

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

Mikrobiozide Eigenschaften aktivierter humaner Blutplättchen

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

vorgelegt von
Tobias Ulbricht
aus Brandenburg an der Havel

Lübeck 2010

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

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2010

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 26.11.2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Blutplättchen	1
1.1.1	Klärung der Begriffe: Thrombozyt versus Blutplättchen	1
1.1.2	Morphologie der Blutplättchen	2
1.1.3	Stimulation der Plättchen	3
1.1.3.1	Thrombin	4
1.1.3.2	Stimulation der Plättchen durch Thrombin und weitere Agonisten	4
1.1.4	Funktion der Plättchen	6
1.1.4.1	Blutungsstillung und Gerinnung	6
1.1.4.2	Entzündung	8
1.1.4.3	Infektabwehr	9
1.2	Unspezifische Abwehr	10
1.2.1	Phagozytose	11
1.2.2	Mikrobiozide Peptide	12
1.2.3	Komplement	13
1.3	Verwendete Bakterien	13
1.3.1	Borrelia	13
1.3.2	Bacillus subtilis	14
1.3.3	Klebsiella pneumoniae	15
1.3.4	Chlamydia pneumoniae	16
1.4	Arbeitshypothese	18

2 Material und Methoden

2.1	Verwendete Chemikalien und Lösungen	20
2.2	Verbrauchsmittel	20
2.3	Geräte	21
2.4	Plättchenpräparation	21
2.5	Bakterienkulturen	23
2.6	Fluoreszenzmikroskopie	24

2.7	Elektronenmikroskopie	25
2.8	Versuchsablauf	26
2.8.1	Kontrollpräparate	27
2.8.2	Inkubation und Färbung	27
2.8.3	Mikroskopische Auswertung	30
3	Ergebnisse	
3.1	Morphologische Aspekte der plättchenvermittelten bakteriziden Effekte	32
3.1.1	Blutplättchen	32
3.1.2	Borrelien	33
3.1.3	Bacillus subtilis	38
3.1.4	Klebsiella pneumoniae	40
3.1.5	Chlamydia pneumoniae	40
3.2	Quantitative Erfassung der bakteriziden Effekte	41
3.2.1	Ausgangssituation und Kontrollwerte	41
3.2.2	Borrelien	42
3.2.3	Bacillus subtilis	44
3.2.4	Klebsiella pneumoniae	45
3.2.5	Chlamydia pneumoniae	46
3.2.6	Einfluss von direkten Kontakten	48
4	Diskussion	50
5	Zusammenfassung	57
6	Literaturverzeichnis	59
7	Danksagung	66
8	Lebenslauf und Publikationen	67

Abkürzungsverzeichnis

Ø	– Durchmesser
Abb.	– Abbildung
ACA	– lat. Acrodermatitis chronica atrophicans
a.d.	– lat. Aqua destillata
ADP	– Adenosindiphosphat
ATP	– Adenosintriphosphat
B29	– Bakterienstamm <i>Borrelia garinii</i>
B31	– Bakterienstamm <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>
B. subtilis	– Bakterienstamm <i>Bacillus subtilis</i>
BC	– engl. buffy coat
BSA	– Bovines Serumalbumin
BSG	– Blutsenkungsgeschwindigkeit
β-TG	– β-Thromboglobulin
CTAP-III	– engl. connective tissue activating peptide
C. pneumoniae	– Bakterienstamm <i>Chlamydia pneumoniae</i>
DNA	– engl. desoxyribonucleic acid
DTS	– engl. dense tubular system
EGF	– engl. epidermal growth factor
EM	– Elektronenmikroskop
et al.	– lat. et alii
FGF	– engl. fibroblast growth factor
g	– Gramm
K. pneumoniae	– Bakterienstamm <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kap.	– Kapitel
LIVE/DEAD® BacLIGHT™	– DNA-Fluoreszenzfarbstoff
M	– Mol
mg	– Milligramm
mmol	– Millimol
mRNA	– engl. messenger ribonucleic acid
n	– Anzahl der Bakterien / Untersuchungen
NaCl	– Natriumchlorid
NADH	– Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid

NADPH	– Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NAP-2	– engl. neutrophil activating peptid-2
OCS	– engl. open canalicular system
OsO ₄	– Osmiumtetroxid
PAF	– Plättchenaktivierender Faktor
PAR-1	– engl. protease activated receptor 1
PAR-4	– engl. protease activated receptor 4
PBP	– engl. platelet basic protein
PBS	– engl. phosphate buffered saline
PDGF	– engl. platelet derived growth factor
PF3	– Plättchenfaktor 3
PF4	– Plättchenfaktor 4
PK	– Plättchenkonzentrat
PMP	– engl. platelet microbicidal protein
PRP	– Plättchen-reiches Plasma
RANTES	– engl. regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted
rER	– Raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	– engl. ribonucleic acid
SD	– engl. standard deviation
SDP	– engl. single donor platelets
SFLLRN	– synthetischer Thrombinrezeptoragonist
Tab.	– Tabelle
TEM	– Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	– engl. transforming growth factor
TK	– Thrombozytenkonzentrat
TLRs	– engl. toll-like receptors
TSP	– Thrombospondin
TXA ₂	– Thromboxan A ₂
U	– unit(s)
u.a.	– unter anderem
Vgl.	– vergleiche
vWF	– von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Durch den starken Einsatz von Antibiotika in Medizin, Landwirtschaft und Industrie bilden sich immer mehr Resistenzen bei Mikroorganismen aus. Neben der Entwicklung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen müssen deshalb auch die komplexen Zusammenhänge der körpereigenen Abwehrmechanismen Bestandteil der Forschung sein, um eventuell neue Prinzipien der antimikrobiellen Abwehr zu entdecken.

Nach Eindringen eines Pathogens in einen Organismus reagieren zuerst die Komponenten der unspezifischen Abwehr und machen den Krankheitserreger meist unschädlich. Ist die unspezifische Abwehr jedoch erfolglos, kann die Aktivierung der spezifischen Immunabwehr erfolgen, um z.B. Antikörper zu bilden. Viele Pathogene lösen jedoch gar keine spezifische Immunabwehr aus, da die unspezifische Abwehr durch z.B. Granulozyten oftmals effektiv genug ist. Zu den Komponenten der unspezifischen Abwehr gehören Zellen und Mechanismen, wie z.B. Leukozyten und Makrophagen, welche das Pathogen phagozytieren und mithilfe von bakteriziden Proteinen und Enzymen zersetzen.

Wird ein Blutgefäß verletzt, sind es die Blutplättchen, die in großer Zahl in ersten Kontakt mit dem eindringenden Pathogen geraten. Hier stellt sich die Frage, ob Plättchen in der Lage sind, solche Eindringlinge abzuwehren. Die dort ablaufenden Mechanismen könnten von großem Interesse für neue Therapieansätze gegen Infektionen sein.

1.1 Blutplättchen

1.1.1 Klärung der Begriffe: Thrombozyt versus Blutplättchen

Die Begriffe Thrombozyten und Plättchen bzw. Blutplättchen werden synonym gebraucht und bezeichnen kleine ($\varnothing$ 2 - 4 μm , Dicke 0,5 – 0,75 μm) korpuskuläre kernlose Blutelemente, die von Megakaryozyten des Knochenmarks abstammen.

Der Begriff Thrombozyt stammt aus der Biologie und beschreibt im engeren Sinne kernhaltige Zellen bei Vögeln und Reptilien.

Der Name „Blutplättchen" bzw. "Plättchen" ist meiner Meinung nach zutreffender, da es sich bei diesen Blutbestandteilen um extrem kleine kernlose Bruchstücke einer Vorläuferzelle handelt und nicht um eine Zelle (Zyt). Anders verhält es sich bei z.B. Erythrozyten. Hierbei handelt es sich um ganze Zellen, welche ihren Zellkern ausgestoßen haben.

1.1.2 Morphologie der Blutplättchen

Die Vorläuferzellen der Blutplättchen sind Megakaryozyten. Aus einer von diesen im Knochenmark sesshaften Riesenzellen entwickeln sich bis zu 8000 Plättchen. Dabei wird das organellenhaltige Zytoplasma der Megakaryozyten durch Abschnürung zergliedert und es entstehen Blutplättchen mit einem Durchmesser von 2 - 4 μm . Im Normalfall befinden sich 150 000 bis 350 000 Plättchen in 1 μl Blut. Die mittlere Verweildauer der Plättchen im Blut beträgt 8 – 12 Tage (AAS und GARDNER et al. 1958). Der Abbau alter Plättchen findet in Lunge, Leber und Milz durch Makrophagen statt.

