifikant mindern ließen.

Klinisch bedeutsam ist der Einfluss von Vitamin E auf die Plättchenadhäsion und die Produktion von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. P-Selektin. Im Vergleich zweier Patientengruppen nach PTCA, von denen eine über vier Wochen oral eine Vitamin-E-Supplementierung bekam, die andere Gruppe aber nur ein Placebo (Sojabohnenöl), zeigte sich, dass bei der Placebogruppe der P-Selektin-Spiegel signifikant nach PTCA anstieg, nicht jedoch bei der Gruppe, die Vitamin E bekam (Ferns et al., 2000).

## 1.5. Fragestellung

Humane Blutplättchen können auf vielfältige Weise an der unspezifischen Abwehr gegen eingedrungene Pathogene teilnehmen. Sie vermögen Krankheitserreger aufzunehmen und reaktive Sauerstoffspezies freizusetzen, sie geben nach Thrombin-Stimulierung mikrobiozide Peptide ab, sie interagieren mit dem Komplementsystem und über freigesetzte Chemokine mit Leukozyten und anderen Komponenten der spezifischen Immunabwehr. Die freigesetzten mikrobioziden Peptide (platelet microbicidal protein = PMP), ihr Wirkmechanismus und ihr Wirkspektrum sind bei verschiedenen Säugetieren z.T. gut untersucht, entsprechende Kenntnisse über humane Plättchen sind dagegen erst wenige vorhanden.

Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass humane Blutplättchen Borrelien der Stämme *Borrelia garinii* B29, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 und *Borrelia afzelii* PLe abwehren konnten.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen nun die bereits genannten und weitere ausgesuchte Borrelienstämme auf ihre Sensitivität gegenüber der humanen plättchenvermittelten Abwehr untersucht werden. Dabei handelt es sich um die Stämme B29, B31, PLe sowie *Borrelia afzelii* PKo38, PKo81 und PKo345. Hierbei stellt sich die Frage, ob die Stämme aus Zeckenisolaten (B29 und B31) anders reagieren als die übrigen Stämme, die aus Patienten isoliert sind. Zudem soll geklärt werden, ob Veränderungen der Infektiösität / Pathogenität einzelner Bakterienstämme, wie sie nach längerer *in-vitro*-Kultivierung (PKo81 und PKo345) beobachtet werden, mit einer veränderten Sensitivität der Mikroorganismen gegenüber der plättchenvermittelten Abwehr einhergehen.

Schließlich soll der theoretisch mögliche Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Abwehr gegenüber Borrelien herausgearbeitet werden. Zu diesem Zweck werden Teilaspekte der Thrombinwirkung gezielt ausgeschlossen (Stimulierung nur über PAR-1 durch ein synthetisches Peptid).

Desweiteren werden mögliche Effekte von Sauerstoffradikalen durch Einsatz von Antioxidantien ausgeschaltet.

Abschließend erfolgen ultrastrukturelle Untersuchungen, um die Reaktionsabläufe zwischen Plättchen und Borrelien auch qualitativ morphologisch genau zu beschreiben.

## ***II. Material und Methoden***

### 2.1. Borrelienkulturen

#### 2.1.1. Borrelienisolate aus Zecken

Die aus Zecken isolierten Stämme von *Borrelia garinii* B29 und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 stellte Dr. Michael Rittig (Nottingham, UK) zur Verfügung. Die Borrelien wachsen in einem modifizierten BSK-H-Medium (BioConcept, Umkirch, Deutschland), das mit 6,25 % Kaninchenserum (BioConcept) und 2 mmol/l L- Glutamin (SIGMA) angereichert ist. Die Kulturen befinden sich im Brutschrank bei 37°C und werden regelmäßig anhand folgender Kriterien auf ihren Zustand überprüft: Beweglichkeit, Zelldichte, Anzahl toter Borrelien (unbeweglich, strichförmig), Kontaminationen. Zweimal wöchentlich werden die Stämme mit neuem Medium überimpft. Die Konzentration der Borrelien in Kultur betrug durchschnittlich  $2-3 \times 10^7$ /ml.

#### 2.1.2. Borrelienisolate aus Patienten

Die aus der Haut von Patienten mit Erythema migrans isolierten verschiedenen Passagen des Stammes *Borrelia afzelii* PKo38, PKo81, PKo345 sowie *Borrelia afzelii* PLe erhielten wir von Prof. Dr. Bettina Wilske vom Max-von-Pettenkofer-Institut für Mikrobiologie, LMU München. Diese Patientenisolate wachsen in einem modifizierten Kelly-Medium (MKP-Medium; Praec-Mursic et al. 1986). Dieses wurde ebenfalls aus München bezogen. Unter den verschiedenen PKo- Passagen finden sich frühe (PKo38 ) sowie späte (PKo81 und PKo345). PKo345 ist nicht in der Lage, das Oberflächenprotein Osp C zu exprimieren (Fingerle et al. 2000).

Diese Kulturen wurden ebenso wie die Zeckenisolate regelmäßig auf ihren Zustand überprüft und zweimal wöchentlich mit Medium überimpft. Sie gedeihen im Brutschrank bei 33°C am besten.

## 2.2. Thrombozytenpräparate

Einzelspender-Thrombozytenkonzentrate (TK) wurden vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin des UKL mit freundlicher Unterstützung von Herrn PD Dr. Peter Schlenke und Zustimmung der Spender zur Verfügung gestellt.

Die Herstellung der für diese Arbeit verwendeten TK fand mit Hilfe von zwei technisch verschiedenen Präparationsverfahren statt. Es wurden zunächst gepoolte Präparate verwendet, die aus Vollblutspenden gewonnen wurden. Die Herstellung dieser Präparate wurde dann eingestellt, so dass für alle weiteren Versuche Präparate vom Zellseparator Verwendung fanden.

### 2.2.1. Thrombozytenkonzentrate aus Buffy- Coats

Zur Herstellung der Einzel- Thrombozytenkonzentrate wird zunächst durch eine Vollblutspende 450 ml Vollblut gewonnen. Dieses wird für 8 Min. bei 4500 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgt die Fraktionierung der Vollblutbestandteile durch den automatischen Extraktor (Optipress®, Baxter, München) in Erythrozytenkonzentrat, Plasma und den Buffy- Coat (BC) in die entsprechenden Beutel. Der Buffy- Coat enthält Leukozyten und Thrombozyten. Zu dem BC- Beutel werden 50 – 60 ml Plasma des Spenders dazugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für 2 Min. bei 500 x g wird der plättchenreiche Plasmaüberstand in den Lagerungsbeutel überführt. Diesen Thrombozytenlagerungsbeutel (Hemocare, T- 2813, Fresenius) lagert man bei  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  im Thrombozytenschrank, bis er etikettiert und infektionsserologisch freigegeben ist.

### 2.2.2. Apherese- Präparate

Sie werden durch maschinelle Thrombapherese mit Hilfe des Zellseparators Amicus™ (Baxter, Biotech, München) gewonnen. Bei diesem Verfahren beträgt das entnommene und an den Spender zurückgeführte Gesamtblutvolumen 3500 ml. Zur Antikoagulation wird eine ACD- Lösung im Verhältnis 1:10 verwendet. Innerhalb von 20 Minuten nach Separation werden die Thrombozyten vom Spenderbeutel in einen Lagerungsbeutel (Lifecell PL- 2410, Baxter, Brüssel, Belgien) überführt und mit 300 ml Plättchen- additiver Lösung PAS 2 oder mit 200 ml autologem Plasma resuspendiert.

Die TK enthalten durchschnittlich  $6 \times 10^8$  Plättchen /ml und sind 5 Tage haltbar. Sie wurden frisch, also spätestens am ersten Tag nach der Herstellung, verwendet.

### 2.3. Plättchenstimulation

#### 2.3.1. Plättchenvermittelte Bakterizidie gegenüber verschiedenen Borrelienstämmen

Ziel war die quantitative Ermittlung der bakteriziden Wirkung der Plättchen auf verschiedene Borrelienstämmen, die einerseits aus der Zecke und andererseits aus humaner Haut isoliert wurden. Die Inkubationen erfolgten für 30 Minuten auf Objektträgern in einer feuchten Kammer. Für die Vergleiche zwischen Borrelienisolaten aus Zecken und denen aus Erythema migrans von Patienten betrug die Zahl der Versuche zwischen  $n = 18$  und  $n = 20$ . Die Versuchsanzahl war abhängig vom Zustand der Bakterienkulturen. Sie betrug für den Stamm *PLe*  $n = 18$ , für *PKo81*  $n = 19$  und für *PKo38*, *PKo345*, *B29* und *B31*  $n = 20$ . Die Anzahl  $n$  ist die Anzahl der Thrombozytenkonzentrate unterschiedlicher Spender, mit denen jeweils sämtliche Stämme getestet wurden. Es wurde nie zweimal mit dem gleichen Spenderpräparat getestet. In diesen Versuchen erfolgte stets eine Stimulation der Plättchen mit Thrombin.

Versuchsablauf:

- 5  $\mu$ l Borrelien und 5  $\mu$ l Thrombozyten auf dem zuvor in Ethanol gereinigten Objektträger vermischen
- zur Stimulation der Plättchen Thrombin in einer Endkonzentration von 2 U/ml hinzufügen
- diese Inkubation 30 Min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchführen

Die oben genannte Konzentration von 2 U/ml Thrombin hatte sich in Vorversuchen als potente Anregung für die Plättchen erwiesen. Geringere Mengen hatten entsprechend geringere Effekte erzielt und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten bei einer Endkonzentration von 2 U/ml eine starke Anregung der Plättchen mit fast kompletter Degranulation.

Um in Kontrollpräparaten den tatsächlichen Einfluß der Thrombin-stimulierten Plättchen auf die Borrelien zu überprüfen, gab es zur Kontrolle Koinkubationen von Borrelien mit Thrombin ohne Plättchen. So ließ sich der Einfluß des Thrombins alleine auf die Borrelien

überprüfen. Thrombin ist eine hochaktive Protease, die in kurzer Zeit große Mengen Fibrinogen in Fibrin umwandeln kann (Petrides, 2007).

Aus Vorversuchen der Arbeitsgruppe war bekannt, dass Plättchen, die nicht mit Thrombin angeregt wurden, zwar auch schädigend auf die Borrelien einwirken konnten, aber in wesentlich geringerem Ausmaß.

### 2.3.2. Experimente zur Ermittlung des Wirkmechanismus der Bakterizidie

#### 2.3.2.1. Modelle zur Aktivierung der Plättchen

Zur qualitativen Untersuchung der bakteriziden Effekte der Blutplättchen wurden, vergleichend zu den Inkubationen mit Thrombin, Inkubationen mit einem synthetischen Thrombin-Rezeptor-Agonisten, der die Plättchen hauptsächlich degranuliert (Kinlough-Rathbone et al., 1993), durchgeführt.

Für die selektive Degranulation der Plättchen wurden je 5 µl Borrelien der Stämme *B29*, *B31* und *PK038* mit 5 µl Plättchen vermischt und anschließend das synthetische Peptid SFLLRNPNDKYEPF (SF) in einer Endkonzentration von 500 µmol/l hinzugefügt. In Vorversuchen zeigte sich bei dieser Konzentration eine durchschnittliche Degranulation der Plättchen von ca. 75% im Transmissionselektronenmikroskop (TEM).

Auch hier wurden Kontrollen mit Borrelien und Aktivator ohne Plättchen durchgeführt. Dabei betrug die Anzahl der Versuche, gleichbedeutend mit der Anzahl der Thrombozytenkonzentrate unterschiedlicher Spender, n = 10.

#### 2.3.2.2. Untersuchungen zum Einfluss freier Radikale auf die Bakterizidie

Um die Wirkung freier Radikale aus Stoffwechselfvorgängen der humanen Blutplättchen gezielt ausschließen zu können, erfolgten weitere Versuchsreihen. Hierzu fanden die Vitamine C und E Verwendung, die als Antioxidantien und Radikalfänger bekannt sind. Sie wurden mit Plättchen, Thrombin und den Borrelien koinkubiert.

In einer Vorversuchsreihe konnten mit den verwendeten Substanzen L-Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in Chloroform und  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in Sojabohnenöl anhand von Dosis-Wirkungs-Kurven die effektivsten Konzentrationen ermittelt werden.

Für Vitamin C wurden 0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM und 250 mM ausgetestet.

Für Vitamin E gelöst in Chloroform beobachtete man ebenfalls effektive Endkonzentrationen von 0 mM, 5 mM, 10 mM, 50 mM, 100 mM und 250 mM.

Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl wurde entsprechend untersucht.

Aus dieser Vorversuchsreihe zeigte sich, welche Mengen den größten Effekt auf die Bakterizidie haben, bzw. dass, unabhängig von der Konzentration, kein Effekt zu erwarten ist.

#### a) Prä- Inkubationen mit Vitamin C

Verwendung fand in PBS gelöste Ascorbinsäure in einer wirksamen Konzentration von 100 mM. Sie wurde mit 180 µl Plättchen für 20 Min. vorinkubiert. Als Kontrollpräparat diente eine Inkubation von 180 µl Plättchen nur mit 20 µl PBS. Anschließend wurden je 5 µl dieser vorbehandelten Plättchen entnommen, mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert und mit 5 µl Borrelien der Stämme *B29* und *B31* für 30 Min. inkubiert (n = 5).

#### b) Prä- Inkubationen mit Vitamin E

198 µl Plättchen wurden mit 10 mM  $\alpha$ -Tocopherol, gelöst in Chloroform, 60 Min. präinkubiert. Zu dieser Versuchsreihe wurden Kontrollen durchgeführt, in denen 198 µl Plättchen nur mit 2 µl Chloroform vorinkubiert waren. Anschließend wurden je 5 µl dieser vorbehandelten Plättchen entnommen, mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert und mit 5 µl Borrelien der Stämme *B29* und *B31* für 30 Min. inkubiert (n = 5).

Diese Versuchsreihe mit  $\alpha$ -Tocopherol, gelöst in Chloroform, führte auf den Objektträgern häufig zu massiven Artefakten. Mikroskopisch, z.T. auch schon makroskopisch erkennbar, imponierten weiße Flecken von ausgefallten Proteinen unter dem Deckgläschen, so dass die übrigen Strukturen, wie z.B. Borrelien, nicht mehr beurteilt werden konnten.

Obwohl Chloroform allein mit den Borrelien unter dem Lichtmikroskop nachweislich keinen schädigenden Einfluß auf die Bakterien ausgeübt hat, wurde eine weitere Versuchsreihe mit Vitamin E durchgeführt. So fand ein anderes Vitamin E-Präparat, bereits in Sojabohnenöl gelöst, Verwendung. 180 µl Plättchen und 20 µl von diesem  $\alpha$ -Tocopherol, gelöst in Öl, wurden bei einer Endkonzentration von 0,1 U/µl für 60 Min. präinkubiert. Umgerechnet in mol bedeutet dies eine Endkonzentration von 156 nmol. Die Konzentration des  $\alpha$ -Tocopherol beträgt in diesem Präparat ca. 670 mg/g. Hier

erfolgte ein Vergleich mit 180 µl Plättchen und 20 µl Sojaöl, um die Wirkung des Vitamin E als normalem Nahrungsbestandteil zu überprüfen. In 1g Sojabohnenöl sind durchschnittlich 0,076 mg  $\alpha$ -Tocopherol enthalten (Information von Fauser Vitaquell, Hamburg).

Anschließend wurden je 5 µl dieser vorbehandelten Plättchen mit 5 µl Borrelien der Stämme *B29* und *B31* für 30 Min. inkubiert und mit Thrombin (2 U/ml) stimuliert (n = 5).

In dieser Versuchsreihe zum Einfluss freier Radikale auf die Bakterizidie wurden neben den Präparaten mit Antioxidantien bestimmte Kontrollpräparate ausgewertet. Einerseits zeigte sich in jedem Experiment der Zustand der Bakterienkultur durch Kontrollen mit Borrelien und Thrombin ohne Plättchen. Andererseits ließ sich eine intakte Abwehrfunktion der Plättchen vom jeweiligen Spender für den Versuch durch Kontrollpräparate mit Borrelien, unbehandelten Plättchen und Thrombin belegen.

#### 2.4. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Beurteilung der Vitalität der Bakterien wurde das DNA - Farbstoffgemisch LIVE/DEAD®BacLight™ Viability Kit (L- 7012) der Firma Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA verwandt. Durch seine zwei Komponenten SYTO 9 und Propidiumjodid im Verhältnis 1:6 bewirkt es eine Fluoreszenzdoppelmarkierung. Nutzt man SYTO 9 einzeln, würde es alle Bakterien einer Population grün markieren. Im Gegensatz dazu durchdringt Propidiumjodid nur geschädigte Bakterienmembranen und verdrängt dann SYTO 9 aus der Bindung an die DNA. Das Farbstoffgemisch dient also als Indikator für eine gestörte Zellmembranpermeabilität. Hiermit durchgeführte Untersuchungen korrelieren gut mit dem Prozentanteil toter Bakterien in der Kultur (Molecular Probes, product information). Die Emissionsmaxima für SYTO 9 sind bei 500 nm, für Propidiumjodid 635 nm.

## 2.5. Mikroskopische Auswertung der Präparate

Nach der Inkubationszeit von 30 Min. erfolgte für die verschiedenen Versuchsansätze die gleiche Art der Färbung und Fixierung. Zunächst wurden 10 µl des Farbstoffs LIVE/DEAD® BacLight™, 200fach verdünnt in PBS, hinzugefügt. Nach einer kurzen Einwirkzeit von 2 Min. wurde mit 2 µl von 10%igem Paraformaldehyd, gelöst in PBS, fixiert.

Die Untersuchung und Dokumentation der Präparate erfolgte am Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) in einer Vergrößerung von 630 x bzw. 1000 x mit einer elektronischen Kamera (AxioCam, AxioVision 2.05, Carl Zeiss Oberkochen, Deutschland). Pro Objektträger wurden 10 Gesichtsfelder per Zufall ausgewählt und jeweils 100 bis 500 Bakterien ausgezählt.

Die Stämme *PLe*, *PKo38*, *PKo81* und *PKo345*, die aus menschlichen Hautbiopsien angezüchtet waren, wiesen meist geringere Konzentrationen in der Kultur auf als die Zeckenisolate, die im Allgemeinen etwas weniger anspruchsvoll in der Züchtung sind.

Für jeden Stamm wurden pro Versuch die Werte von drei Objektträgern gemittelt und mit der natürlichen Absterberate der Borrelien in der Kultur (*nA*) in Bezug gesetzt. Es kam eine bestimmte Formel zur Anwendung, um die effektive Absterberate zu ermitteln:

Experimentinduzierte Absterberate ( $eA - nA$ ) / (100 -  $nA$ ) = effektive Absterberate.

Die effektive Absterberate wird mit verschiedenen Abkürzungen bezeichnet, die gleichzeitig Hinweis auf das verwendete Stimulans enthalten.

Die Anzahl *nA* entspricht der natürlichen Absterberate der Bakterien in ihrer Kultur unmittelbar vor dem Versuch, die experimentinduzierte Absterberate (*eA*) entspricht dem Mittelwert der nach dem Experiment beobachteten Absterberate von Borrelien der drei ausgezählten Objektträger. Die durch die Formel errechneten Werte für jeden Stamm bei jedem Versuch entsprechen dem tatsächlichen Anteil an Bakterien, der durch die hinzugefügten Bestandteile (überwiegend aktivierte Plättchen) abgetötet bzw. geschädigt worden ist. Diese Werte wurden im weiteren Verlauf statistisch ausgewertet.

## 2.6. Auswertung der Ergebnisse und Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde mit Microsoft Excel 97 und SPSS für Windows 7.5, SPSS Software GmbH, München, durchgeführt. Die untersuchten Stichproben entstammen einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit. Daher kamen mit

SPSS der parameterfreie Rangsummentest nach Wilcoxon für die Inkubationen zur Bakterizidie mit Thrombin, SF und den Vitaminen; und der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der verschiedenen Plättchenaktivatoren Thrombin und SF, sowie zum Vergleich der verschiedenen Thrombozytenpräparate zur Anwendung. Hiermit kann geprüft werden, ob die Werte der gleichen Grundgesamtheit entstammen oder ob signifikante Unterschiede zwischen den Werten zweier Gruppen bestehen (Sachs, 2004). Deskriptiv sind Median und Quartilbereiche ermittelt worden. Die graphische Darstellung ist der Boxplot. Da diese Verfahren für den Leser vermutlich ungewohnt sind, sind zusätzlich in Excel Mittelwert und Standardabweichungen erstellt worden. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  (bzw.  $< 0,01$ ) wurde der Unterschied in der zentralen Tendenz als statistisch signifikant ( bzw. hochsignifikant) betrachtet.

## 2.7. Transmissionselektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden 50  $\mu$ l Plättchen mit Thrombin in einer wirksamen Konzentration von 2 U/ml angeregt und mit 50  $\mu$ l Borrelien für 15 Minuten koinkubiert. Eine Vorfixation erfolgte durch Zugabe von 1 ml 2,5%igem Glutardialdehyd (GA) in 0,1 mol/l Cacodylatpuffer (CP) ,pH 7,4 , für 5 Minuten bei 37° C. Nach Zentrifugation mit 200 g über 5 Minuten wurde das Sedi-ment aus Borrelien und Thrombozyten entnommen und in 1 ml 5%igem GA in obigem Puffer bei 22° C für 1 h fixiert. Anschließend wurde der Ansatz dreimal in CP gewaschen und bei 4° C über 2 h in 1%iger Osmiumsäure ( $\text{OsO}_4$ ) nachfixiert. Nach dreifachem Waschen in CP wurde in aufsteigender Azetonreihe entwässert, für je 15 Minuten in 40%igem, 50%igem und 60%igem Azeton. Danach erfolgte eine Blockkontrastierung mit 0,5%igem Uranylazetat und 0,05%iger Phosphorwolframsäure in 70%igem Azeton bei 22° C über Nacht. Nach weiterer Entwässerung, je 15 Minuten in 80%igem, 90%igem und 2 x 100%igem Azeton, wurden die Thrombozyten zweimal für 30 Min. mit Propylenoxid behandelt und anschließend über 4 h mit Araldit (Fluka, Buchs, Schweiz) infiltriert. Die Polymerisation erfolgte bei 65° C über 36 h . Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 60 – 80 nm wurden mit Hilfe eines Ultracut E (Reichert–Jung, Nussloch, Deutschland) hergestellt. Die Schnittkontrastierung erfolgte mit 1%igem Uranylazetat sowie gesättigter Bleizitratlösung in einem Ultrasteiner (LKB, Bromma, Schweden). Die Schnitte wurden mit einem Philips EM 400 ausgewertet und fotografiert.

Die elektronenmikroskopischen Bilder wurden ausgewertet, um die plättchenbedingten Schädigungen an den Borrelien darzustellen.

Zusätzlich wurden die Thrombozytenaktivatoren Thrombin und SF bezüglich ihrer Fähigkeit, die Plättchen zu degranulieren, untersucht.

Die Plättchen wurden jeweils entweder mit 0,2 U/ml, 2 U/ml und 20 U/ml Thrombin stimuliert. Als Kontrollpräparat diente eine Inkubation mit Plättchen und Borrelien ohne Thrombin. In den Untersuchungen mit SF fanden verschiedene Endkonzentrationen von dem synthetischen Peptid Verwendung: 50µmol, 100µmol und 200µmol. Hier erfolgte ebenfalls die Kontrolle mit Plättchen und Borrelien ohne Aktivator. Die Einwirkzeit betrug 1 bzw. 10 Min. Dann erfolgten die weiteren Einbettungen und Schnitte wie zuvor beschrieben und die Anzahl der  $\alpha$ - Granula wurde in jeweils 200 Plättchen ausgezählt und daraus der Mittelwert errechnet. Die Versuchsanzahl betrug jeweils  $n = 3$ , d. h. es wurden sowohl für die Aktivierung mit Thrombin, als auch für die Aktivierung mit SF humane Blutplättchen von drei verschiedenen Spendern verwendet. Hieraus wurden wieder Mittelwert und Standardabweichung ermittelt, und anhand des Mann-Whitney-U-Tests ließ sich ein Vergleich der Wirkung der beiden Stimulanzen durchführen.

## 2.8. Benutzte Chemikalien

1. BSK-H-Medium (BioConcept, Umkirch, Deutschland)
2. Rabbit-Serum (BioConcept, Umkirch, Deutschland)
3. L-Glutamin (SIGMA G-7513)
4. MKP-Medium (modifiziertes Kelly-Medium; Praec-Mursic et al. 1986) pH=7,6
5. PBS-Lösung (Dulbeco's Phosphate buffered saline SIGMA D-5652) pH=7,4
6. L-Ascorbic Acid (SIGMA A-7631)
7.  $\alpha$ -Tocopherol (SIGMA T-3126)
8. (+)- $\alpha$ -Tocopherol in soybean oil (SIGMA T-3634)
9. Thrombin (SIGMA T-4648)
10. synthetischer Thrombinrezeptoragonist mit der Aminosäuresequenz SFLLRNPNDKYEPF (SIGMA S-7152)
11. Paraformaldehyd (Merck 4005) pH=7,0
12. Chloroform reinst (Merck 2431)
13. Sojabohnenöl (Fauser Vitaquell, Hamburg)
14. Dimethyl Sulfoxid DMSO (SIGMA D-2650)
15. Glutardialdehyd (Merck 4239)
16. Dimethylarsinsäure-Natriumsalz (Merck 820670)
17.  $\text{CaCl}_2$ -Dihydrat (Merck 2382)
18. Saccharose (Merck 7651)
19. Osmiumsäure ( $\text{OsO}_4$ ) (Fluka 75630)
20. Azeton (Merck 14)
21. Uranylacetat-Dihydrat (Merck 8473)
22. Phosphorwolframsäure (Merck 582)
23. Propylenoxid (Merck 12492)
24. Araldit (Fluka 10952)

## 2.9. Nährmedien und Pufferlösungen

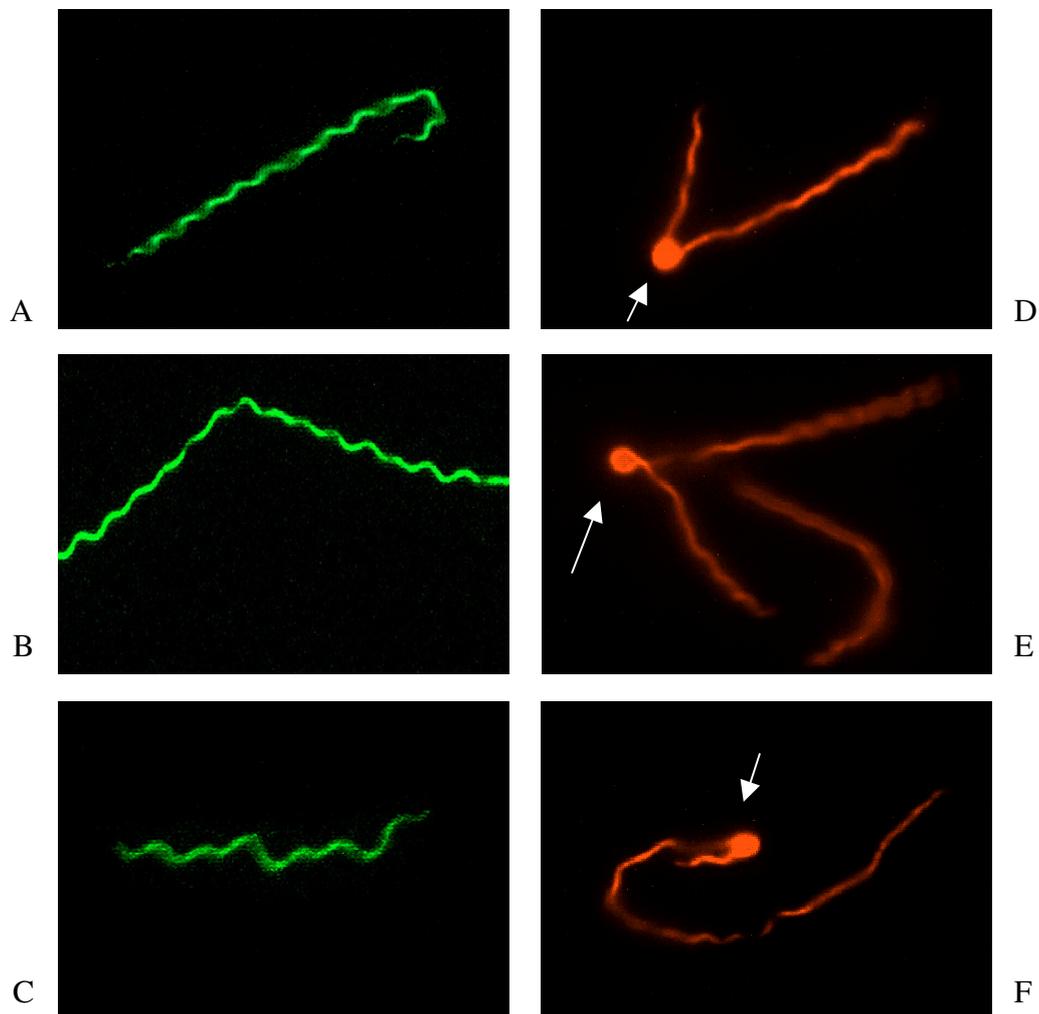
<p><i>Modifiziertes Kelly- Medium für Borrelien aus Patientenisolaten:</i></p>	<p>100ml CMRL-1066 (Zellkulturmedium, Gibco), 900ml Aqua bidest, 3g Neopepton, 6g Hepes, 0,7g Natriumcitrat, 3g Glucose, 0,8g Natriumpyrovat, 0,4g N-Acetylglucosamin, 2g Natriumbicarbonat, 200ml Gelatine, 35 ml Rinderserumalbumin und 70 ml Kaninchenserum. Der pH wird auf 7,6 eingestellt.</p>
<p><i>Additive Lösung für Thrombozyten aus der Zellseparation: PAS 2</i></p>	<p>Natriumchlorid 6,75 g; Natriumazetat 4,08 g; Natriumcitrat 2,94 g; Aqua ad injectabilia ad 1000 ml, pH 7,2; Baxter Biotech, Brüssel, Belgien</p>
<p><i>Lösung zur Antikoagulation bei der Zellseparation: ACD</i></p>	<p>22,4 g Glukose, 22 g Natriumzitat und 8 g Zitat pro l Wasser.</p>
<p><i>Vorfixation von EM- Präparaten: Cacodylatpuffer (CP)</i></p>	<p>21,403 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz, 0,5 g CaCl<sub>2</sub>, 50 g Saccharose in 1l Aqua bidest , pH 7,4</p>

### ***III. Ergebnisse***

#### 3.1. Lichtmikroskopisch erkennbare Effekte

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sieht man sehr eindrucksvoll das unterschiedliche färberische Verhalten der Borrelien, aber auch die alleinige Morphologie der Bakterien im Phasenkontrast ermöglicht bereits Aussagen über die Vitalität. Kriterien für die Vitalität sind die helikale Struktur der Bakterien, Beweglichkeit und die Färbung mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff, die auf eine intakte Zellmembran hinweist.

In der **Abbildung 2** sind Beispiele der Fluoreszenzdoppelfärbung mit dem Farbstoff LIVE/DEAD BacLight™ der Firma Molecular Probes dargestellt. Dieser enthält Propidiumjodid und SYTO-9 im Verhältnis 6:1. Die Borrelien mit einer intakten Membran sind durch SYTO-9 grün markiert (**A-C**) und haben die typische helikale Struktur der Spirochäten, die auf funktionierende Endoflagellen hinweist. Borrelien mit einer gestörten Membranintegrität werden durch Propidiumjodid rot gefärbt (**D-F**). Sie haben eine weniger helikale, eher lineare Form und verraten damit den Funktionsausfall ihrer Flagellen. Zudem weisen sie häufig massive Anschwellungen, sogenannte Gemmata, auf. Diese kommen zwar vereinzelt auch bei grün gefärbten Borrelien vor, dann aber stets bei noch deutlich erhaltener Schraubenform der Spirochäte. Die gestörte Membranintegrität der rotgefärbten Bakterien wird in den Versuchsreihen als kennzeichnend für eine „tote“ Borrelie angesehen. Dieser morphologische Ansatz bietet zwar keine Sicherheit, ob die Bakterien tatsächlich tot sind, aber laut Herstellerangaben sind die Versuchsergebnisse mit dem Fluoreszenzfarbstoffgemisch in guter Übereinstimmung mit dem Bakterienwachstum in der Kultur (Molecular Probes, Product Information Sheet).



**Abbildung 2: Qualitative Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie**

Mit dem Fluoreszenzfarbstoffgemisch LIVE/DEAD BacLight™ wurde die Membranpermeabilität der Spirochäte *Borrelia burgdorferi* unter dem Einfluß thrombinstimulierter humaner Blutplättchen *in vitro* untersucht. Die ca. 20-30 µm langen und 0,3 µm dicken Borrelien zeigen im intakten Zustand eine helikale Struktur und färben sich mit SYTO-9 grün an (A -C).

Im Gegensatz dazu werden Borrelien mit einer geschädigten Membran rot markiert, sie verlieren meist ihre helikale Struktur und erscheinen langgestreckt. Einige Borrelien zeigen zudem typische Anschwellungen, sogenannte **Gemmata** (Pfeile in D-F). Die Originalvergrößerung betrug x 1000.

### 3.2. Quantitative Auswertung der plättchenvermittelten Abwehr am Fluoreszenzmikroskop

Bei der quantitativen Auswertung der Präparate diente das färberische Verhalten der Bakterien der Einteilung in lebende (grün gefärbte) und abgetötete (rot gefärbte) Borrelien. Bereits im Kulturmedium gab es bei allen Stämmen einen unterschiedlich großen Anteil von toten Bakterien, die natürliche Absterberate (nA). Diese reichte von minimal 2% bis zu maximal 30%. Nach Thrombin-Stimulation der koinkubierten Plättchen erhöhte sich entsprechend der Anteil der getöteten Borrelien bis auf maximal 100%.

Betrachtet man diesen Anstieg der toten Bakterienpopulation relativ zum Ausgangswert im Kulturmedium, dann ergeben sich massive Unterschiede zwischen den beiden Zeckenisolaten einerseits und den Isolaten aus humaner Haut andererseits. Die aus Zecken isolierten Borrelienstämme *B29* und *B31* werden mit höherer Effektivität abgetötet als die aus der Haut isolierten Stämme *PLe* und *PKo*.

In Vorversuchen mit unstimulierten Plättchen, bzw. Kontrollen mit Thrombin ohne Plättchen, konnte keine Zunahme der abgetöteten Bakterien gegenüber der natürlichen Absterberate beobachtet werden. Beim Vergleich der zwei Abwehrmodelle zeigte sich eine massive bakterizide Wirkung nur bei Stimulation der Plättchen mit Thrombin; die alleinige Degranulation der Plättchen mit dem Peptid SFLLRNPNDKYEPF (SF) ergab nur mäßige Effekte.

Wie in Kap. 2.2. beschrieben, änderte sich während des Untersuchungszeitraumes das Herstellungsverfahren für die Thrombozytenkonzentrate (TK). Zu Beginn waren TK aus Vollblutspenden verwendet worden, ab dem 1.4.2001 wurden nur noch sogenannte Apheresepräparate vom Zellseparator hergestellt. Deshalb musste zunächst der Nachweis geführt werden, dass der Wechsel in der Herstellung zu keiner signifikanten Änderung der Versuchsergebnisse geführt hat.

Dies betrifft nur die Versuchsreihe der sechs verschiedenen Borrelienstämme im Vergleich untereinander, da die anderen Versuchsreihen erst nach dem 1.4.2001, also durchgehend mit Apheresepräparaten durchgeführt wurden. Die Ergebnisse dieser ersten Versuchsreihe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test geprüft; der Wechsel im Herstellungsverfahren führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Abwehrraten.

Im ersten Versuchsansatz wurden verschiedene Borrelienstämme, die zum einen aus Zecken isoliert, zum anderen aus der Haut von Patienten gewonnen wurden, zusammen mit humanen Blutplättchen und Thrombin koinkubiert.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass humane Plättchen die Borrelien generell abwehren können, der Wirkmechanismus blieb bei diesem Versuchsansatz unbeachtet. Um dies statistisch zu untermauern, kam der Rangsummentest nach Wilcoxon zur Anwendung, in dem die nA aller sechs Borrelienstämme in Kultur mit der tpA verglichen wurde. Die Versuchszahl betrug für die Stämme *B29*, *B31*, *PKo38* und *PKo345*  $n = 20$ , für *PKo 81*  $n = 19$  und für *PLe*  $n = 18$ . Bei einem p-Wert von  $< 0,01$  wurde der Unterschied der zentralen Tendenz als statistisch hochsignifikant betrachtet.

Für alle sechs Borrelienstämme ergab sich hier ein Wert für p, der sogar wesentlich kleiner war, nämlich  $p = 0,0001$ . Die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Behauptung, dass aktivierte humane Plättchen Borrelien verschiedener Stämme *in vitro* abwehren können, ist also sehr gering.

Es stellte sich also heraus, daß aktivierte humane Blutplättchen unter *in-vitro*-Bedingungen Borrelien abwehren konnten.

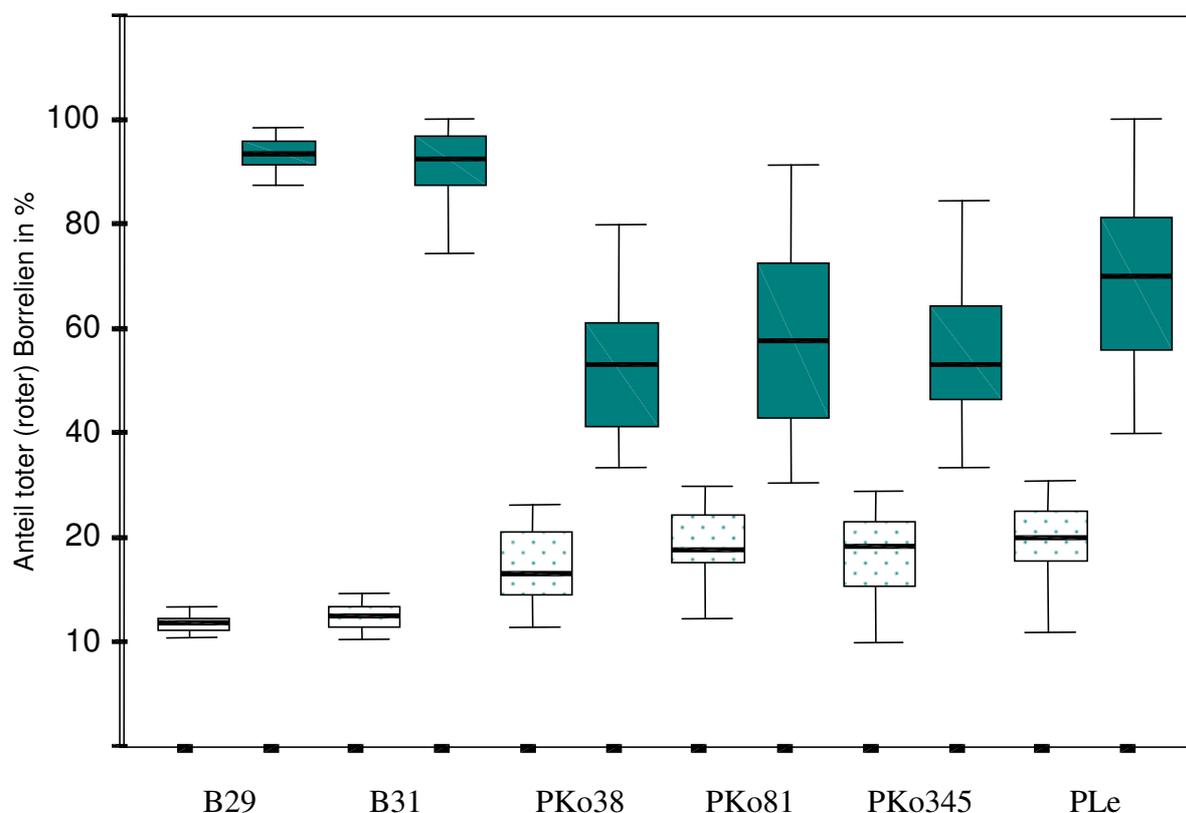
Nun sollte im Besonderen darauf eingegangen werden, ob humane Plättchen die Borrelienisolate *B29* und *B31* aus Zecken oder die Borrelienisolate *PKo 38*, *81*, *345* und *PLe* aus der Haut von Patienten besser abwehren könnten. Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Zeckenisolate um ein Vielfaches besser abgewehrt werden konnten als die Hautisolate.

So konnten für die Zeckenisolate *B29* und *B31* nach Überimpfung mit thrombinaktivierten humanen Blutplättchen geschädigte (rote) Borrelien mit einem Anteil von  $93,2\% \pm 3,2\%$  gezählt werden (*B29*) und für *B31*  $90,8\% \pm 7,8\%$ .

Demgegenüber konnten der Stamm *PLe* durch die Plättchen nur zu  $68,8\% \pm 16,0\%$ , *PKo38* zu  $52,9\% \pm 13,0\%$ , *PKo81* zu  $57,6\% \pm 18,1\%$  und *PKo345* zu  $56,0\% \pm 13,6\%$  geschädigt werden.

In **Abbildung 3** sind diese Versuchsergebnisse in Form eines Box-Plot-Diagramms veranschaulicht. Es wurde diese Darstellungsform gewählt, weil man nicht davon ausgehen konnte, dass die Werte einer Normalverteilung entsprechen.

Herausragend sind dabei die hohen Absterberaten der mit thrombinaktivierten Plättchen inkubierten Stämme *B29* und *B31*.