Nach Aktivierung der Plättchen werden im Elektronenmikroskop Mikrofilamente sichtbar, die aus Aktin, Myosin und Tropomyosin bestehen. Plättchen enthalten Granula, Mitochondrien und Glykogenpartikel sowie viel ATP. Des Weiteren verfügen Blutplättchen über die Enzyme der Glykolyse, des Zitronensäurezyklus, des Pentosephosphatzyklus und der Atmungskette. Morphologisch und bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung unterscheidet man α - und δ -Granula (sog. elektronendichte Granula), Peroxysomen und Lysosomen. Die α -Granula sind ca. 150 bis 250 nm groß und nehmen 10 % des Plättchenvolumens ein (WURZINGER et al. 1990). Sie enthalten Gerinnungsfaktoren, sowie Entzündungs- und Wachstumsmediatoren, adhäsive Proteine und bakterizide Peptide. Im elektronendichten Kern der α -Granula findet man β -Thromboglobulin (β -TG), Plättchenfaktor 4 (PF4) und Proteoglykane. Weitere Inhaltsstoffe sind Fibrinogen, Thrombospondin (TSP) und Albumin. Die Lysosomen enthalten saure Hydrolasen (HARRISON et al. 1993; HOLMSEN et al. 1979; HOLMSEN et al. 1985; KRIJGSFELD et al. 2000; TANG et al. 2002; WURZINGER et al. 1990).

α-GRANULA	Fibrinogen Gerinnungsfaktoren V und VIII (vWF) Fibronectin Thrombospondin Immunglobuline (IgA, IgG, IgE) Albumin HMWK (high molecular weight kininogen) TGF- β (transforming growth factor- β) Kallikrein Kininogen P-Selektin α 2-Makroglobulin α 2-Antitrypsin NAP-II (neutrophil activating peptide II) MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 alpha) CCL5 (früher RANTES: Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed, and Secreted) PDGF (platelet derived growth factor) 12-HETE (12-Hydroxyeicosatetraenoic acid) Plättchenfaktor 4 β -Thromboglobulin
δ-GRANULA	ATP, ADP GTP (Guanosin-5'-triphosphat) GDP (Guanosin-5'-diphosphat) anorganische Phosphate Kalzium Dopamin Noradrenalin, Adrenalin Histamin und Serotonin
LYSOSOMEN	Saure Hydrolasen
PEROXISOMEN	Katalase

Tab. 1: Plättchengranula und ihre Inhaltsstoffe (MICHELSON et al. 2002)

1.1.3 Stimulation der Plättchen

Zirkulierende Blutplättchen kommen normalerweise nicht mit subendothelialen Strukturen der Gefäßwände in Kontakt. Voraussetzung dafür ist eine intakte und lückenlose Auskleidung der Blutgefäße mit Endothel. Ist die Gefäßwand jedoch verletzt, kommt es nacheinander zur Adhäsion, Aggregation und Aktivierung der Blutplättchen. Bei der Adhäsion binden die Blutplättchen an das Endothel bzw. Subendothel. Gleichzeitig erfolgt eine Stimulierung der Plättchen. Es folgt die

reversible Aggregation, d.h. die Verbindung der Plättchen untereinander. Dabei lässt jedoch nicht jede kleine Verletzung Thromben entstehen. Ist der Defekt groß genug, folgen irreversible Aggregation und Aktivierung der Plättchen (WEISS et al. 1990).

Plättchen reagieren sehr schnell auf äußere Reize. Neben dem Kollagenkontakt bei Endothelverletzungen sorgen auch Verwirbelungen im Blutstrom oder Kontakt mit körperfremden Oberflächen (z.B. einer Glasoberfläche während eines Experiments), oder chemischen Substanzen wie z.B. Thrombin oder ADP für eine Stimulierung der Blutplättchen. Bei der Aktivierung der Plättchen kommt es zum Formwandel und zur Sekretion von Granulainhalt (WEISS et al. 1990).