**Abbildung3: Bakterizide Wirkung thrombinaktivierter humaner Plättchen auf verschiedene Borrelienstämme.**

Auf der y- Achse ist der Anteil toter Borrelien in % dargestellt, auf der x- Achse die verschiedenen Stämme (Zeckenisolate B29 und B31, sowie Patientenisolate PKo38, PKo81, PKo345 und PLe) jeweils mit der natürlichen Absterberate in der Kultur (linke Box, Punkte) und der durch thrombinaktivierte humane Plättchen verursachten Absterberate (rechte Box, türkis). In diesem Box-Plot-Diagramm sind die Boxen durch das untere und obere Quartil begrenzt, die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Endwerte der äußeren Linie bezeichnen den minimalen und maximalen Wert.

Versuchsanzahl  $n = 20$  außer für Stamm PKo81  $n = 19$  und PLe  $n = 18$ .

Bei einer Überprüfung mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon ließen sich folgende hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) in der plättchenvermittelten Abwehr der verschiedenen Borrelienisolate nachweisen: Die Zeckenisolate *B29* und *B31* waren deutlich empfindlicher gegenüber den thrombinaktivierten Plättchen als die Patientenisolate *PLe* und die verschiedenen *PKo*-Passagen.

Ob die Unterschiede in der zentralen Tendenz statistisch signifikant waren, ist in **Tabelle 2** veranschaulicht. Die Patientenisolate waren insgesamt anspruchsvoller in der Anzucht, und es bestand schon im voraus eine recht hohe natürliche Absterberate in der Kultur. Die verschiedenen Eigenschaften der Patientenisolate (*PKo38* → niedrige Passage, *PKo81* → höhere Passage, *PKo345* → keine Expressierung von Osp C) führten innerhalb der Gruppe der Hautisolate zu keinen signifikanten Unterschieden in der plättchenvermittelten Abwehr.

	<b>B29</b> Zeckenisolat	<b>B31</b> Zeckenisolat	<b>PLe</b> Hautisolat	<b>PKo38</b> Hautisolat	<b>PKo81</b> Hautisolat	<b>PKo345</b> Hautisolat
<b>B29</b> Zeckenisolat		-	**	**	**	**
<b>B31</b> Zeckenisolat	-		**	**	**	**
<b>PLe</b> Hautisolat	**	**		**	-	*
<b>PKo38</b> Hautisolat	**	**	**		-	-
<b>PKo81</b> Hautisolat	**	**	-	-		-
<b>PKo345</b> Hautisolat	**	**	*	-	-	

In der **Tabelle 2** sind die Unterschiede ( \*\* = hoch signifikant mit  $p < 0,01$ ; \* = signifikant mit  $p < 0,05$ ; - = nicht signifikant mit  $p > 0,05$  ) zwischen den Abwehrraten der verschiedenen Borrelienstämme durch thrombinstimulierte humane Blutplättchen im Vergleich dargestellt. Die Versuchszahl betrug für die Stämme *B29*, *B31*, *PKo38* und *PKo345*  $n=20$ , für *PKo81*  $n=19$  und für *PLe*  $n= 18$ .

Es wird deutlich, dass zwischen der Abwehr gegenüber Zeckenisolaten (*B29* und *B31*) und der Abwehr gegenüber Borrelienisolaten aus der Haut von Patienten (*PKo38*, *PKo81*, *PKo345*, *PLe*) ein hochsignifikanter Unterschied besteht. Innerhalb dieser Gruppen sind jeweils keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber thrombinstimulierten humanen Blutplättchen aufgetreten, außer bei *PLe* im Vergleich zu *PKo38*.

### 3.3. Inkubationen zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Bakterizidie

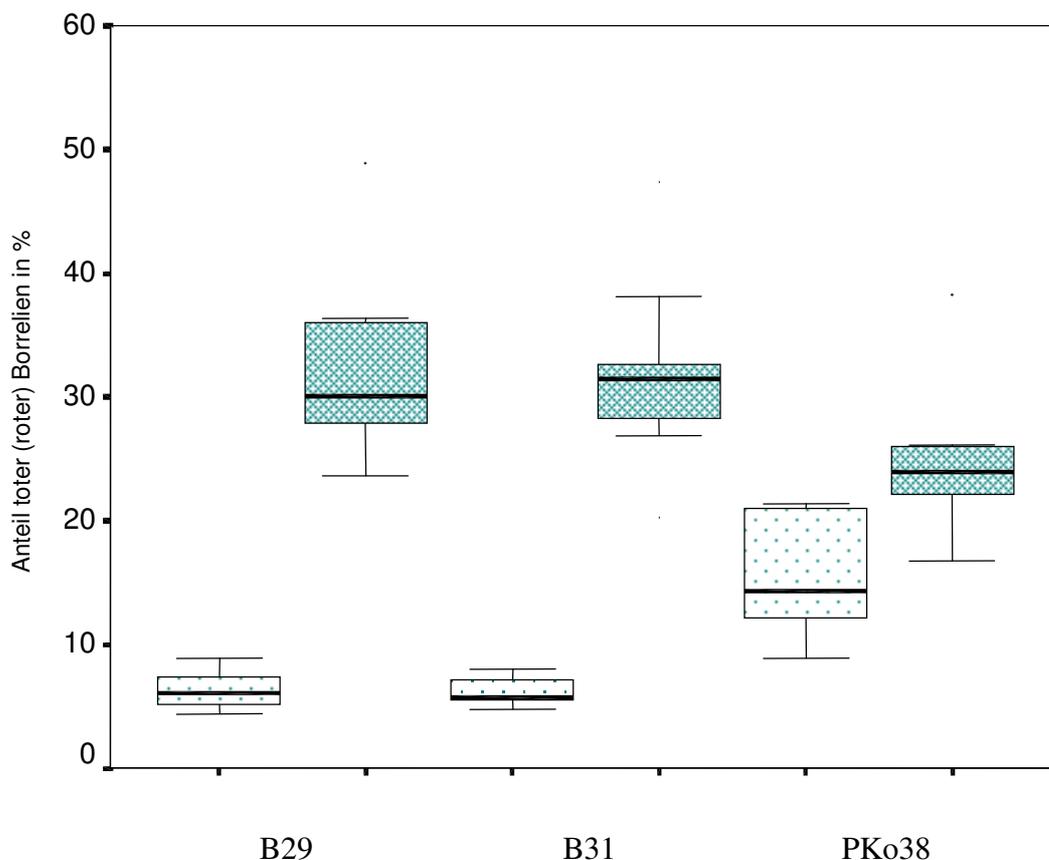
#### 3.3.1. Unterschiedliche Modelle zur Aktivierung der Plättchen

Zur qualitativen Untersuchung der bakteriziden Effekte der Plättchen wurden, im Vergleich zu den Inkubationen mit Thrombin, Inkubationen mit einem synthetischen Thrombin- Rezeptor- Agonisten durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein Peptid mit der Aminosäuresequenz SFLLRNPNDKYEPF (SF, Sigma), das die Plättchen degranuliert, aber weitere Stoffwechselwege der Stimulation unbeeinflusst läßt.

Die Aminosäuresequenz des SF ist Teil der durch die Endoprotease Thrombin freigelegten Thrombinrezeptorsequenz und aktiviert den Rezeptor PAR 1 des Plättchens.

Untersucht wurden die drei Stämme *B29*, *B31* und *PKo38*. Die Versuchszahl betrug  $n = 10$ . Die durch die SF- stimulierten Plättchen erzeugten Absterberaten der Borrelien sind mit spA abgekürzt und in **Abbildung 4** dargestellt.

Um zu ermitteln, ob sich die Abwehrerfolge thrombinstimulierter humaner Blut-plättchen von denen mit dem synthetischen Thrombin-Rezeptor-Agonisten SF angeregten Plättchen tatsächlich unterscheiden, kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Die Überprüfung ergab, dass sich die Abwehrraten hochsignifikant unterscheiden ( $p < 0,01$ ). Für alle drei Stämme *B29*, *B31* und *PKo38* ergab sich ein Wert von  $< 0,0001$  bei  $n = 10$ . Die thrombinaktivierten humanen Blutplättchen erzielten jeweils eine höhere Abwehrerate gegenüber allen drei Borrelienstämmen. In **Abbildung 4** sind die Raten der plättchenvermittelten Abwehr der SFLLRNDKYEPF- stimulierten Plättchen im Überblick dargestellt. Für die Stämme *B29*, *B31* und *PKo38* sind jeweils die natürlichen Absterberaten in der Kultur und die erzielten Absterberaten durch die stimulierten Plättchen veranschaulicht.



In **Abb.4** sind zunächst die natürlichen Absterberaten der Borrelien in Kultur vor Versuchsbeginn dargestellt (linke Box, Punkte). Außerdem ist für die Zeckenisolate B29 und B31, sowie für das Patientenisolat PKo38 die Menge toter Borrelien in % unter Einfluß von stimulierten Plättchen dargestellt. Die Plättchen sind hier mit dem synthetischen Peptid SF stimuliert (rechte Box, kariert). Versuchsanzahl  $n = 10$ .

In **Abbildung 5** sind die Ergebnisse für die Stämme B29, B31 und PKo38 noch einmal zusammenfassend veranschaulicht. Dargestellt sind für jeden Stamm die natürliche Absterberate (nA) in der Kultur, die Absterberate durch SFLLRNDKYEPF- stimulierten Plättchen (spA) und die Absterberate durch thrombinstimulierte Plättchen (tpA). So wird deutlich, dass der maximale Effekt der plättchenvermittelten Bakterizidie durch Thrombin und nicht durch den synthetischen Agonisten erzielt wird. Und es wird deutlich, dass der bakterizide Effekt am meisten gegenüber den Zeckenisolaten, und nicht gegenüber dem Patientenisolat PKo38 ausgeprägt ist.

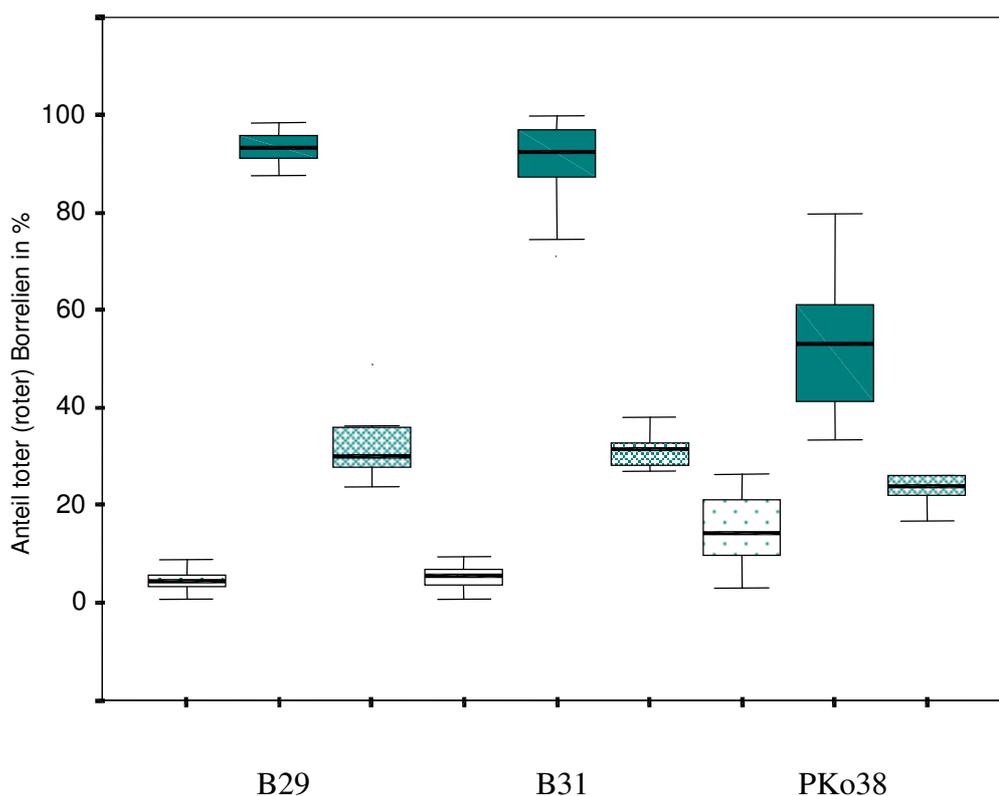
Mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon wurde überprüft, ob die Abwehrraten der Zeckenisolate signifikant höher sind als die des Patientenisolates *PKo38*. Bei Werten für die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,01$  wurden die Unterschiede im Abwehrerfolg gegenüber den verschiedenen Borrelienstämmen als hochsignifikant betrachtet.

Eine Übersicht darüber gibt **Tabelle 3**.

	B29 Zeckenisolat	B31 Zeckenisolat	PKo38 Hautisolat
B29 Zeckenisolat		-	**
B31 Zeckenisolat	-		**
PKo38 Hautisolat	**	**	

**Tabelle 3**

Übersicht über die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$ , ermittelt mit dem Rangsummentest nach Wilcoxon, zum Vergleich der Abwehrraten von SF-aktivierten Plättchen (*spA*) der verschiedenen Borrelienstämme  
(\*\* =  $p < 0,01$  gilt als hochsignifikant; - =  $p > 0,05$ ). Versuchsanzahl  $n = 10$ .



**Abbildung 5**

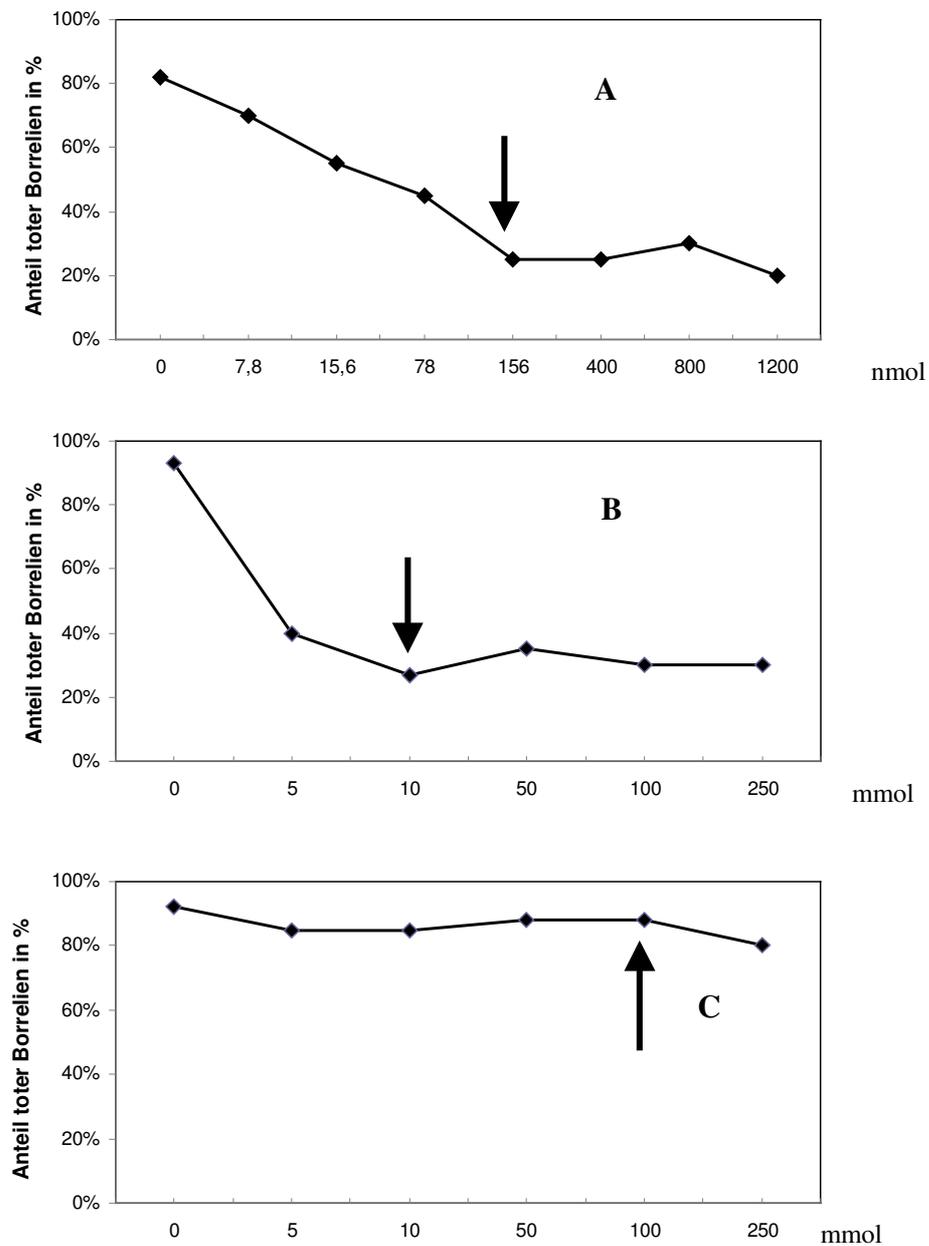
**Abwehr der verschiedenen Borrelienstämme durch unterschiedlich stimulierte humane Blutplättchen in %.** Für die beiden Zeckenisolate B29 und B31, sowie für das Patientenisolat PKo38 ist zunächst die natürliche Absterberate (linke Box, Punkte), dann die Thrombin-induzierte Absterberate (mittlere Box, türkis) und im Vergleich dazu die SFLLRN-induzierte Absterberate (rechte Box, kariert) dargestellt.

Versuchsanzahlen  $n = 30$  (natürliche Absterberate);  $n = 20$  (mit Thrombin);  $n = 10$  (mit SFLLRN)

### 3.3.2. Einflüsse freier Radikale auf die plättchenvermittelte Abwehr

Um die Einflüsse von Antioxidantien auf die plättchenvermittelte Abwehr näher zu beleuchten, wurden den Plättchen Ascorbinsäure und zwei verschiedene  $\alpha$ -Tocopherol-Präparate (gelöst in Chloroform, bzw. gelöst in Sojabohnenöl) hinzugefügt. Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve zu ermitteln. In der Versuchsreihe mit Vitamin C stellte sich heraus, dass mit steigender Konzentration keine Veränderungen in der Bakterienabwehr auftraten. Lediglich bei Zufügen von über 10% PBS wurde offensichtlich der Verdünnungseffekt der Plättchen so stark, dass die Abwehrerate geringer wurde. Dies lag nicht am Vitamin C, denn die Abwehrerate sank

ebenso im Kontrollpräparat, in dem nur PBS ohne Vitamin C verwendet wurde. Für die Versuchsreihe wurde dann eine Menge von 20  $\mu\text{l}$  1 M Vitamin C in PBS verwendet, also eine Endkonzentration von 100 mM.



**Abbildung 6 : Dosis- Wirkungs- Beziehungen der Antioxidantien**

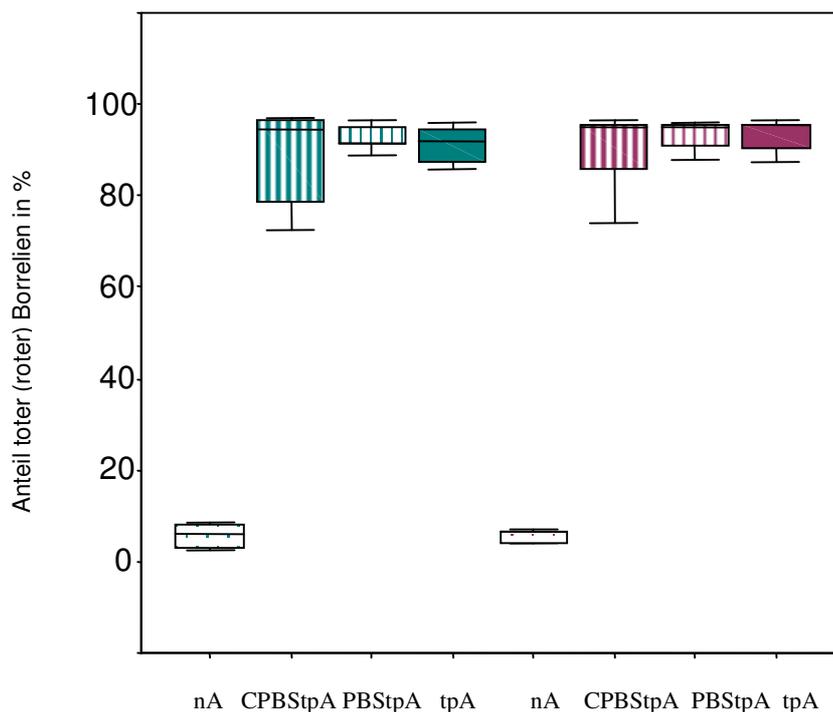
A: Vitamin E in Sojabohnenöl; B: Vit. E in Chloroform; C: Vitamin C in PBS

Die markierten Konzentrationen sind jene, die für die Versuche Verwendung fanden.

Bei Zugabe von Vitamin E, gelöst in Chloroform, zeigte sich deutlich, dass die Abwehr rate insgesamt sank. Ein spezielles Minimum, also eine maximale Hemmung der Abtötung der Borrelien durch Plättchen, lag bei einer wirksamen Konzentration von 10 mM. Diese Menge wurde für die Versuche verwendet. Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl erbrachte ebenso insgesamt eine Abnahme im Abwehrerfolg der über 60 Min. präinkubierten Plättchen gegenüber Borrelien. Ein Wendepunkt in der Reaktion zeigte sich bei der Verwendung von 20  $\mu$ l, also einer wirksamen Endkonzentration von 156 nmol, die dann für die Versuche beibehalten wurde.

#### 3.3.2.1. Einfluss von L-Ascorbinsäure auf die plättchenvermittelte Abwehr

Die mit Vitamin C präinkubierten humanen Blutplättchen (CPBStpA) wiesen insgesamt keine signifikante Abnahme in ihrer Abwehr rate gegenüber den Borrelienstämmen *B29* und *B31* (jeweils  $n = 5$ ) auf. In **Abbildung 7** sind die Ergebnisse dargestellt. Die verschiedenen Ansätze beinhalten die thrombinstimulierten Plättchen ohne sonstige Zusätze (tpA), die Kontrollgruppe aus thrombinstimulierten Plättchen mit PBS (PBStpA) und die eigentliche Versuchsgruppe der mit Vit.C in PBS präinkubierten thrombinstimulierten Plättchen (CPBStpA). Zum Vergleich ist jeweils die natürliche Absterberate der Borrelien ermittelt worden. Mit dem Wilcoxon-Test ermittelte Werte für  $p$  ergaben für die Vergleiche aller drei Plättchenansätze mit der nA  $p < 0,05$ , also eine signifikante Abwehr gegenüber beiden Borrelienstämmen, ( $p = 0,043$ ). Die mit Vitamin C vorbehandelten humanen Plättchen unterscheiden sich hier nicht in der Abwehrleistung. Die verschiedenen Plättchenansätze erzielten vergleichbare Abwehrerfolge gegenüber den Borrelien *B29*. Ähnliche Ergebnisse wurden für den Stamm *B31* ermittelt. Die natürliche Absterberate war signifikant geringer als die durch die verschiedenen Plättchenansätze ermittelten Abwehr rates ( $p = 0,043$ ).



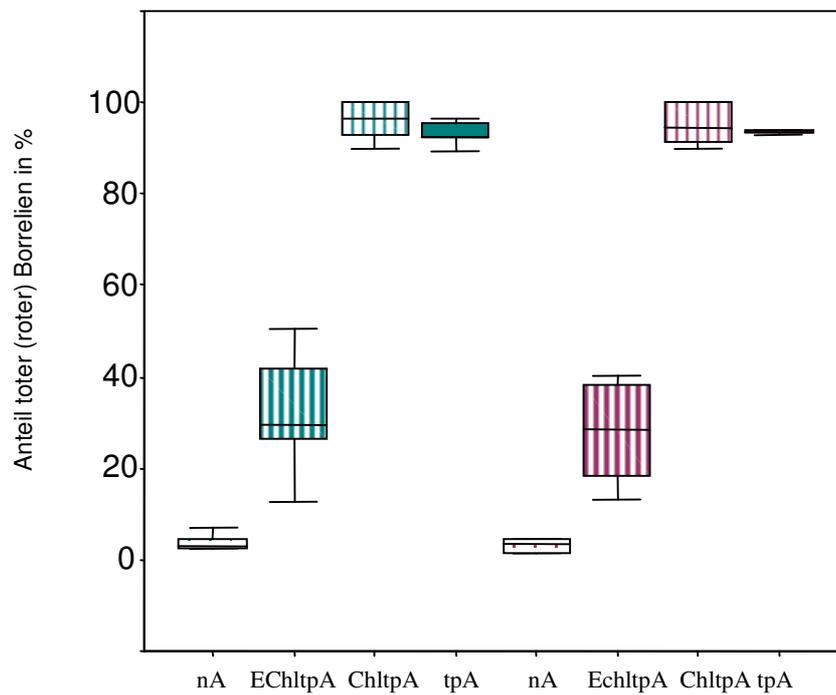
**Abbildung 7 Einfluss von 100 mM Vitamin C auf die bakterizide Wirkung thrombinstimulierter Plättchen am Beispiel von B29 (türkis) und B31 (violett).**

Die nA ist die natürliche Absterberate der Borrelien in der Kultur, tpA sind thrombinstimulierte Plättchen, PBStpA ist die Kontrollgruppe von thrombinstimulierten Plättchen, die mit PBS präinkubiert wurden und CPBStpA ist die Versuchsgruppe von mit Vit.C gelöst in PBS präinkubierten thrombinstimulierten Plättchen. Veranschaulicht als Box-Plot-Diagramm, in der Box ist der Median dargestellt, obere und untere Begrenzung sind das obere und untere Quartil. Die Endwerte der äußeren Linie bezeichnen den minimalen und maximalen Wert. Versuchsanzahl  $n = 5$ .

Mit dem Wilcoxon-Test wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  ermittelt. Ein  $p$ -Wert  $< 0,05$  als Unterschied zwischen zwei zentralen Tendenzen bedeutet in dieser Versuchsreihe eine statistische Signifikanz. Dabei zeigte sich, dass die mit Vitamin C vorbehandelten Plättchen vergleichbare Abwehraten entsprechend den nicht mit dem Vitamin präinkubierten Plättchen gegenüber den Borrelien erzielten. Es konnte also keine Veränderung im Abwehrverhalten durch die Einwirkung dieses Vitamins gefunden werden.

### 3.3.2.2. Einfluss von $\alpha$ - Tocopherol auf die plättchenvermittelte Abwehr von Borrelien

Die mit Vitamin E vorbehandelten Plättchen schädigten die Borrelien insgesamt deutlich weniger. In **Abbildung 8** sind die Ergebnisse für die Versuchsreihe zusammengefasst, in der Plättchen mit 10mM  $\alpha$ -Tocopherol, gelöst in Chloroform, vorbehandelt wurden (EChltpA). Die humanen Plättchen wurden für eine Stunde mit dem Vitamin präinkubiert. Weiterhin wurde der Wilcoxon-Test zur Überprüfung auf Signifikanz der Unterschiede bezüglich der Abwehrraten durchgeführt. Die Versuchsanzahl betrug  $n = 5$ . Die nA ist bei beiden Stämmen *B29* und *B31* vergleichbar niedrig gewesen. Die mit Vitamin E vorbehandelten und thrombinaktivierten Plättchen erzielten jeweils einen signifikanten Abwehrerfolg gegenüber der natürlichen Absterberate in Kultur ( $p = 0,043$ ). Die Plättchen der Kontrollgruppe, die lediglich mit Chloroform ohne Vitamin E präinkubiert wurden (ChltpA), unterschieden sich im Abwehrverhalten nicht signifikant von den nicht mit Vitaminen vorbehandelten Plättchen. Signifikant unterschieden sich jedoch die Abwehrraten der Plättchen, die mit Vitamin E gelöst in Chloroform vorbehandelt waren (EChltpA), gegenüber den nur mit Thrombin behandelten Plättchen (tpA) und gegenüber der Kontrollgruppe mit Chloroform (ChltpA) ( $p$  jeweils = 0,043). Diese Abwehrquoten waren außerdem noch immer signifikant größer als die natürliche Absterberate in Kultur ( $p = 0,043$ ), jedoch signifikant kleiner als der Abwehrerfolg von nicht mit Vitamin E behandelten Plättchen (ChltpA und tpA;  $p = 0,043$ ).



**Abbildung 8** Einfluss von 10 mM Vitamin E gelöst in Chloroform auf die Bakterizidie thrombinstimulierter Plättchen am Beispiel von B29 (türkis) und B31 (violett). Die Vorinkubation mit dem Lösungsmittel Chloroform (ChltpA) zeigt keinen Einfluß auf die Bakterizidie der thrombinstimulierten Plättchen, aber durch Zugabe von Vitamin E (EChltpA) wird der Abwehrerfolg statistisch signifikant beeinträchtigt. Versuchsanzahl  $n = 5$ .

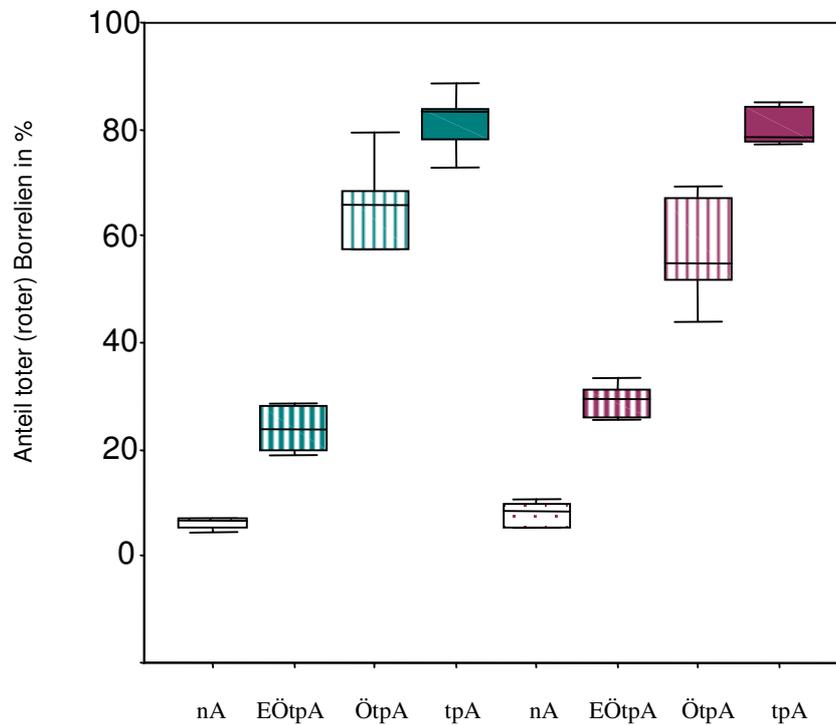
### 3.3.2.3. Einfluss von Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl auf die plättchenvermittelte Abwehr von Borrelien

Diese Versuchsreihe wurde in gleicher Weise durchgeführt wie die vorherige. Diesmal wurde jedoch  $\alpha$ -Tocopherol gelöst in Öl benutzt (Gehalt ca. 670 mg/g). Als Vergleichsgruppe dazu diente eine Vorbehandlung mit handelsüblichem Sojabohnenöl, um die Wirkung des Vitamin E als normalem Lebensmittelbestandteil in seinem Effekt zu überprüfen. Die Konzentration von  $\alpha$ -Tocopherol in handelsüblichem Sojabohnenöl beträgt durchschnittlich 0,076 mg/g. Verwendet wurde eine wirksame Endkonzentration von 0,1 IU  $\alpha$ -Tocopherol bzw. 156 nmol und für die Vergleichsgruppe die entsprechende Menge Sojaöl. Die Versuchsergebnisse finden sich in **Abbildung 9**.

Die Vergleichsgruppe der Plättchen, die für eine Stunde mit Sojabohnenöl präinkubiert wurde (ÖtpA), erzielte statistisch signifikant erniedrigte Abwehrraten gegenüber den nur mit Thrombin behandelten Plättchen (tpA;  $p = 0,043$ ), was darauf zurückzuführen sein kann, dass das Sojabohnenöl ebenfalls Vitamin E enthält.

Die geringsten Abwehrquoten erzielten jedoch auch diesmal die Plättchen, die mit gelöstem  $\alpha$ -Tocopherol vorbehandelt waren (EÖtpA). Diese Werte sind signifikant niedriger ( $p = 0,043$ ) als die Abwehrrate unbehandelter Plättchen (tpA) und signifikant höher als die natürliche Absterberate in Kultur. Für den Stamm *B31* bestehen signifikante Unterschiede in der bakteriziden Wirkung von Plättchen, die zum einen mit handelsüblichem Sojabohnenöl vorbehandelt wurden (ÖtpA) gegenüber dem Vitamin E in Öl (EÖtpA), unter dessen Einfluss die geringsten bakteriziden Wirkungen erreicht wurden ( $p = 0,043$ ).

In der Versuchsreihe mit dem Stamm *B29* bestehen beim Vergleich der Bakterizidie zwischen den humanen Blutplättchen, die nur mit Sojabohnenöl (ÖtpA) und denen, die mit Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl (EÖtpA) vorbehandelt wurden, nur statistisch signifikante Unterschiede, wenn man die einseitige Irrtumswahrscheinlichkeit ermittelt ( $p = 0,04$ ). Nur dann ist die Einschränkung der plättchenvermittelten Abwehr der mit Vit. E vorbehandelten Plättchen (EÖtpA) deutlich niedriger. Dies kann auf die niedrige Versuchsanzahl ( $n = 5$ ) und auf die Mengen von Vitamin E in dem normalen Sojabohnenöl zurückzuführen sein. Die Prozentwerte erscheinen jedoch deutlich niedriger.

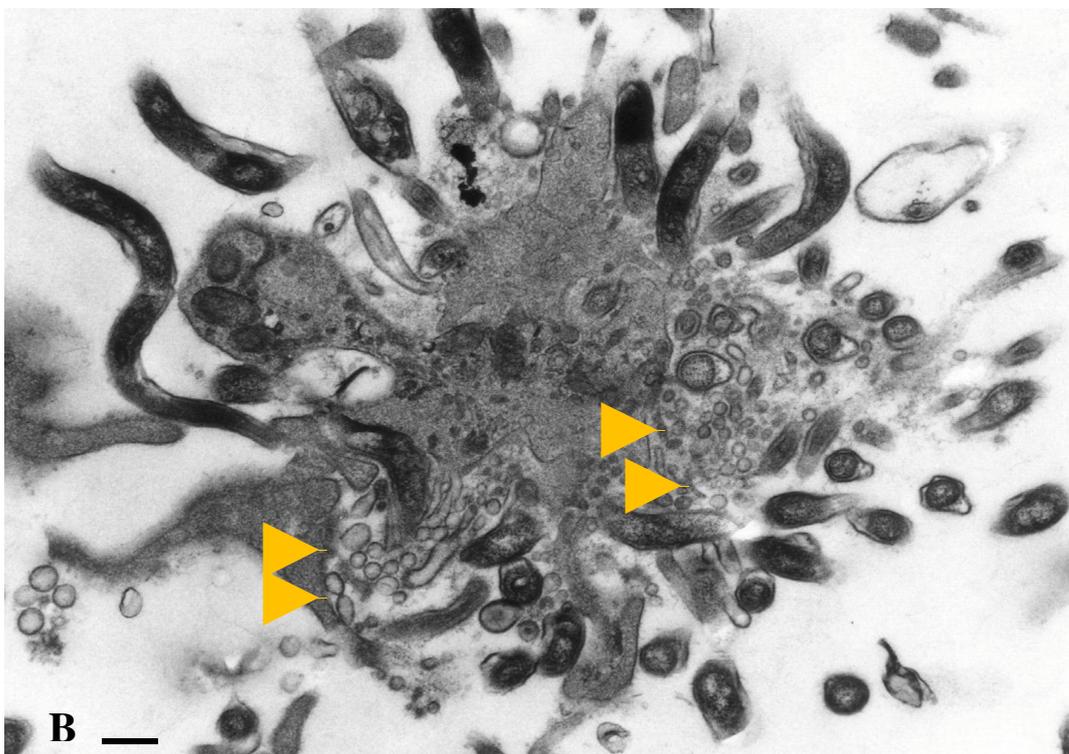
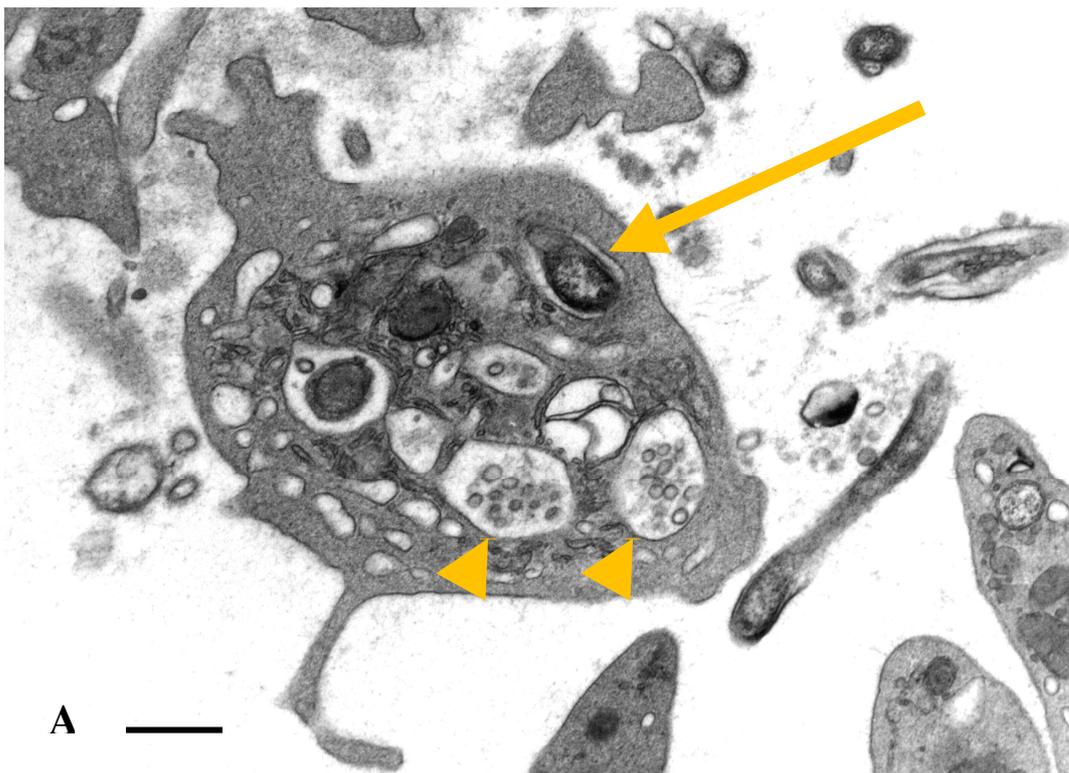


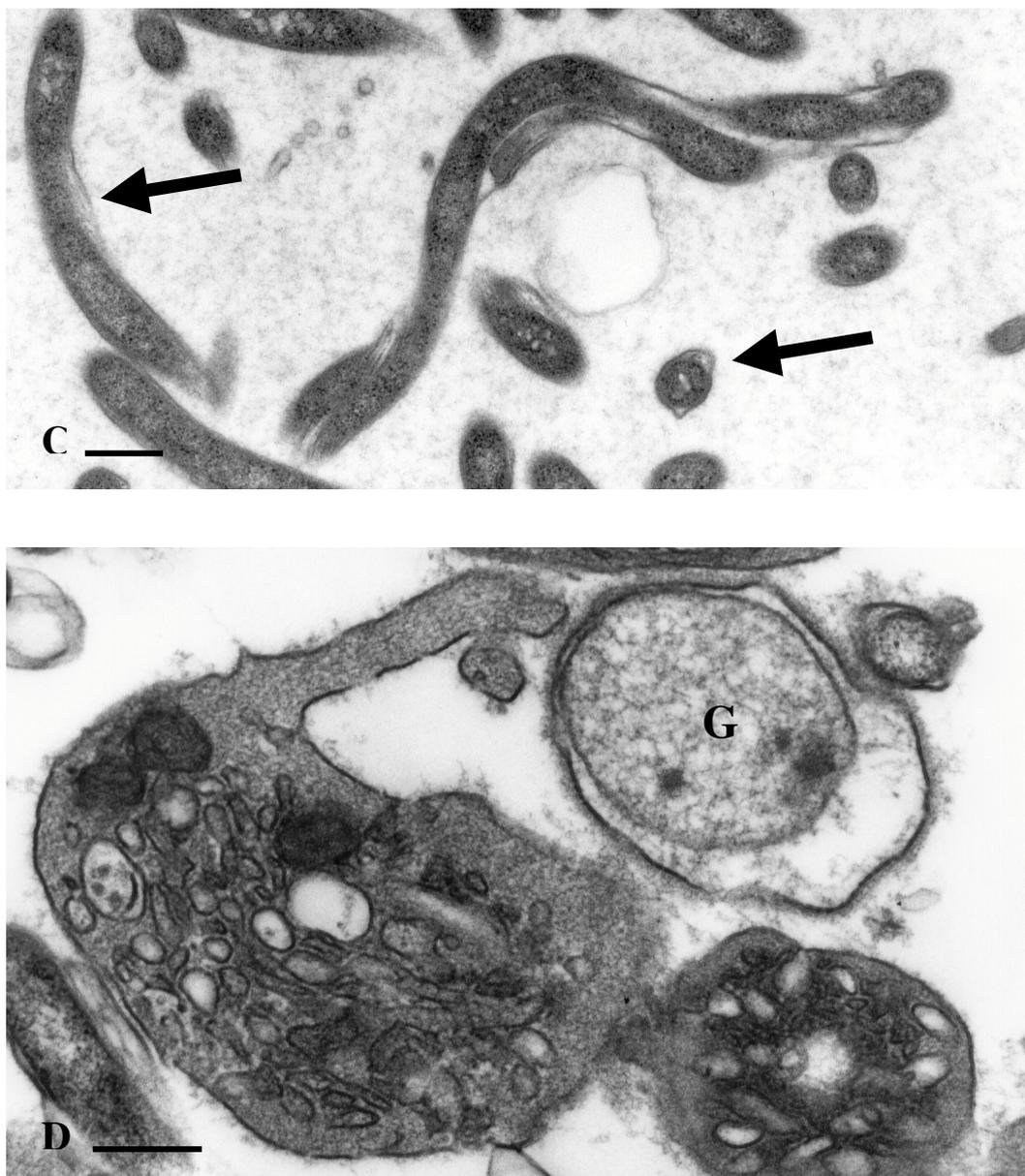
**Abbildung 9 Einfluss von 156 nmol Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl auf die plättchenvermittelte Abwehr am Beispiel von B29 (türkis) und B31 (violett).** Bereits in der Kontrollgruppe der thrombinstimulierten Plättchen nur mit Öl (ÖtpA) zeigte sich eine Abnahme der plättchenvermittelten Abwehr, besonders für den Stamm B29. Durch Zugabe von Vitamin E (EÖtpA) wird der Abwehrerfolg aber auch hier statistisch signifikant weiter beeinträchtigt, sowohl für B29 als auch für B31 ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Untersuchungen mit dem Transmissionselektronenmikroskop

In den elektronenmikroskopischen Untersuchungen sind Schädigungen der Bakterien zu erkennen, die auf eine Beeinflussung der Bakterienmembran hinweisen (**Abbildung 10**). Normalerweise sind die Borrelien ca. 10 – 30  $\mu\text{m}$  lang und etwa 0,3  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und haben eine helikale Form. Nach der Inkubation mit thrombinstimulierten humanen Blutplättchen kommt es zu Anschwellungen sowohl des äußeren Membranzylinders als auch des inneren Zytoplasmazyllinders (**D**). Diese Schwellungen sind offenbar Folge einer gestörten Integrität und erhöhten Permeabilität der Borrelienmembranen.