1.1.3.1 Thrombin

Thrombin ist eine Serinprotease. Die Bildung der inaktiven Thrombinvorstufe Prothrombin erfolgt in der Leber. Die normale Konzentration beträgt 60 - 100 mg/l im Plasma (BLANCHARD et al. 1981). Prothrombin wird durch Gerinnungsfaktoren zu Thrombin umgewandelt (Abb. 1). Diese Gerinnungsfaktoren sind proteolytische Enzyme, die in inaktiver Form im Plasma vorliegen und bei Bedarf aktiviert werden. (SCHMIDT et al. 2004, **HOFFMAN and MONROE et al. 2001**).

1.1.3.2 Stimulation der Plättchen durch Thrombin und weitere Agonisten

Ist die endotheliale Auskleidung eines Blutgefäßes verletzt, binden Glykoproteine der Plättchenoberfläche an freigelegte Kollagenfasern. Es folgt eine komplexe Reaktionskaskade, die letztendlich zu einem Verschluss der Läsion führt. Die in den Plättchen enthaltenen Aktin-Filamente führen initial zu einer Formveränderung der Plättchen von einer diskoiden zu einer stark abgeflachten Form und zur Ausbildung von Pseudopodien. Dies führt zu einer Vergrößerung der Oberfläche um z.B. einen Defekt der Endothelschicht abzudecken (Spreiten). Gleichzeitig führt die Kontraktion des Zytoskeletts zu einer Zentralisierung der Granula und ihrer Verschmelzung mit dem sog. „open canalicular system“ (OCS). Daraus resultiert ein Anstieg des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses um 62 - 73%. Dabei werden die Zellorganellen der Plättchen nach zentral verlagert (HARTWIG et al. 2002). Es folgt eine intensive Sekretion von gespeicherten Substanzen in den Extrazellularraum (WHITE JG et al. 1973). Bei besonders starken Stimuli (z.B. Kollagen oder Thrombin) finden

Aggregation und Sekretion gleichzeitig statt, wobei die Aggregation jedoch keine Voraussetzung für den Sekretionsvorgang darstellt.

Durch die Aktivierung der Plättchen wird der Rezeptor GP (Glykoprotein) IIb/IIIa bindungskompetent für Fibrinogen und von-Willebrand-Faktor (vWF), und innerhalb einer Sekunde kann eine Degranulation der Blutplättchen erfolgen (SAVAGE et al. 1992). Dadurch werden auf der Oberfläche weitere Proteine wie z.B. das P-Selektin exprimiert (HENN et al. 1998). Das Thrombin wirkt auf protease-activated-receptors (PAR) der Blutplättchen, wodurch vom Thrombinrezeptor eine endständige Aminosäurekette abgespalten wird, sodass eine neue Bindungsstelle entsteht und besetzt wird. Diese Bindung bewirkt eine Signaltransduktion mit anschließender Calcium-Freisetzung. Bisher sind bei humanen Plättchen der PAR-1 und der PAR-4 bekannt (VU et al. 1991; XU et al. 1998), von denen der PAR-1 bei sehr geringen Thrombin-Konzentrationen (10 nM) aktiviert wird. Der PAR-4 hingegen benötigt etwa die einhundertfache Konzentration um aktiviert zu werden (XU et al. 1998). Zur Rezeptoraktivierung können neben dem Thrombin auch weitere Serinproteasen wie Trypsin oder Plasmin verwendet werden. Bei kleinen Peptiden ist die Substratspezifität des Trypsins die gleiche wie beim Thrombin. Bei größeren Peptiden wirkt Thrombin jedoch hoch selektiv (SHERRY et al. 1954; BLOMBACK et al. 1967).

Das vorhandene Thrombin wird schnell durch Antithrombin III neutralisiert, um eine Überreaktion zu vermeiden (TOLENTINO et al. 2002). Das im Fibrinnetz gebundene Thrombin kann nicht mehr neutralisiert werden und ist noch bis zu 2 Wochen aktiv (FRANCIS et al. 1983).