In unmittelbarer Umgebung degranulierter Plättchen findet man viele kleine Vesikel, die einer völlig zerfallenden Bakterienmembran entsprechen dürften (**B**). In seltenen Fällen fanden sich Plättchen mit internalisierten Bakterien, die vermutlich in den Hohlräumen des offenen kanalikulären Systems (OCS) liegen. Diese Kanäle stehen nicht nur untereinander, sondern auch mit der Plättchenoberfläche und somit mit dem Außenmedium in Kontakt.





**Abbildung 10 Blutplättchen und Borrelien im elektronenmikroskopischen Bild.**

In A-D stellt der Vergrößerungsbalken 300 nm dar.

**A:** Borrelien können von Plättchen internalisiert werden. Der orange Pfeil markiert einen intakten Querschnitt einer Borrelie im OCS, die orangenen Pfeilspitzen markieren kleine Vesikel, die auf den Zerfall von Bakterienmembranen hinweisen. **B:** Hier sind in der unmittelbaren äußeren Umgebung eines fast vollständig degranulierten humanen Blutplättchens gehäuft viele kleine Vesikel zu finden, die für die Zerstörung einer Borrelienmembran sprechen (orange Pfeilspitzen). **C:** Vitale Borrelien des Stammes B 29 in ihrer normalen Größe von etwa  $10\text{-}30\mu\text{m} \times 0,3\mu\text{m}$ . Deutlich zu erkennen ist die helikale Form und in den Querschnitten die äußere Membran um den inneren Protoplasmazyylinder, dazwischen Endoflagellen (Pfeile).

**D:** Die Bakterien schwellen teilweise an und bilden sogenannte Gemmata (G). Daneben ist vergleichend ein Querschnitt einer intakten Borrelie zu sehen.

### 3.4.1. Degranulation von Plättchen durch SF

In dieser Versuchsreihe wurden zum einen thrombinstimulierte, zum anderen SF-stimulierte humane Blutplättchen bezüglich der Anzahl ihrer  $\alpha$ - Granula ultrastrukturell untersucht. Hierbei wurden zwei verschiedene Einwirkzeiten (nach 1 Min. und nach 10 Min.) miteinander verglichen. Normalerweise haben humane Plättchen ca. 35  $\alpha$ - Granula. In dieser Untersuchung zeigte sich, dass sowohl die Stimulation mit Thrombin, als auch mit dem synthetischen Peptid SF, in höheren Konzentrationen und mit 10 Min. Einwirkzeit eine nahezu vollständige Degranulation bewirken. So enthielten Plättchen nach 10 Min. Einwirkung von 200  $\mu$ mol SF nur noch durchschnittlich  $0,72 \pm 0,27$   $\alpha$ - Granula und Plättchen nach 10 Min. Einwirkung von 2 U/ ml Thrombin nur noch  $0,73 \pm 0,51$   $\alpha$ - Granula. Diese Werte sind in **Tabelle 4** zusammengefasst.

Bei einer statistischen Überprüfung der Werte mit dem Test nach Mann- Whitney- U stellte sich heraus, dass sich die degranulierende Wirkung der beiden Stimulantien nicht signifikant ( $p > 0,5$ ) unterschied.

SF kann also in einer hohen Konzentration von 200  $\mu$ mol humane Plättchen ebenso effektiv bezüglich der Ausschüttung ihrer Granula anregen, wie Thrombin.

	SFLLRNPNDKYEPF		Thrombin		
SF in $\mu$ mol	1 Min.	10 Min.	1 Min.	10 Min.	Thrombin in U/ ml
<b>0</b>	5,3 $\pm$ 0,39	5,7 $\pm$ 0,67	5,65 $\pm$ 1,12	5,44 $\pm$ 1,03	<b>0</b>
<b>50</b>	2,1 $\pm$ 0,12	1,56 $\pm$ 0,26	5,65 $\pm$ 1,48	5,5 $\pm$ 1,26	<b>0,2</b>
<b>100</b>	1,47 $\pm$ 0,34	1,15 $\pm$ 0,33	1,66 $\pm$ 0,6	0,73 $\pm$ 0,51	<b>2</b>
<b>200</b>	1,38 $\pm$ 0,56	0,72 $\pm$ 0,27	0,66 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,34	<b>20</b>

**Tabelle 4** Anzahl der  $\alpha$ - Granula in humanen Blutplättchen nach Stimulation mit dem synthetischen Peptid SF bzw. Thrombin in verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen Einwirkzeiten.

Dargestellt sind Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Versuchsanzahl  $n = 3$  bei jeweils 200 ausgezählten Plättchen.

## ***IV. Diskussion***

### 4.1. Geschichtlicher Rückblick

Schon vor über 100 Jahren wurde erstmals über bakterizide Wirkungen des Blutes berichtet, und vor fast 50 Jahren speziell über die antibakterielle Wirkung der Blutplättchen (Hirsch, 1960). Wie Weksler und Nachman 1971 beschrieben, entdeckte Fodor bereits im 19. Jahrhundert, nämlich 1887, einen hitzestabilen bakteriziden Wirkstoff im Serum, der gegen grampositive Bakterien aktiv war. Er wurde Betalysin genannt. Hirsch stellte 1960 fest, dass es die Anwesenheit von Blutplättchen war, die dem Serum eine bakterizide Aktivität gegen grampositive Bakterien vermittelte, nicht die Anwesenheit von Leukozyten. Er fand aber auch heraus, dass die Plättchen allein nicht ausreichten, es musste außerdem der Gerinnungsprozeß aktiv sein (Hirsch, 1960). Packham et al. beschrieben 1968 die Fähigkeit von Plättchen, unter Einfluss von Bakterien und nichtbiologischem Material *in vitro* ihre Inhaltsstoffe freizusetzen, aber auch die fremden Partikel zu phagozytieren. 1979 hob Copley die Arbeit der Plättchen in der Immunabwehr mit als ihre wichtigste Eigenschaft hervor. Dass die Plättchen an der sofortigen unspezifischen Abwehr im Gefäßsystem beteiligt sind, fasste auch Wurzinger 1990 zusammen. 1992 untersuchten Yeaman et al. *in vitro* thrombinstimulierte Blutplättchen von Kaninchen. Sie fanden die sogenannten PMP, platelet microbicidal proteins, mit bakterizider Aktivität gegenüber *Staph. aureus*. Die Arbeitsgruppe stellte weiterhin fest, dass die PMP ein niedriges Molekulargewicht haben, hitzestabil sind und kationisch geladen (Yeaman et al., 1992a). Yeaman et al. ermittelten 1992 in einer weiteren Studie, dass PMP die antibiotische Wirkung gegenüber *S. aureus* steigerten, ebenso wie die Dauer des postantibiotischen Effektes gegenüber *S. aureus*. Diese *in-vitro*-Untersuchungen boten eine vielversprechende Grundlage für die synergistische Rolle von plättchenvermittelter Abwehr und antibiotischer Prophylaxe von infektiöser Endokarditis (Yeaman, 1992b).

1997 fasste Yeaman die hervorstechenden Eigenschaften der Plättchen, die ihnen in der unspezifischen Abwehr eine Schlüsselrolle zukommen lassen, zusammen:

Zunächst sind sie rasch und in großer Anzahl am Ort der Infektion oder Gefäßwandverletzung. Sie haben strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten mit Phagozyten, wie z.B. Neutrophilen und Monozyten: Sie enthalten Granula mit bioaktiven

Molekülen, weisen bestimmte Oberflächenantigene auf, wie z.B. P-Selektin und den Immunglobulin-Fc $\gamma$ II Rezeptor. Sie exprimieren den CR3 Rezeptor für Komplement.

Diese strukturellen Eigenschaften lassen eine Rolle der Plättchen in der unspezifischen Abwehr vermuten. Außerdem akkumulieren Plättchen dort, wo größere Mengen der Komplementproteine C3a und C5a vorkommen. Sie senden am Ort einer Infektion positive chemotaktische Signale für andere Zellen aus. Plättchen interagieren direkt und indirekt mit einer Vielzahl mikrobieller Pathogene. Plättchen internalisieren Mikroorganismen in Phagosom-ähnlichen Vakuolen. Dies trägt dazu bei, den Blutstrom von Pathogenen zu reinigen (White, 2005). Stimulierte Plättchen können zytotoxische Sauerstoffspezies freisetzen. Wie bei Neutrophilen und Makrophagen kann aus aktivierten Plättchen Granulainhalt unter Beteiligung des Zytoskelett freigesetzt werden.

In Anwesenheit von IgE wirken Plättchen zytotoxisch auf Mikrofilarien (Joseph et al., 1983). 2002 untersuchten Tang et al. thrombinstimulierte humane Blutplättchen *in vitro* bezüglich ihrer antimikrobiellen Proteine. Sie fanden und identifizierten sieben antimikrobielle Proteine, die bislang als Entzündungsmediatoren bekannt waren: platelet factor 4 (PF-4), RANTES, connective tissue activating peptide III (CTAP-III), platelet basic protein, thymosin  $\beta$ -4 (T $\beta$ -4), fibrinopeptide B (FP-B) und fibrinopeptide A (FP-A). Die mikrobioziden Effekte wurden gegenüber *E.coli*, *Staph.aureus*, *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* getestet. Insgesamt war die Abwehr gegenüber Bakterien stärker als gegenüber Pilzen, stärker bei sauren pH-Werten und die Effekte waren dosisabhängig.

Einige antimikrobielle Proteine aus Plättchen sind Kinozidine, das sind mikrobiozide Chemokine, die Leukozyten an den Ort der Infektion locken (Yount et al., 2004; Yeaman und Bayer, 2006). Die Kinozidine können auch Pathogene markieren, so sind diese dann durch Leukozyten leichter zu phagozytieren und zu töten. Kinozidine sind z.B. PF-4, CTAP-III und RANTES (Yount et al., 2004).

Auch in der hier vorliegenden *in-vitro*-Untersuchung stellte sich heraus, dass die Plättchen bei der gemeinsamen Inkubation mit Thrombin und Borrelien in der Lage waren, die Bakterien zu schädigen. Je nach verwendeten Bakterien und Stimulationsmodus wurden bis über 90% der koinkubierten Bakterien durch Plättchen abgetötet.

#### 4.2. Bivalente Betrachtung

Blutplättchen wurden aber auch schon als ambivalente Akteure der unspezifischen Immunabwehr bezeichnet (Jurk und Kehrel, 2008): Durch verschiedene Mechanismen kann ein Pathogen von Plättchen in der Blutbahn geschützt werden. Diese sind vor allem das „Untertauchen“ im Thrombozytenaggregat, welches z.B. den Schutz vor Leukozyten, Schutz vor Antibiotika (Schierholz et al., 2000), eine Immobilisierung des Pathogens, endovaskuläre Kolonisierung und Adhäsion an Fibrinmatrix, z.B. mit Verstärkung der Virulenz einer Endocarditis (Herzberg et al., 1990), zur Folge haben kann.

Wirklich im Thrombozytenaggregat „abtauchen“ kann ein Erreger aber nur, wenn er entsprechende „immune-escape“-Mechanismen beherrscht, d.h., sich durch bestimmte Eigenschaften den Effekten der Immunabwehr entziehen kann. Denn die Plättchen haben auch ihre bakteriziden Eigenschaften, denen der Erreger im Aggregat ausgesetzt ist:

Zu diesen gehören die Sekretion von antimikrobiellen Substanzen aus den Granula, Sekretion von reaktiven Sauerstoffspezies, Komplementaktivierung auf Plättchen (Jurk und Kehrel, 2008).

#### 4.3. Plättchenvermittelte Abwehr gegenüber verschiedenen Borrelienstämmen

Ziel meiner Untersuchung war zunächst die quantitative Ermittlung der bakteriziden Wirkung humaner Blutplättchen auf Bakterien am Beispiel von Borrelien. Es wurden für diese Untersuchung die gramnegativen Borrelien ausgewählt, da die plättchenvermittelte Abwehr bis zu Beginn dieser Studie ganz überwiegend an grampositiven Bakterien untersucht worden war (Yeaman et al., 1992a; Yeaman, 1997). Außerdem stellen sich die Borrelien unter dem Mikroskop durch ihre Größe, ihre Eigenbeweglichkeit und ihre helikale Form besonders eindrucksvoll dar, und eine Bindung von Borrelien an Plättchen war bereits gezeigt worden: Coburn et al. stellten 1993 fest, daß Borrelien *in vitro* an aktivierte Plättchen über das Integrin GPIIb/IIIa binden können. Dies tun sie vermutlich über ihr Oberflächenprotein p66 (Defoe und Coburn, 2001).

Für die in dieser Arbeit vorliegende Versuchsreihe wurden die Plättchen mit Thrombin stimuliert und mit Borrelien verschiedener Stämme kokubiert. Zur Ermittlung der bakteriziden Wirkung der Plättchen auf die Bakterien kam das DNA-Farbstoffgemisch LIVE/DEAD BacLight aus Propidiumjodid und SYTO 9 zum Einsatz, das Bakterien mit einer geschädigten Membran rot und solche mit einer intakten Membran grün färbt

(s.Kap.2.4.). Laut Virta et al., 1998, stimmen die ausgezählten Daten der fluoreszenzmarkierten Bakterien mit dem tatsächlichen Zustand in der Kultur überein. Die so erhobenen Daten wurden statistisch ausgewertet.

Es zeigte sich sehr deutlich, dass in diesem Versuchsansatz zu einem hohen Prozentanteil (über 90% für die Stämme aus Zeckenisolate *Borrelia garinii* B29 und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31) Borrelien plättchenvermittelt abgetötet werden konnten.

Somit gilt die bakterizide Wirkung der plättchenvermittelten Abwehr nicht nur für die bislang unter anderem vielfach untersuchten Staphylokokken, Streptokokken, *E.coli*, Chlamydien, Klebsiellen, *Bacillus subtilis* (Clawson und White, 1971; Yeaman et al., 1992a; Yeaman, 1997; Krijgsveld et al., 2000; Tang et al., 2002; Klinger und Ulbricht, 2003; Zander, 2007).

Stattdessen hat es sich hier erneut und mit intensiveren Killingraten bestätigt, was in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe anhand von drei Stämmen (B29, B31, PLe) ermittelt worden war (Riebandt et al., 1999b): Die thrombinstimulierte blutplättchenvermittelte Abwehr des Menschen kann *in vitro* sehr erfolgreich die Borrelien der Stämme B29, B31, PLe, PKo38, PKo81, PKo345 abtöten. Aus den früheren Versuchsreihen war auch bekannt, dass Thrombin im Vergleich zu ADP der effektivere Stimulator war (Riebandt et al., 1999a; Riebandt et al., 1999b).

Im Folgenden sollte nun ermittelt werden, wie sich die Wirkung der thrombinaktivierten Plättchen auf die verschiedenen Borrelienstämme unterscheidet. Die Borrelienstämme *Borrelia garinii* B29 (europäisch) und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 (nordamerikanisch) sind Isolate aus Zecken, die Stämme *Borrelia afzelii* PLe, PKo38, PKo81 und PKo345 sind Isolate aus der Haut von Patienten mit Erythema migrans. PKo 345 exprimiert außerdem kein Osp C (= outer surface protein, s.a. Kap.2.1.2.; Fingerle et al., 2000). Die verschiedenen PKo-Stämme unterscheiden sich in der Zahl der Passagen in Kultur (s.a. Kap.2.1.2.).

In dieser Versuchsreihe war sehr auffällig, dass die Zeckenisolate B29 und B31 deutlich empfindlicher auf die Wirkung Thrombin-stimulierter Plättchen reagierten als die Patientenisolate. Unter den Zeckenisolaten B29 und B31, bzw. innerhalb der Gruppe der Patientenisolate PLe, PKo38, PKo81 und PKo345 gab es keine signifikanten Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber dem plättchenvermittelten Killing.

Mögliche Ursachen für die Unterschiede in der Sensitivität könnten in den unterschiedlichen molekularen Eigenschaften der verschiedenen Stämme begründet sein. So ist ein unterschiedliches Bindungsverhalten infektiöser und nicht infektiöser

Borrelienstämme an Proteoglykane und Integrine, insbesondere an das Integrin  $\alpha_{\text{Ib}}\beta_{\text{III}}$ , das sich auch in der Plättchenmembran befindet, bekannt (Coburn et al., 1994; Leong et al., 1998). Infektiöse Borrelienstämme, zu denen die Patientenisolat zählen, binden besser an dieses Integrin und somit auch an Plättchen.

Als Bindungspartner des Integrins kommen auf der Borrelienoberfläche möglicherweise die so genannten „outer surface proteins“ (Osp) in Frage. Diese Osps werden von den Borrelien in Abhängigkeit vom jeweiligen Wirt (Zecke, Säugetier) unterschiedlich exprimiert (de Silva und Fikrig, 1997) und ändern sich auch bei langer *in-vitro*-Kultivierung (Güner, 1994; Busch et al., 1997). So fanden de Silva und Fikrig 1997 heraus, dass die Borrelien in der Zecke vorwiegend Osp A und Osp B ausbilden. Hat die Zecke einen Wirt für eine Blutmahlzeit gefunden, so wandern die Bakterien aus dem Zeckendarm in die Speicheldrüsen der Zecke und gelangen beim Einstich mit dem Speichel der Zecke in die Haut des Opfers und von dort weiter in die Blutbahn. In dieser Zeit vermehren sich die Borrelien stark und exprimieren innerhalb von 48 Stunden nach dem Wirtkontakt hauptsächlich Osp C.

Längere *in-vitro*-Kultivierung von Borrelien hat nach vielen Passagen einen Verlust an Infektiösität und Pathogenität zur Folge. In höheren Passagen wandelt sich die Expression der Oberflächenproteine des Stammes PKo von überwiegend Osp A zu Osp C, begleitet von einem Verlust an Infektiösität (Johnson et al., 1984; Güner, 1994). Die zunehmende Osp C-Expression in Passagen zwischen 30-46 korrelierte mit dem Verlust eines linearen Plasmids mit 6 kbp (Busch et al., 1997). Da sich jedoch in der hier durchgeführten Versuchsreihe die verschiedenen PKo-Stämme, die zum einen infektiös und niedrig passagiert sind (PKo38), zum anderen aus hohen Passagen stammen (PKo81) oder gänzlich ohne Osp C- Expression sind (PKo345), nicht signifikant in der Sensitivität gegenüber der plättchenvermittelten Abwehr unterscheiden, ist anzunehmen, dass die plättchenvermittelte Bakterizidie gegenüber Borrelien nicht unmittelbar mit deren Expression der Oberflächenantigene Osp A und Osp C verknüpft ist.

#### 4.4. Die Mechanismen der Infektionsabwehr im Einzelnen

##### 4.4.1. Mikrobiozide Peptide

Um den Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Abwehr näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Modelle zur Aktivierung der Plättchen erprobt. Vergleichend zu den Inkubationen mit Thrombin gab es Inkubationen mit dem synthetischen Thrombin-Rezeptor-Agonisten SFLLRNPNDKYEPF (SF), der die Plättchen hauptsächlich degranuliert (Kinlough-Rathbone et al., 1993). Die Wirkweisen von Thrombin und SF unterscheiden sich wie folgt: Das synthetische Peptid sorgt für eine Aktivierung des Thrombin-Rezeptors PAR-1, indem es als Teil der Thrombin-Rezeptor Sequenz das sonst durch die Endoprotease Thrombin freigelegte neue N-terminale Ende imitiert (Vu et al., 1991). Das so über den PAR-1 aktivierte Plättchen ist in der Lage, seinen Granulainhalt freizusetzen. In Abwesenheit von Thrombin wird der PAR-4 nicht aktiviert (Tolentino und Bahou, 2002), es werden nur kleine Mengen von Thromboxan gebildet, das Plättchen durchläuft keinen Formwandel, und da ohne Thrombin kein Fibrinogen zu Fibrin umgewandelt wird, bilden sich keine Plättchenaggregate (Kinlough-Rathbone et al., 1993). Zusätzlich zur Sekretion der Granulainhalte startet Thrombin die Kaskade des Arachidonsäuremetabolismus mit Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub>, und es veranlasst die Sekretion bzw. Bereitstellung von platelet activating factor (PAF) und Plättchen-Faktor 3. In der hierzu durchgeführten Versuchsreihe zeigte sich deutlich, dass die thrombin-stimulierten Plättchen sowohl Borrelien aus Zeckenisolaten als auch das Patientenisolat *PKo38* besser abwehren konnten, als die Plättchen, die anstelle von Thrombin mit dem synthetischen Thrombin-Rezeptor Agonisten aktiviert worden waren.

Dies zeigte sich auch in weiteren Studien der Arbeitsgruppe:

Schon in den Untersuchungen von Riebandt et al. erwies sich Thrombin als effektiverer Stimulator für das plättchenvermittelte Killing im Vergleich zu ADP, auch plättchenfreie Überstände erreichten keine wesentlichen bakteriziden Effekte (Riebandt et al., 1999a; Riebandt et al., 1999b). Dass die Überstände weniger erfolgreich Bakterien abwehren als direkt agierende aktivierte Plättchen stellten auch Klinger und Ulbricht 2003 fest: Auch hier war die Degranulation der Plättchen durch SF weniger effektiv im Bezug auf die plättchenvermittelte Bakterizidie als der Einsatz thrombinstimulierter Plättchen. Auffällig war jedoch, dass zuvor durch SF degranulierte Plättchen noch bakterizide Aktivität aufwiesen, wenn sie danach durch Thrombin stimuliert wurden (Klinger und Ulbricht,

2003). Sie können also offenbar gänzlich ohne Granulainhalt bakterizid auf *B. subtilis* wirken (Klinger und Ulbricht, 2003). Diese These spricht gegen die Annahme, dass z.B. die sogenannten platelet microbicidal proteins (PMP) aus Kaninchen (Yeaman, 1997) oder die Thrombocidine (TC) aus humanen Plättchen (Krijgsveld et al., 2000) allein für die bakterizide Wirkung von Plättchen verantwortlich sind.

Auch eine mögliche Anwendung der *in-vitro*- Untersuchungen von Krijgsveld et al., 2000 für die Verhältnisse *in vivo* gestaltet sich schwierig. Zum einen konnten nur geringe Mengen der TC aus Plättchen isoliert werden (Krijgsveld et al., 2000). Andererseits ist die Ausschüttung und Wirkung der Peptide systemisch von vielen Faktoren abhängig, wie dem Grad der Plättchenaktivierung, Blutfluss und der Bindung an zelluläre Blutbestandteile oder Plasmaproteine.

Diese Schlussfolgerung deckt sich mit dem Ergebnis der Untersuchung von Zander. Sie beschrieb ein optimales Killing, ebenfalls am Beispiel von *B. subtilis*, durch die Anwesenheit von humanen Plättchen, Thrombin, Plasma und Plasmaproteinen von einer Größe von über 100 kD. Sobald eine dieser Komponenten fehlte, fiel die plättchenvermittelte Abwehr deutlich geringer aus. Auch in dieser Studie erwies sich das synthetische Peptid SF als nicht ausreichender Stimulator der Plättchen für eine maximale Bakterizidie. Außerdem wurde hier noch ein weiteres synthetisches Peptid, GYP, ein Agonist am PAR-4, hinsichtlich der bakteriziden Wirkung untersucht. Auch dieses erbrachte nicht den Effekt des Thrombin (Zander, 2007).

Insgesamt lässt sich also aus dieser hier vorliegenden Studie und den anderen Untersuchungen schließen, dass die Anwesenheit von Thrombin und von humanen Blutplättchen, unabhängig, ob vollständig oder degranuliert, für eine möglichst bakterizide Wirkung nötig sind. Dies gilt sowohl für Untersuchungen der Bakterizidie gegenüber *Bacillus subtilis* als auch für die bakterizide Wirkung gegenüber den unterschiedlichen Borrelienstämmen, nämlich Isolaten aus Zecken und Patientenisolaten. In einer Vergleichsgruppe von Borrelien, die bei jedem einzelnen Versuch auch mit Thrombin inkubiert wurden, fand kein Abwehrerfolg statt. Ohne das Blutplättchen und Plasma kommt also die Protease allein auch zu keiner bakteriziden Wirkung.

In der elektronenmikroskopischen vergleichenden Untersuchung von thrombinstimulierten gegenüber SF-stimulierten humanen Plättchen hinsichtlich der Anzahl von  $\alpha$ -Granula gab es keinen signifikanten Unterschied in der degranulierenden Wirkung. SF konnte hochkonzentriert humane Blutplättchen ebenso effektiv bezüglich der Ausschüttung ihrer

Granula anregen wie Thrombin. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Untersuchung von Kinlough-Rathbone et al. von 1993, die feststellten, dass mit hohen Konzentrationen von SFLLRN stimulierte Plättchen nahezu die gleiche Menge von Serotonin aus ihren Granula abgaben wie thrombinstimulierte Plättchen.

Insgesamt gibt diese Untersuchung einen weiteren Hinweis darauf, dass nicht die sezernierten Granula oder der sezernierte Granulainhalt allein für die plättchenvermittelte Abwehr verantwortlich sind, denn sonst müssten die SF-stimulierten Plättchen in der Versuchsreihe mit Borrelienstämmen ebensoviele Bakterien abtöten, wie die thrombinstimulierten Plättchen.

Für die größtmögliche plättchenvermittelte Abwehr von Borrelien *in vitro* scheinen also andere Eigenschaften des Thrombin oder des ausdrücklich Thrombin-stimulierten Plättchens eine wichtige Voraussetzung zu sein.

#### 4.4.2. Internalisierung/ Mögliche Phagozytose

Die in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachteten Schädigungen an den Borrelien durch thrombinaktivierte humane Blutplättchen weisen auf eine Beeinflussung der Bakterienmembran hin. So fanden sich Anschwellungen der Membran als Folge einer gestörten Integrität und erhöhten Permeabilität der Membran, sogenannte *Gemmata*.

Selten fanden sich Plättchen mit internalisierten Borrelien, die vermutlich in den Hohlräumen des offenen kanalikulären Systems (OCS) liegen.

Die Möglichkeit einer Phagozytose durch Plättchen wird seit Jahrzehnten kontrovers diskutiert. Schon Movat et al. stellten bei der Untersuchung von Leukozyten 1965 nebenbefundlich überrascht fest, dass Plättchen Latexpartikel zu phagozytieren schienen. Auch Packham et al. beschrieben 1968, dass Plättchen Bakterien oder auch nichtbiologische Partikel phagozytieren könnten. Am Beispiel von Latexpartikeln wurde einige Jahre später untersucht, wie Plättchen die Partikel zunächst ins OCS aufnahmen, dann in Vakuolen überführten, also scheinbar phagozytierten wie Leukozyten (Lewis et al., 1976). In früheren ultrastrukturellen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden Bakterien im OCS humaner Plättchen gefunden (Klinger et al., 1998; Riebandt, 1999a; Riebandt, 1999b).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten Youssefian et al. 2002, dass Plättchen HIV und *Staphylococcus aureus* internalisieren konnten.

Im Gegensatz dazu gibt es jetzt einige neuere Untersuchungen, die belegen sollen, dass Plättchen aus bestimmten Gründen keine echten Phagozyten seien. So würden sie Bakterien nur „bedecken“ (*covercytes*) und in ihr OCS aufnehmen, aber nicht phagozytieren (White, 2005). Außerdem würden sie die Bakterien nicht, wie zuvor vielfach behauptet, ähnlich den PMN (polymorphonukleäre Leukozyten) in entsprechenden Phagosomen töten, denn sie könnten keine echten Phagosomen in Form einer vom umgebenden Milieu abgeschlossenen „killing chamber“ bilden. Stattdessen blieben die Bakterien in Kanälen des OCS liegen, in denen das Milieu nie vom Außenmedium komplett getrennt werden kann. Also könnten die Plättchen die Bakterien auf diese Weise nicht töten (White, 2006).

In der hier vorliegenden Untersuchung fanden sich elektronenmikroskopische Hinweise auf eine Internalisierung der Bakterien in das OCS der Plättchen. Darüber hinaus zeigten sich kleine Vesikel im OCS, die die Frage nach einem möglichen Abbau von Borrelien im OCS aufwerfen. Ob eine echte Phagozytose von Borrelien in Plättchen stattfinden kann, lässt sich damit nicht belegen, erscheint aber insgesamt eher unwahrscheinlich.

Dies unterstützt weiterhin die kontroverse Diskussion um die ambivalente Rolle der Plättchen im Infektionsgeschehen (Yeaman, 1997; Jurk und Kehrel, 2008). Denn die Plättchen gehen zum einen gegen Pathogene in der Strombahn effektiv vor, zum anderen können Pathogene sogar im Plättchen oder im Plättchenaggregat (Clawson und White, 1971; Fitzgerald et al., 2006) vor Antikörpern, sonstigen Abwehrmechanismen des Körpers oder auch vor Antibiotika geschützt sein (Schierholz et al., 2000). So fanden z.B. Herzberg et al. 1990 heraus, dass die Stämme von *Streptococcus sanguis*, die an Plättchen binden konnten und deren Aggregation förderten, im Gegensatz zu den Stämmen, die nicht an Plättchen binden konnten, eine virulentere Endocarditis zur Folge hatten. Denn ihre Kolonien konnten sich gut an dem Aggregat aus Plättchen und Fibrin anlagern.

#### 4.4.3. Reaktive Sauerstoffspezies

Aus früheren Versuchen einer französischen Arbeitsgruppe war bekannt, dass Plättchen IgE- vermittelt zytotoxische freie Radikale gegenüber Helminthen freisetzen konnten und so die Helminthen töteten (Joseph et al., 1985; Capron et al., 1985; Capron et al., 1987).

In anderen Untersuchungen der Lübecker Arbeitsgruppe imponierten in ultrastrukturellen Aufnahmen an den „Kontaktstellen“ zwischen den humanen Blutplättchen und *Bacillus subtilis* sogenannte „ruffled membranes“ (Klinger und Ulbricht, 2003). Mit den ruffled membranes ist ein gefälteles Bild der Plättchenmembran gemeint. Sie weisen auf eine aktivierte NAD(P)H-Oxidase hin (Zander, 2007) und lassen somit auf die Entstehung von ROS an der Bindungsstelle zwischen Plättchen und Bakterium, in diesem Fall *Bacillus subtilis*, schließen. Solche gefältele Grenzbereiche („ruffled border“) sind z.B. auch zwischen Osteoklasten und Knochenmatrix bekannt, wo ebenfalls Sauerstoffradikale freigesetzt werden (Key jr. et al., 1994).

Leukozyten, insbesondere Granulozyten, nutzen u.a. die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), vor allem von Superoxid, zur Abwehr von Bakterien (Babior et al., 1973; Keller, 1987; Janeway et al., 2002; Brandt, 2007). In einem sogenannten „oxidative burst“ (=Radikalfreisetzung) erzeugen sie mit Hilfe einer membranständigen NADH-Oxidoreduktase oder NADPH-Oxidase extrazellulär Superoxid, das bakterizid wirkt (Brandt, 2007). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass diese NAD(P)H-Oxidase nicht nur bei Leukozyten, sondern auch in der Plättchenmembran vorkommt und in den Plättchen eine wesentliche Quelle für Superoxid/ ROS ist (Pulcinelli et al., 2001, Krötz et al., 2002). Es fand sich außerdem ein Zusammenhang zwischen der Bildung von Superoxid und Hydroxylradikal im Plättchen mit der Bildung und Freisetzung von Arachidonsäure (Caccese et al., 2000). Dass nicht nur die Leukozyten, sondern auch Blutplättchen ROS produzieren können, war schon seit längerem bekannt (Marcus et al., 1977; Iuliano et al., 1997; Wachowicz et al., 2002). Diese ROS spielen eine wichtige Rolle für die Plättchenfunktionen (Wachowicz et al., 2002). Ihre Produktion, Ausschüttung und wie-derum Rückwirkung auf das Plättchen selbst scheint einem eigenen Regelkreis untergeordnet zu sein (Pulcinelli et al., 2001).

In dieser vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob humane Blutplättchen durch ROS bakterizid wirken. Die Untersuchung erfolgte indirekt über zwei verschiedene Antioxidantien, nämlich das wasserlösliche Ascorbat (Vitamin C) und das lipidlösliche  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E). Kämen nun die Antioxidantien hinzu, würden die Radikale „entschärft“ (Brandt, 2007), sie wirkten nicht mehr bakterizid. Um diesen theoretischen Ansatz zu untersuchen, wurde jeweils ein Vitamin mit Plättchen, Thrombin und Borrelien

koinkubiert (s.Kap.2.3.2.2.). Unter Einwirkung von Vitamin C bzw. L-Ascorbinsäure traten keine Veränderungen in der Bakterienabwehr auf.

Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass die Bakterizidie durch toxische Sauerstoffradikale aus Plättchen zwar theoretisch möglich wäre, die von Plättchen freigesetzten Mengen jedoch gegenüber z.B. Neutrophilen viel zu gering sind, um eine solche Wirkung zu erzielen (Zander, 2007) bzw. die Blockade dieser Wirkung zu beobachten.

#### 4.4.4. Hemmung der Bakterizidie durch $\alpha$ -Tocopherol

Auffällig war jedoch, dass durch Hinzufügen von  $\alpha$ -Tocopherol eine ausgeprägte Senkung der Abwehrrate beobachtet werden konnte: Mit beiden Vitamin E-Präparaten, Vitamin E gelöst in Chloroform und Vitamin E gelöst in Sojabohnenöl, ergaben sich signifikant erniedrigte Werte in der Abwehr thrombinaktivierter Plättchen jeweils für die untersuchten Stämme *B29* und *B31* im Kontrast zu der Vergleichsgruppe thrombinaktivierter Plättchen ohne Beimischung eines Antioxidans (s.a. im Ergebnisteil 3.3.2.2. und 3.3.2.3.).

Wie in der vorherigen Versuchsreihe mit L-Ascorbinsäure festgestellt, konnte in einer anderen Untersuchung (Zander, 2007) die These, dass reaktive Sauerstoffspezies aus humanen Blutplättchen Bakterien (am Beispiel von *Bacillus subtilis*) abwehren könnten, nicht belegt werden. Hier war die Begründung, dass die geringe freigesetzte Menge der Radikale nicht in der Lage gewesen sei, bakterizide Konzentrationen gegenüber *Bacillus subtilis* zu erreichen. Offensichtlich reagierten die frisch ausgeschütteten ROS, die im Plättchen gebildet wurden, rasch im Plättchenaggregat weiter, bevor sie in die Überstände abgegeben werden. Somit kämen die ROS als alleiniger effektiver zytotoxischer Mechanismus in der plättchenvermittelten Abwehr nicht in Frage.

Andererseits wäre es möglich, dass das Vitamin E das plättchenvermittelte Killing der Borrelien auf andere Weise, also nicht antioxidativ, unterbindet: So hemmt  $\alpha$ -Tocopherol die Proteinkinase C (PKC) (Boscoboinik et al., 1991; Azzi et al., 2001; Azzi et al., 2002). Die Proteinkinase C ist in Plättchen wesentlich an der Aktivierung und Sekretion auslösenden Signalkette beteiligt (Jaschonek, 1991).  $\alpha$ -Tocopherol hemmt die PKC in verschiedenen Zelltypen und beeinträchtigt somit die Aggregation von Plättchen

(Freedman et al., 1996), die NO-Produktion von Endothelzellen und die Superoxidproduktion in Neutrophilen und Makrophagen (Azzi et al., 2002). Auch Villacorta et al. beschrieben 2007 die Hemmung der Plättchenaggregation durch  $\alpha$ -Tocopherol über modulierte Signaltransduktion, sowie eine verringerte Produktion von Superoxid über die NADPH-Oxidase in Monozyten.

Dass  $\alpha$ -Tocopherol die Signaltransduktion anhand einer Reduktion der PKC-Aktivität hemmt, fanden auch Tasinato et al. 1995 am Beispiel von glatten Muskelzellen heraus.

$\alpha$ -Tocopherol bindet dabei nicht direkt an die PKC, aber verhindert die PKC-Aktivierung (Tasinato et al., 1995).

Die Hemmung der PKC $\alpha$  Isoform erfolgt durch ihre Dephosphorylierung:  $\alpha$ -Tocopherol aktiviert die Proteinphosphatase PP2A und diese dephosphoryliert die PKC (Ricciarelli et al., 1998).

Diese Fähigkeit des  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber anderen Tocopherolen zeigt, dass es andere wichtige Eigenschaften außer den antioxidativen hat (Azzi et al., 2001).

Das  $\alpha$ -Tocopherol ist also in der Lage, durch Hemmung der Proteinkinase C am Plättchen den aktivierenden Einfluß des Thrombin teilweise zunichte zu machen. Es kann auf diese Weise auch ohne Einsatz seiner antioxidativen Eigenschaften in die Signaltransduktion des Plättchens eingreifen und so möglicherweise auch die plättchenvermittelte Abwehr unterbinden.

Eine weitere wichtige und möglicherweise in diesem Modell entscheidende Eigenschaft des  $\alpha$ -Tocopherol gegenüber den Blutplättchen ist die aggregations- und bindungshemmende Wirkung. Der aggregationshemmende Effekt ist zum Teil auf die Hemmung der PKC zurückzuführen (Freedman et al., 1996). Schon 1985 fasste Machlin in einem Artikel die Wirkung des Vitamin E auf Plättchen wie folgt zusammen: Es hemmt die Plättchenaggregation, die Adhäsion der Plättchen an Kollagen und ihre Thromboxanproduktion. In einer Untersuchung von Jandak et al., 1989 zeigte sich nach Einnahme verschiedener Mengen Vitamin E durch Probanden und der darauffolgenden Untersuchung ihrer Plättchen ex vivo, dass die Fähigkeit der Plättchen zur Adhäsion an z.B. Fibrinogen, Fibronectin, Kollagen und Plasmaproteine in Abhängigkeit zur eingenommenen Menge des Vitamin E zu 75-82% nachließ (Jandak et al., 1989). Elektronenmikroskopisch konnte man beobachten, dass die Fähigkeit zur Bildung von Pseudopodien bei den Vitamin E-

angereicherten Plättchen rückläufig war (Jandak et al., 1989; Steiner, 1993). Das Vitamin E hat also insgesamt einen membranstabilisierenden Effekt auf die Plättchen (Steiner, 1993). In einer weiteren Studie zur Wirkung von  $\alpha$ -Tocopherol auf Plättchen *in vitro* konnte nachgewiesen werden, dass die Aggregationshemmung mit der Konzentration des Vitamin E korrelierte (Bakaltcheva et al., 2001). Bezogen auf die hier vorliegende Untersuchung zur Bakterizidie lässt sich schließen, daß der plättchenvermittelte bakterizide Effekt in Anwesenheit von  $\alpha$ -Tocopherol deutlich abnimmt, da auch die Bindungsfähigkeit zwischen Plättchen und Bakterien reduziert ist.

Diese Vorstellung stimmt auch mit dem in einer neueren, bereits erwähnten Studie favorisierten Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Bakterizidie (Zander, 2007) überein: Das an der Plättchenoberfläche gebundene Thrombin spaltet Proteine aus dem Blutplasma und produziert so bakterizide Proteine, die aber nur eng lokal begrenzt wirken können.

Einschränkend müssen zu der hier vorliegenden Versuchsreihe einige Anmerkungen gemacht werden: Die eher geringe Versuchsanzahl im Bereich der Antioxidantien (2x n=5) relativiert die Aussagekraft der Ergebnisse.

Da auch in der Kontrollgruppe, die mit Sojabohnenöl inkubiert wurde, anstatt mit Vitamin E in Sojabohnenöl, die Abwehrtrate sank, bleibt unklar, ob das Vitamin E allein das Killing vereitelt oder das Öl. Andererseits ist auch in dem verwendeten Sojabohnenöl ein Anteil von Vitamin E vorhanden. Allerdings enthalten Sojapflanzen vorwiegend  $\gamma$ -Tocopherol (Löffler und Brigelius-Flohe, 2007). So ist in dem verwendeten Präparat weniger als 1/1000 Gesamt-Tocopherolgehalt im Sojabohnenöl (950mg/kg), davon nur 8%  $\alpha$ -Tocopherol, vorwiegend  $\gamma$ -Tocopherol (62%) und  $\delta$ -Tocopherol (30%) (Information von Fauser Vitaquell, Hamburg).

Das bedeutet 0,0760 mg/1g  $\alpha$ -Tocopherol im Sojabohnenöl gegenüber 670 mg/1g  $\alpha$ -Tocopherol, d.h. im Kontrollpräparat ist ca. 1/10000 des  $\alpha$ -Tocopherols im Vergleich zum Untersuchungspräparat enthalten. Möglicherweise haben andere Eigenschaften des Öls einen inhibitorischen Effekt auf die plättchenvermittelte Bakterizidie in der Kontrolle ausgeübt.

Ein wesentlicher Unsicherheitsfaktor bei dem Versuch, den genauen Wirkmechanismus des plättchenvermittelten Killing anhand dieser Versuchsreihen aufzuklären, ist die

Tatsache, dass für die Versuche keine plasmafrei gewaschenen humanen Blutplättchen Verwendung fanden, sondern Thrombozytenkonzentrate. Diese sind zwar stark mit Plättchen angereichert, enthalten jedoch außerdem noch Plasma, Restleukozyten, Resterythrozyten (Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten, Fassung 2000; Standardvorschriften aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Stand 08.05.01).

#### 4.5. Zusammenschau

##### 4.5.1. Überlegungen zum Wirkmechanismus

In Überlegungen bezüglich des Wirkmechanismus erschien zunächst die Beteiligung von antibakteriellen Peptiden wahrscheinlich. Diese Effektormoleküle des angeborenen unspezifischen Immunsystems sind in der Tier- und Pflanzenwelt weit verbreitet und werden in vielen Zellen synthetisiert. Man konnte ihre Synthese bzw. Speicherung in neutrophilen Granulozyten, in Paneth-Zellen des Verdauungstraktes, im Epithel des Respirations- und Urogenitaltraktes und in der Haut nachweisen (Schröder, 1999; Bals, 2000). Auch von Blutplättchen in Kaninchen und Mensch ist eine Speicherung antibakterieller Proteine bekannt (Yeaman, 1997; Krijgsveld et al., 2000). Für alle diese antibakteriellen Peptide gilt, dass es sich um kleine kationische Peptide mit einem Molekulargewicht unter 10 kD handelt und dass sie weniger als 100 Aminosäuren lang sind (Yeaman, 1997; Schröder, 1999; Krijgsveld et al., 2000).

Aufgrund der Untersuchungen mit SF und Thrombin erwies sich die Theorie, dass die plättchenvermittelte Bakterizidie primär auf der Wirkung von mikrobioziden Peptiden beruht, als nicht mehr haltbar. Als nächstes wurde vermutet, dass die plättchenvermittelte Abwehr primär auf der Wirkung von ROS beruht. Auch dies konnte nicht bestätigt werden. Insgesamt ist nun am ehesten davon auszugehen, dass ein Zusammenwirken von Plättchen, Plasma und Thrombin nötig ist. In einer anderen Studie der Arbeitsgruppe wurde mittlerweile der Wirkmechanismus der plättchenvermittelten Bakterizidie auf folgende Weise favorisiert: Das Plättchen dient hauptsächlich dazu, seine aktivierte Oberfläche zur Verfügung zu stellen. Hieran bindet Thrombin, spaltet Proteine aus dem Blutplasma und produziert dabei bakterizide Peptide, die aber nur lokal eng begrenzt wirken (Zander, 2007).

#### 4.5.2. Klinische Anwendung

Es gab bereits Modelluntersuchungen, in denen als antibakterielles Protein Lysozym verwendet wurde, das auf künstliche Herzklappen aufgetragen wurde, um hier vor Vegetationen zu schützen (Kuijpers et al., 1998; Kuijpers et al., 2000). Diese wäre eine mögliche klinische Anwendung für die antibakteriellen Proteine.

Einige klinische Studien belegen die Beteiligung der Plättchen und ihrer antimikrobiellen Peptide an der Immunabwehr:

Sullam et al. untersuchten 1993 thrombopene Kaninchen mit Endocarditis durch *Streptococcus sanguis M99* im Vergleich zu Kaninchen mit einer normalen Plättchenanzahl. Die thrombopenen Tiere hatten eine höhere Dichte von Vegetationen und eine höhere absolute Anzahl von Bakterien pro Herzklappe. *In vitro* konnte der Stamm *M99* an Plättchen binden, diese aktivieren, und wurde rasch von PMP getötet. Daraus lässt sich ableiten, dass Plättchen zwar ein Faktor in der Pathogenese der Endocarditis sind. Sind Blutplättchen aber in großer Anzahl vorhanden, können sie diese limitieren (Sullam et al., 1993). Bei Thrombopenie nimmt die Endocarditis einen schlechteren Verlauf.

Dies ist auch bei Meningitis durch Pneumokokken der Fall (Kirkpatrick et al., 1994):

Untersucht wurden 77 Patienten. Unter den gemessenen Laborparametern waren Thrombozytopenie und ein hoher Harnstoffwert im Blut signifikant mit gesteigerter Mortalität verknüpft.

In einer weiteren Studie kamen die Untersucher zu demselben Ergebnis: Eine persistierende Thrombozytopenie deutete bei lebertransplantierten Patienten auf einen schlechteren Verlauf hin, sie waren anfälliger für frühe schwere Infektionen (Chang et al., 2000).

Am Beispiel eines Modells von *Streptococcus viridans*- Endocarditis stellten auch Dankert et al. 2001 fest, dass die vom Plättchen freigesetzte mikrobiozide Aktivität wesentlich für die Abwehr von Endocarditis ist.

Eine griechische Arbeitsgruppe führte 2008 eine Studie durch, in der Patienten nach einer Stenteinlage in ein abdominelles Aortenaneurysma teils nicht-Thrombin-aktiviertes plättchenreiches Plasma transfundiert wurde, einer Kontrollgruppe nicht. Es zeigte sich, dass die Gruppe mit der plättchenreichen Transfusion signifikant weniger Wundkomplikationen hatte und eine signifikant kürzere Aufenthaltsdauer im Krankenhaus durchmachte (Saratzis et al., 2008).

### 4.5.3. Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Plättchen an der unspezifischen Abwehr mitwirken, jedoch nur mit eingeschränkter Kompetenz. Dennoch zeigte sich ihr Einfluss in verschiedenen experimentellen Untersuchungen (Yeaman et al., 1992a; Yeaman et al., 1992b; Yeaman, 1997; Krijgsveld et al., 2000; Tang et al., 2002) und klinischen Studien (s. vorheriger Abschnitt).

Durch eine genaue Kenntnis der angeborenen antimikrobiellen Mechanismen des menschlichen Körpers und deren Interaktionen mit z.B. Leukozyten oder anderen Komponenten der erworbenen Immunabwehr könnte es möglich sein, neue anti-infektiöse Therapien gegen Erreger zu entwickeln. Gerade aufgrund der ständig zunehmenden Antibiotika-Resistenzen, neuer Strategien der Erreger, die Immunabwehr zu umgehen, und multiresistenter Erreger, gibt es im klinischen Alltag immer noch zu viele schlecht behandelbare Infektionen mit schweren Verläufen (Davies, 2006; Carmeli, 2008). Daher ist es unbedingt lohnend und notwendig, den Bereich der unspezifischen Immunabwehr weiter zu erforschen.

## V. Zusammenfassung

Neben der Blutungsstillung und Wundheilung nehmen Blutplättchen durch verschiedenartige Mechanismen an der unspezifischen Immunabwehr teil: Sie geben antimikrobielle Peptide ab, setzen reaktive Sauerstoffspezies frei, vermögen Erreger zu internalisieren, setzen chemotaktische Stoffe frei, arbeiten mit dem Komplementsystem zusammen und interagieren mit Plasmaproteinen, dem Endothel und Mediatoren. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die plättchenvermittelte Erregerabwehr am Beispiel verschiedener Stämme von *Borrelia burgdorferi* fluoreszenz- und elektronenmikroskopisch näher erforscht werden.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung verschiedener Borrelienstämmen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber thrombinstimulierten humanen Blutplättchen: Hierzu wurden die Zeckenisolate *B. garinii* B29 und *B. burgdorferi sensu stricto* B31 mit den Patientenisolaten *B. afzelii* PKo38, PKo81, PKo345, PLe verglichen. Die Leistungsfähigkeit der plättchenvermittelten Abwehr sollte anhand verschiedener Einflüsse, wie längerer *in-vitro*-Kultivierung und verschiedener Oberflächenproteine, untersucht werden. B29 und B31 konnten deutlich besser, zu über 90%, abgewehrt werden als die übrigen Stämme, deren Abwehrraten zwischen 50-70% variierten. Möglicherweise sind diese Unterschiede auf das Bindungsverhalten infektiöser und nicht infektiöser Stämme an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_{III}$  des Plättchens zurückzuführen. Infektiöse Borrelienstämmen, wie die Patientenisolate, binden besser an dieses Integrin. Als Bindungspartner kommen u.a. die „outer surface proteins“ (Osp) in Frage. Diese werden von Borrelien in Abhängigkeit vom Wirt exprimiert. In der Zecke bilden sie vorwiegend Osp A aus, innerhalb von 48 h nach Wirtkontakt mit dem menschlichen Körper exprimieren sie hauptsächlich Osp C. Unter den Patientenisolaten gab es hoch und niedrig passagierte Stämme, und einen, der kein Osp C ausprägte. Diese Veränderungen führten hier jedoch zu keinen signifikanten Unterschieden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die plättchenvermittelte Abwehr nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ erforscht: Der Wirkmechanismus, der das Killing der Borrelien zur Folge hat, sollte näher beleuchtet werden. Zu diesem Zweck fanden verschiedene Stimulatoren der Plättchen Verwendung: Thrombin und das synthetische Peptid SFLLRN (Agonist am PAR-1). Thrombinstimulierte Plättchen konnten die Borrelien deutlich besser abwehren. Dies deutet auf eine wesentliche Schlüsselrolle des Thrombin hin. SF aktiviert am Plättchen nur den PAR-1, in Abwesenheit von Thrombin wird PAR-4 nicht aktiviert. Das hat zur Folge, dass die Plättchen nur degranuliert werden und nicht, wie bei

Thrombinstimulierung, außerdem einen Formwandel durchlaufen, größere Mengen von Thromboxan bilden und Plättchenaggregate durch Fibrinbildung entstehen. Diese Ergebnisse sprechen gegen die Annahme, dass allein die antimikrobiellen Proteine für die plättchenvermittelte Abwehr verantwortlich sind. Die Wirkung des Thrombin, möglicherweise als aktive Protease in diesem Geschehen, ist wesentlich.

Als nächstes wurden die thrombinstimulierten Plättchen mit zwei verschiedenen Antioxidantien (L-Ascorbinsäure und  $\alpha$ -Tocopherol) koinkubiert, um zu überprüfen, welche Auswirkung es auf die plättchenvermittelte Abwehr haben würde, die freien Radikale auszuschalten. Eine Inkubation mit L-Ascorbinsäure erbrachte keine Veränderung in der Killingrate. Wurde aber  $\alpha$ -Tocopherol hinzugefügt, sank die plättchenvermittelte Abwehr rate signifikant ab. Da eine alleinige Beteiligung von ROS am plättchenvermittelten Killing aufgrund der eigenen Ergebnisse und einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe unwahrscheinlich war, müssten andere Eigenschaften des  $\alpha$ -Tocopherol hierfür verantwortlich sein: Es hemmt die Proteinkinase C im Plättchen. Sie ist an Aktivierung und Sekretion der Plättchen wesentlich beteiligt. Das bedeutet, dass das  $\alpha$ -Tocopherol die stimulierende Wirkung des Thrombin ganz oder teilweise aufheben könnte. Außerdem hemmt es die Plättchenaggregation und –adhäsion, dadurch ist die Bindung an Bakterien gestört und die plättchenvermittelte Bakterizidie reduziert.

Zuletzt wurden ultrastrukturelle Aufnahmen gemacht, um eine mögliche Phagozytoseaktivität der Plättchen zu untersuchen. Hierbei konnte keine eindeutige Phagozytose nachgewiesen werden. Selten fielen Plättchen mit einer internalisierten Borrelie auf, die sich vermutlich im OCS befand. Ultrastrukturell sah man auch Anschwellungen der Borreliemembran, sogenannte *Gemmata*. Sie sind ein Zeichen für eine gestörte Membranintegrität und -permeabilität.

Insgesamt konnte die These, dass Blutplättchen durch PMP, ROS oder Phagozytose allein eine inhibitorische Wirkung auf Pathogene wie z.B. Borrelien ausüben, nicht belegt werden. Ein wichtiger Aktivator für die plättchenvermittelte Abwehr ist das Thrombin, hierbei ist jedoch die exakte Wirkweise noch nicht geklärt.

## ***VI. Literaturverzeichnis***

Azzi A, Breyer I, Feher M, Ricciarelli R, Stocker A, Zimmer S, Zingg J-M: Nonantioxidant functions of alpha-Tocopherol in smooth muscle cells. *The Journal of nutrition* 131 (2), 378-381 (2001)

Azzi A, Ricciarelli R, Zingg J-M: Non- antioxidant molecular functions of  $\alpha$ -tocopherol (vitamin E). *FEBS letters* 519, 8-10 (2002)

Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT: The production by leucocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation* 52, 741-744 (1973)

Bakaltcheva I, Gyimah D, Reid T: Effects of alpha-tocopherol on platelets and the coagulation system. *Platelets* 12 (7), 389-394 (2001)

Bals R: Antimikrobielle Peptide und Peptidantibiotika. *Med Klinik* 95, 496 –502 (2000)

Barbour AG, Hayes SF: Biology of *Borrelia* Species. *Microbiological Reviews* 50, 381- 400 (1986)

Bennett CE: Ticks and Lyme Disease. *Adv. Parasitol.* 36, 343- 405 (1995)

Benveniste J, Roubin R, Chignard M, Jouvin-Marche E, Le Couedic J-P: Release of platelet-activating factor (PAF-acether) and 2-lyso PAF-acether from three cell types. *Agents and actions.* 12 (5) (1982)

Bland JS: The pro- oxidant and antioxidant effects of Vitamin C. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutics* 3, 170 (1998)

Bordia A, Verma SK: Effect of Vitamin C on platelet adhesiveness and platelet aggregation in coronary artery disease patients. *Clin. Cardiol.* 8, 552- 554 (1985)

Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A: Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (10), 6188-6194 (1991)

- Brade V, Hahn H, Mielke M: Borrelien. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 5. Auflage, 396-403, Springer-Verlag, Heidelberg, 2005
- Brandt E, Ludwig A, Petersen F, Flad H-D: Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunological Reviews* 177, 204-216 (2000a)
- Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehlert JE, Bock L, Flad H-D: The  $\beta$ -thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 471-478 (2000b)
- Brandt U: Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage, 489-514, Springer, Heidelberg, 2007
- Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E, Davis JP: Lyme-Disease - A tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317-1319 (1982)
- Busch U, Will G, Hizo-Teufel C, Wilske B, Praec-Mursic V: Long-term in vitro cultivation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains: influence on plasmid patterns, genome stability and expression of proteins. *Res Microbiol* 148, 109-118 (1997)
- Caccese D, Pratico D, Ghiselli A, Natoli S, Pignatelli P, Sanguigni V, Iuliano L, Violi F: Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation-role of arachidonic acid metabolism. *Thromb.Haemost.* 83, 485-490 (2000)
- Calzada C, Bruckdorfer KR, Rice-Evans CA: The influence of antioxidant nutrients on platelet function in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 128, 97-105 (1997)
- Capron A, Ameisen JC, Joseph M, Auriault C, Tonnel AB, Caen J: New functions for platelets and their pathological implications. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 77, 107 – 114 (1985)
- Capron A, Joseph M, Ameisen JC, Capron M, Pancre V, Auriault C: Platelets as effectors in immune and hypersensitivity reactions. *Int Archs Allergy appl. Immun* 82, 307-312 (1987)
- Carmeli Y: Strategies for managing today's infections. *Clinical microbiology and infection* 14, Suppl 3, 22-31 (2008)

Cesbron J-Y, Capron A, Vargaftig BB, Lagarde M, Pincemail J, Braquet P, Taelman H, Joseph M: Platelets mediate the action of diethylcarbamazine on microfilariae. *Nature* 325, 533-536 (1987)

Chang FY, Singh N, Gayowski T, Wagener M, Mietzner S, Stout J, Marino I: Thrombocytopenia in liver transplant recipients: Predictors, impact on fungal infections, and role of endogenous thrombopoietin. *Transplantation* 69 (1), 70-75 (2000)

Clawson CC , White JG: Platelet interaction with bacteria. II. Fate of the bacteria. *Am J Pathol* 65:381- 398 (1971)

Coburn J, Leong JM, Erban JK: Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mediates binding of the Lyme disease agent *Borrelia burgdorferi* to human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7059-7063 (1993)

Coburn J, Barthold SW, Leong JM: Diverse Lyme disease spirochetes bind integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 on human platelets. *Infect Immun* 62, 5559- 5567 (1994)

Coburn J: Adhesion mechanisms of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Current drug targets/ Infectious disorders* 1 (2), 171-179 (2001)

Copley AL, Witte S: On physiological microthromboembolization as the primary platelet function: Elimination of invaded particles from the circulation and its pathogenic significance. *Thrombosis research* 8, 251-262 (1976)

Copley AL: Roles of platelets in physiological defense mechanisms and pathological conditions. *Folia Haematol Leipzig* 106, 732- 764 (1979)

Dankert J, Krijgsveld J, van der Werff J, Joldersma W, Zaat SAJ: Platelet microbicidal activity is an important defense factor against viridans streptococcal endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases* 184, 597- 605 (2001)

Davies J: Where have all the antibiotics gone? *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology* 17 (5), 287-290 (2006)

Defoe G und Coburn J: Delineation of *Borrelia burgdorferi* p66 sequences required for integrin  $\alpha$ IIb/ $\beta$ 3 recognition. *Infect. Immun.* 69 (5), 3455-3459 (2001)

Deranleau DA, Dubler D, Rothen C, Lüscher EF: Transient kinetics of the rapid shape change of unstirred human blood platelets stimulated with ADP. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 7297- 7301 (1982)

Deuel TF, Senior RM, Huang J-S, Griffin GL: Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 69, 1046-1049 (1982)

Deuel TF, Huang J-S: Platelet-derived growth factor: structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J Clin Invest* 74, 669-676 (1984)

Egger G: Die akute Entzündung. Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität. Springer- Verlag, Wien, 2005

Fenton JW 2<sup>nd</sup>: Thrombin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 485, 5-15 (1986)

Ferns GAA, Forster LA, Williams JC, Tull SP, Verma PK, Starkey B, Gershlick AH: Effect of Vitamin E supplementation on circulating cell adhesion molecules pre- and post- coronary angioplasty. *Ann. Clin. Biochem.*37, 649- 654 (2000)

Fingerle V, Liegl G, Munderloh U, Wilske B: Expression of outer surface proteins A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks removed from humans. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 121- 126 (1998)

Fingerle V, Laux H, Munderloh UG, Schulte- Spechtel U, Wilske B: Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med. Microbiol. Immunol.* 189, 59-66 (2000)

Fitzgerald JR, Foster TJ, Cox D: The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nature reviews microbiology* 4 (6), 445-457 (2006)

Fox JEB: Regulation of platelet function by the cytoskeleton. *Advances in experimental medicine and biology* 344, 175-185 (1993)

Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keaney JF: Alpha-Tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a Protein Kinase C-dependent mechanism. *Circulation* 94, 2434-2440 (1996)

Gawaz M, Neumann F-J, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz K-L, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K: Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule- 1 on endothelial cells. *Circulation*, 98, 1164-1171 (1998)

Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Prasad Kari U, Zasloff M, Wilson JM: Human beta-Defensin- 1 is a salt- sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 88, 553-560 (1997)

Güner ES: Retention of *B.burgdorferi* pathogenicity and infectivity after multiple passages in a co-culture system. *Experientia* 50, 54- 59 (1994)

Hantgan RB: A study of the kinetics of ADP- triggered platelet shape change. *Blood* 64, 896- 906 (1984)

Harder J, Bartels J, Christophers E, Schröder J-M: A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387, 861 (1997)

Harrison P, Cramer EM: Platelet alpha- granules. *Blood Rev* 7, 52- 62 (1993)

Hayes SF, Burgdorfer W, Barbour AG: Bacteriophage in the *Ixodes dammini* Spirochete, etiological agent of Lyme Disease. *Journal of Bacteriology* 154 (3), 1436-1439 (1983)

Heinrich PC, Haan S, Hermanns HM, Löffler G, Müller-Newen G, Schaper F: Kommunikation zwischen Zellen: Extrazelluläre Signalmoleküle, Rezeptoren und Signaltransduktion. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC : *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Aufl., 757-808, Springer, Heidelberg, 2007

Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*, 391, 591-594 (1998)

Herd CM, Page CP: Pulmonary immune cells in health and disease: platelets. *Eur Respir J* 7, 1145-1160 (1994)

- Herzberg MC, Gong KE, MacFarlane GD, Erickson PR, Soberay AH, Krebsbach PH, Manjula G, Schilling K, Bowen WH: Phenotypic characterization of *Streptococcus sanguis* virulence factors associated with bacterial endocarditis. *Infection and Immunity* 58, 515- 522 (1990)
- Higashi O, Kikuchi Y: In vitro effects of Vitamin E on hydrogen peroxide- induced platelet aggregation. *Tohoku J. exp. Med.* 111, 99-100 (1973)
- Hirsch JG: Comparative bacteriocidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med* 112, 15-22 (1960)
- Holmsen H, Kaplan KL, Dangelmaier CA: Differential energy requirements for platelet responses. *Biochem. J.* 208, 9-18 (1982)
- Huttner KM, Selsted ME, Oulette AJ: Structure and diversity of the murine cryptdin gene family. *Genomics* 19, 448- 453 (1994)
- Ibelgaufts H: Lexikon Zytokine. Medikon Verlag München, 1992
- Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Pratico D, Violi F: Oxygen free radicals and platelet activation. *Free radical biology & medicine* 22 (6), 999-1006 (1997)
- Jandak J, Steiner M, Richardson PD: Reduction of platelet adhesiveness by Vitamin E supplementation in humans. *Thrombosis research* 49 (4), 393- 404 (1988)
- Jandak J, Steiner M, Richardson PD: alpha- Tocopherol, an effective inhibitor of platelet adhesion. *Blood* 73 (1), 141-149 (1989)
- Janeway ChA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunologie.  
5. Auflage, 1- 96, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002
- Jaschonek K: Hämorrhagische und thrombophile Diathesen. In: Hornbostel H, Kaufmann W, Siegenthaler W: Innere Medizin in Praxis und Klinik, Band III. 4.Auflage, 11.184-11.239, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1991
- Jelkmann W: Blut und Immunabwehr. In: Schmidt RF, Lang F: Physiologie des Menschen. 30. Aufl., 523-549, Springer- Verlag, Heidelberg, 2007

Johnson RC, Marek N, Kodner C: Infection of Syrian hamsters with Lyme disease spirochetes. *J Clin Microbiol* 20, 1099-1101 (1984)

Joseph M, Auriault C, Capron A, Vorng H, Viens P: A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303, 810- 812 (1983)

Joseph M, Auriault C, Capron M, Ameisen JC, Pancre V, Torpier G, Kusnierz JP, Ovlaque G, Capron A: IgE- dependent platelet cytotoxicity against helminths. *Adv Exp Med Biol* 184, 23- 33 (1985)

Joseph M, Tscopoulos A, Tonnel A-B, Capron A: Modulation by nedocromil sodium of immunologic and nonimmunologic activation of monocytes, macrophages, and platelets. *The journal of allergy and clinical immunology* 92, 165-170 (1993)

Jurk K, Kehrel BE: Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose. *Immunabwehr und Entzündung. Deutsche Medizinische Wochenschrift* 133, 1130-1135 (2008)

Kaplan KL, Broekman MJ, Chernoff A, Lesznik GR, Drillings M: Platelet alpha- granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood* 53, 604-618 (1979)

Keller R: *Immunologie und Immunpathologie. Eine Einführung.* 3. Aufl., Thieme- Verlag, Stuttgart, 1987

Key LL jr., Wolf WC, Gundberg CM, Ries WL: Superoxide and bone resorption. *Bone* 15 (4), 431-436 (1994)

Kinlough-Rathbone RL, Perry DW, Guccione MA, Rand ML, Packham MA: Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: Comparison with degranulation by thrombin. *Thromb Haemost* 70, 1019-1023 (1993)

Kirkpatrick B, Reeves DS, MacGowan AP: A review of the clinical presentation, laboratory features, antimicrobial therapy and outcome of 77 episodes of pneumococcal meningitis occurring in children and adults. *Journal of Infection* 29, 171-182 (1994)

Klinger MHF: Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 196, 1-11 (1997)

Klinger MHF, Wilske B, Rittig MG: Ultrastructural aspects of the interaction between human platelets and *Borrelia burgdorferi* in vitro. *Ann Anat* 180 (Suppl.) : 239 (1998)

Klinger MHF: Inflammation. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 459- 467, London, Academic Press, 2002

Klinger MHF, Jelkmann W: Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 22, 913- 922 (2002)

Klinger MHF, Ulbricht T: Participation of human blood platelets in antimicrobial host defense. *Transfusion medicine and hemotherapy* 30, 57-62 (2003)

Kramer MD, Wallich R, Hofmann H, Simon MM: Lyme- Borreliose. Stand und Perspektiven der Diagnostik und Impfstoffentwicklung. *Deutsches Ärzteblatt* 97 (49), A 3352- 3354 (2000)

Krijgsveld J, Zaat SAJ, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, Brandt E, Ehlert JE, Kuijpers AJ, Engbers GHM, Feijen J, Dankert J: Thrombocidins, microbiocidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 275, 20374-20381 (2000)

Krötz F, Sohn H-Y, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U: NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Hemostasis, Blood* 100 (3), 917-924 (2002)

Kuijpers AJ, Engbers GH, van Wachem PB, Krijgsveld J, Zaat SAJ, Dankert J, Feijen J: Controlled delivery of antibacterial proteins from biodegradable matrices. *Journal of controlled release* 53, 235-247 (1998)

Kuijpers AJ, van Wachem PB, van Luyn MJ, Engbers GH, Krijgsveld J, Zaat SA, Dankert J, Feijen J: In vivo and in vitro release of lysozyme from cross- linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. *J Control Release* 67, 323- 336 (2000)

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffman JA: The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/ toll/ cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973- 983 (1996)

Leong JM, Wang H, Magoun L, Field JA, Morrissey PE, Robbins D, Tatro JB, Coburn J, Parveen N: Different classes of proteoglycans contribute to the attachment of *Borrelia burgdorferi* to cultured endothelial and brain cells. *Infect Immun* 66, 994-999 (1998)

Lewis JC, Maldonado JE, Mann KG: Phagocytosis in human platelets: Localization of acid phosphatase- positive phagosomes following latex uptake. *Blood* 47, 833-840 (1976)

Löffler G, Brigelius-Flohe R: Vitamine. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Auflage, 680-712, Springer, Heidelberg, 2007

Machlin LJ: Clinical uses of vitamin E. *Acta Vitaminol Enzymol* 7 Suppl., 33-43 (1985)

Marcus AJ, Silk ST, Safier LB, Ullman HL: Superoxide production and reducing activity in human platelets. *The Journal of Clinical Investigation* 59, 149-158 (1977)

Movat HZ, Weiser WJ, Glynn MF, Mustard JF: Platelet phagocytosis and aggregation. *The Journal of cell biology* 27, 531-543 (1965)

Obonyo M, Munderloh UG, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ: *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (7), 2137-2141 (1999)

Oulette AJ, Lualdi JC: A novel mouse gene family coding for cationic, cysteine- rich peptides. *The Journal of Biological Chemistry* 265, 9831-9837 (1990)

Packham MA, Nishizawa EE, Mustard JF: Response of platelets to tissue injury. *Biochem. Pharmacol.* 17 (Suppl.), 171-184 (1968)

Page CP: Platelets as inflammatory cells. *Immunopharmacology* 17, 51-59 (1989)

Peters MJ, Dixon G, Kotowicz KT, Hatch DJ, Heyderman RS, Klein NJ: Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing. *British Journal of Haematology* 106, 391-399 (1999)

Petrides PE: Blut. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC : *Biochemie & Pathobiochemie*. 8. Aufl., 951-1000, Springer, Heidelberg, 2007

- Polley MJ, Nachman R: The human complement system in thrombin-mediated platelet function. *The journal of experimental medicine* 147 (6), 1713-1726 (1978)
- Praec-Mursic V, Wilske B, Schierz G: European *Borrelia burgdorferi* isolated from humans and ticks. Culture conditions and antibiotic susceptibility. *Zbl Bakt Hyg A* 263, 112- 118 (1986)
- Pulcinelli FM, Pignatelli P, Violi F, Gazzaniga PP: Platelets and oxygen radicals: mechanisms of functional modulation. *Haematologica* 86, 31-34 (2001)
- Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Özer NK, Boscoboinik D, Azzi A: Alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* 334, 243-249 (1998)
- Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). Aufgestellt vom wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer und vom Paul-Ehrlich- Institut. Fassung 2000. Mit Neufassungen und Kommentaren 2001. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln (2002)
- Riebandt T, Klinger MHF, Wilske B, Rittig M: Human blood platelets effectively kill *Borrelia burgdorferi* upon thrombin stimulation in vitro. VIII. International Conference on Lyme Borreliosis and other Emerging Tick-Borne Diseases. München, 20.-24.6.1999 (1999a)
- Riebandt T, Wilske B, Rittig MG, Klinger MHF: Killing of *Borrelia burgdorferi* by thrombin-stimulated human platelets in vitro. 9. Ostsee- Anatomen- Treffen, Rostock, 25.-26.6. 1999 (1999b)
- Robert Koch-Institut, Ratgeber Infektionskrankheiten, Epidemiologisches Bulletin Nr. 17, 147-154 (2007)
- Sachs L: Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden. 11.Auflage, Springer- Verlag, Berlin Heidelberg (2004)
- Sagawa T, Kodama T, Tominaga A, Okada M: Human platelets effectively kill K- 562 cells, a chronic myelogenic leukaemia cell line, in vitro. *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 449-453 (1990)
- Saratzis N, Saratzis A, Melas N, Kiskinis D: Non- activated autologous platelet-rich plasma for the prevention of inguinal wound-related complications after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *The journal of extra-corporal technology* 40 (1), 52-56 (2008)

- Schierholz JM, Beuth J, Pulverer G: "Difficult to treat infections" Pharmacokinetic and pharmacodynamik factors. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 47 (1), 1-8 (2000)
- Schindler TH, Lewandowski E, Olschewski M, Hasler K, Solzbach U, Just H: Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern. *Medizinische Klinik* 97, 263-269 (2002)
- Schröder J-M: Clinical significance of epithelial peptide antibiotics. *BioDrugs* 5, 293-300 (1999)
- Shuman, MA: Thrombin-cellular interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 485, 228-239 (1986)
- Sigal LH: Lyme borreliosis (Lyme disease): Interactions of *Borrelia burgdorferi sensu lato* with human (and other mammalian) hosts. *Bull Inst Pasteur* 96, 189-206 (1998)
- de Silva AM, Fikrig E: *Borrelia burgdorferi* genes selectively expressed in ticks and mammals. *Parasitology Today* 13, 267-270 (1997)
- Sima P, Trebichavsky I, Sigler K: Mammalian Antibiotic Peptides. *Folia Microbiol.* 48 (2), 123-137 (2003)
- Simonet M, Triadou P, Frehel C, Morel-Kopp M-Ch, Kaplan C, Berche P: Human platelet aggregation by *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by invasin. *Infection and Immunity* 60, 366-373 (1992)
- Standardvorschriften aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Stand 08.05.01
- Stanek G und Strie F: Lyme borreliosis. *Lancet* 362, 1639-1647 (2003)
- Steiner M: Influence of Vitamin E on platelet function in humans. *Journal of the American College of Nutrition* 10 (5), 466-473 (1991)
- Steiner M: Alpha-Tocopherol: A potent inhibitor of platelet adhesion. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 191-195 (1992)
- Steiner M: Vitamin E: More than an antioxidant. *Clin. Cardiol.* 16, 16-18 (1993)

Sullam PM, Frank U, Yeaman MR, Täuber MG, Bayer AS, Chambers HF: Effect of thrombocytopenia on the early course of streptococcal endocarditis. *The Journal of Infectious Diseases* 168, 910-914 (1993)

Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME: Purification, characterization, and antimicrobial properties of peptides released from thrombin-induced human platelets. *Blood* 86, 910a (1995)

Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME: Antimicrobial peptides from human platelets. *Infection and Immunity* 70 (12), 6524-6533 (2002)

Tappel AL: Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Annals of the New York Academy of Sciences* 203, 12- 18 (1972)

Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli G-M, Maroni P, Azzi A: D-Alpha-Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 12190-12194 (1995)

Tolentino AR, Bahou WF: Thrombin Receptors. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 117- 138, London, Academic Press, 2002

Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr., Ganz T: Human beta- Defensin- 1 : An antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 101, 1633- 1642 (1998)

Villacorta L, Azzi A, Zingg JM: Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. *Molecular aspects of medicine* 28, 507-537 (2007)

Virta M, Lineri S, Kankaanpää P, Karp M, Peltonen K, Nuutila J, Lilius E-M: Determination of complement-mediated killing of bacteria by viability staining and bioluminescence. *Applied and environmental Microbiology* 64 (2), 515-519 (1998)

Vu T-K H, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR: Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64 (6), 1057-68 (1991)

Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A: Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 13 (3), 175-182 (2002)

Ward PA, Cunningham TW, McCulloch, Phan KK, Powell J, Johnson KJ: Platelet enhancement of O<sup>2</sup>-. responses in stimulated human neutrophils. Identification of platelet factor as adenine nucleotide. *Lab Invest* 58, 37-47 (1988)

Weksler BB, Nachman RL: Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med* 134, 1114-1130 (1971)

White JG, Rao GHR, Gerrard JM: Effects of nitroblue tetrazolium and Vitamin E on platelet ultrastructure, aggregation, and secretion. *American Journal of Pathology* 88 (2), 387- 402 (1977)

White JG, Rao GHR, Gerrard JM: Vitamin E and platelets. *The American Journal of Pediatric Hematology/ Oncology* 1, 155- 168 (1979)

White JG, Clawson CC: Effects of large latex particle uptake of the surface connected canalicular system of blood platelets: a freeze-fracture and cytochemical study. *Ultrastructural Pathology* 2, 277-287 (1981)

White JG, Escolar G: The blood platelet open canalicular system: a two-way street. *European Journal of Cell Biology* 56, 233-242 (1991)

White JG: Platelets are covercytes, not phagocytes: Uptake of bacteria involves channels of the open canalicular system. *Platelets* 16 (2), 121-131 (2005)

White JG: Why human platelets fail to kill bacteria. *Platelets* 17 (3), 191-200 (2006)

Williams JC, Forster LA, Tull SP, Wong M, Bevan RJ, Ferns GAA: Dietary vitamin E supplementation inhibits thrombin- induced platelet aggregation, but not monocyte adhesiveness, in patients with hypercholesterolaemia. *Int J Exp Path* 78, 259-266 (1997)

Williams JC, Forster LA, Tull SP, Ferns GAA: Effects of vitamin E on human platelet and mononuclear cell responses in vitro. *Int J Exp Path* 80, 227-234 (1999)

Wilske B, Praec- Mursic V, Göbel UB, Graf B, Jauris S, Soutschek E, Schwab E, Zumstein G: An Osp A serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and Osp A sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 340- 350 (1993)

Wilske B , Fingerle V: Diagnostik der Lyme- Borreliose. Wie Sie den Verdacht auf Borreliose erhärten. *MMW Fortschr. Med.* 142 ( 15), 28-31 (2000)

Wilske B: Epidemiology and diagnosis of Lyme borreliosis. *Annals of Medicine* 37, 568-579 (2005)

Wooten RM, Weis JJ: Host-pathogen interactions promoting inflammatory Lyme arthritis: use of mouse models for dissection of disease processes. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 274-279 (2001)

Wurzinger LJ, Opitz R, Wolf M, Schmid- Schönbein H: Ultrastructural investigations on the question of mechanical activation of blood platelets. *Blut* 54, 97-107 (1987)

Wurzinger LJ: Histophysiology of the circulating platelet. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology* 120, Springer Verlag, 1990

Wurzinger LJ, Zanner R: Blut. In: Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M: *Histologie*. 6. Aufl., 187-206, Springer-Verlag, Heidelberg, 2005

Xu W-F, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC : Cloning and characterization of human protease- activated receptor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, 6642-6646 (1998)

Yeaman MR, Norman DC, Bayer AS : Platelet microbicidal protein enhances antibiotic- induced killing of and postantibiotic effect in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 36 (8), 1665-1670 (1992b)

Yeaman MR, Puentes SM, Norman DC, Bayer AS : Partial characterization and staphylocidal activity of thrombin- induced platelet microbicidal protein. *Infection and Immunity* 60 (3), 1202-1209 (1992a)

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

Yeaman MR, Bayer AS. Antimicrobial host defense. In: Michelson AD, editor. *Platelets*. 469-490, London, Academic Press, 2002

Yeaman MR, Bayer AS: Antimicrobial peptides versus invasive infections. *Current topics in microbiology and immunology* 306, 111-152 (2006)

Yount NY, Gank KD, Xiong YQ, Bayer AS, Pender T, Welch WH, Yeaman MR: Platelet microbicidal protein-1: structural themes of a multifunctional antimicrobial peptide. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 4395-4404 (2004)

Youssefian T, Drouin A, Masse J-M, Guichard J, Cramer EM: Host defense role of platelets: engulfment of HIV and *Staphylococcus aureus* occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation. *Blood* 99 (11), 4021-4029 (2002)

Zander DMW: Bakterizide Mechanismen *in vitro* stimulierter humaner Blutplättchen. Med. Diss. Leipzig, 2007

Zimmerman TS, Kolb WP: Human platelet-initiated formation and uptake of the C5-9 complex of human complement. *The journal of clinical investigation* 57 (1), 203-211 (1976)

## *Danksagung*

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. M.H.F. Klinger ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung sowohl bei den Laboruntersuchungen als auch bei der Verfassung des Textes, bedanken. Besonders gefreut hat mich in seiner Arbeitsgruppe die Verbindung aus mikroskopischen Arbeitstechniken und dem „Versuchsobjekt“ Borrelie.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. W. Kühnel danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit im Institut für Anatomie unter seiner Leitung zu beginnen. Er unterstützte freundlich die Anfänge der Untersuchung.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. J. Westermann, der die Fortsetzung und Beendigung der Arbeit als neuer Leiter des Institutes für Anatomie ermöglichte.

Prof. Dr. med. B. Wilske vom Max von Pettenkofer- Institut in München danke ich für die Übersendung der Borrelienstämme aus Patientenisolaten und deren speziellem Medium.

Herrn PD Dr. med. P. Schlenke danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und Bereitstellung von Thrombozytenkonzentraten aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin.

Frau Tine Asmus, Herrn Harry Manfeldt und Chris Örün danke ich für die Hilfe bezüglich der Elektronenmikroskopie.

Frau Marion Stresow danke ich für die orthografische Durchsicht.

Ein besonderes Dankeschön geht an PD Dr. rer. physiol. Dipl. Psych. H.-J. Friedrich, der mich über die ganze Zeit von der Planung bis zur endgültigen schriftlichen Fassung im Bezug auf die statistische Auswertung beraten hat.

Ganz herzlich danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium und die Durchführung der Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht haben und mich bis zu deren Beendigung immer bereitwillig unterstützt haben.

Bedanken möchte ich mich bei meinem Mann dafür, daß er zur Fertigstellung dieser Arbeit durch selbstloses, geduldiges, optimistisches „Rücken-Freihalten“ bezüglich Kinderbetreuung etc. entscheidend beigetragen hat.

## ***Lebenslauf***

### Persönliche Daten

Name: Clasing, geb. Wobker  
 Vorname: Carola  
 Anschrift: Am Waldesrand 24, 21397 Vastorf  
 Telefon: 04137/813517  
 email: cclasing@web.de  
 Geburtsdatum/-ort: 23. Juni 1976 in Bremen  
 Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

### Schulbildung

1982-1986 Grundschule Bungerhof in Delmenhorst  
 1986-1988 Orientierungsstufen in Delmenhorst und Ganderkesee  
 1988-1995 Gymnasium Ganderkesee  
 15.Mai 1995 Abitur

### Studium

1995-2003 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen  
 Universität zu Lübeck  
 09/1998 Physikum  
 08/1999 1. Staatsexamen  
 03/2002 2. Staatsexamen  
 06/2003 3. Staatsexamen

### Praktisches Jahr

15.4. – 2.8.2002 Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum  
 Lübeck; Prof. Dr. med. P. Schmucker  
 5.8. - 27.9.2002 Vascular Surgery, University College Hospital Galway,  
 Irland; Consultant Dr. D. Courtney  
 30.9. – 22.11.2002 Allgemein- und Viszeralchirurgie, Regionalspital Thusis,  
 Kanton Graubünden, Schweiz; Chefarzt Dr. med. D. Scharplatz  
 25.11.02 – 14.3.03 Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Süd, Lübeck;  
 Chefarzt Prof. Dr. med. Hütteroth

Berufstätigkeit

08/2003 – 10/2004 Ärztin im Praktikum, Klinikum Bremen-Nord,  
II. Medizinischen Abteilung, Schwerpunkt Angiologie und  
Diabetologie; Chefarzt Professor Dr. med. H.-U. Janka

seit 10/2004 Assistenzärztin, Klinikum Bremen-Nord,  
II. Medizinischen Abteilung, Schwerpunkt Angiologie und  
Diabetologie; Chefarzt Professor Dr. med. H.-U. Janka

seit 03/2007 Elternzeit bis voraussichtlich 06/2009

Promotion

seit 01/2000 Dauer der experimentellen Arbeiten bis 07/2002

## ***Publikationen***

- C. Wobker, B. Wilske, B. Zaat, J. Krijgsveld, M. H. F. Klinger:  
Thrombin- stimulierte humane Blutplättchen töten infektiöse Stämme von *Borrelia burgdorferi* mit geringerer Effektivität als Borrelienisolate aus Zecken.  
Vortrag bei der 96. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft in Münster, 23.3.-26.3.2001
- C. Wobker und M.H.F. Klinger: Die Beteiligung humaner Blutplättchen an der unspezifischen Abwehr - Untersuchungen an verschiedenen Borrelienstämmen. Focus MUL, 18 (2), 91-98 (2001)