Des Weiteren können die PAR durch synthetische Peptide mit gleicher endständiger Aminosäuresequenz stimuliert werden. Für PAR-1 eignet sich das Peptid SFLLRN (LIU et al. 1991; DOHLMAN et al. 1991) und für PAR-4 das AYPGKF (FARUQI et al. 2000) bzw. das GYPGKF (HOLLENBERG et al. 2002), was es ermöglicht, die Aktivierung von PAR-1 und PAR-4 einzeln selektiv zu untersuchen, ohne eine gegenseitige Überlagerung der Effekte wie bei Thrombin zu erhalten. Man geht davon aus, dass die Inhaltsstoffe der Plättchen in ihrer Roh- bzw. Lagerungsform sezerniert und nicht weiter proteolytisch verändert werden. Im Gegensatz dazu aktiviert Thrombin sowohl PAR-1, als auch PAR-4. Es regt selbst noch einen

alternativen Rezeptor an, über den die Arachidonsäurekaskade mit Thromboxansynthese und die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin sowie die Bereitstellung von PAF und Plättchenfaktor 3 (PF3) veranlasst werden. Der Hauptunterschied zwischen Thrombin und SFLLRN liegt also darin, dass Thrombin mehrere Rezeptoren stimulieren kann und auch selbst proteolytische Wirkungen entfaltet, da es eine Protease ist.

1.1.4 Funktion der Plättchen

Blutplättchen sind die korpuskulären Bestandteile des Blutes, welche zuerst und in größerer Zahl nach einer Gefäßverletzung am Schädigungsort anzutreffen sind. Sie decken den Defekt zunächst mit dem eigenen Zelleib ab (Adhäsion, Aggregation und extremes Spreiten). Durch lokale Thrombinentstehung an der Plättchenoberfläche kommt es zum Aufbau eines Fibrinnetzes und zur Freisetzung der im Plättchen enthaltenen Granula. Dabei sezernierte biogene Amine führen zur Kontraktion glatter Muskelzellen und einer Aufweitung von Interzellularräumen im Endothel. Des weiteren wirken Peptidverbindungen aus den α -Granula, die zu den Zytokinen gehören, später auch chemotaktisch auf Leukozyten. Die Funktionen der Plättchen im Rahmen der Blutungsstillung und Blutgerinnung sind ausführlich untersucht worden und sollen hier kurz skizziert werden:

1.1.4.1 Blutungsstillung und Gerinnung

Die Anhaftung der Blutplättchen an die Läsionsstelle, aneinander und die Kontaktaufnahme der Leukozyten mit dem Plättchenaggregat bzw. der Läsionsstelle erfolgt durch Expression von GP IIb/IIIa-Rezeptoren, GMP-140 (Platelet Activation Dependent Granule External Membrane; PADGEM) und GP Ib-IX (ROTH et al. 1992). Freigesetztes ADP und mittels Cyclooxygenase neu gebildetes Thromboxan A_2 (TXA_2) führen zu Vasokonstriktion und tragen zur Aggregation weiterer Plättchen bei. Der Kontakt der Blutplättchen mit der subendothelialen Matrix erfolgt über den vWF; die Freisetzung von Plättchenfaktor 3 und Thromboplastin setzt die Blutgerinnung bis hin zur Bildung von Thrombin in Gang.

Das moderne Gerinnungsmodell ist zellorientiert und startet analog zum traditionellen extrinsischen Aktivierungsweg mit Faktor VII. Es gliedert sich in drei Phasen (Abb. 1): *Initiation, Amplifikation und Propagation*.

In der *Initiationsphase* treten subendotheliale Matrix sowie Zellen und der Blutstrom durch Verletzung der Gefäßwand miteinander in Kontakt. Der von-Willebrand-Faktor vermittelt dabei die Bindung an das subendotheliale Kollagen und ist entscheidend für die Adhäsion der Plättchen. Es kommt zur intravaskulären Expression des tissue factor (TF), der Faktor VII bindet und diesen aktiviert (VIIa). Der TF/VIIa-Komplex aktiviert die Faktoren IX und X. Der Faktor Xa bindet an Faktor Va auf der Zelloberfläche. Der FXa/FVa-Komplex konvertiert eine kleine Menge Prothrombin zu Thrombin, welches die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin induziert. Diese primär generierte Menge an Fibrin ist jedoch nicht ausreichend, um Blutungen zu verhindern.

Das bisher entstandene Thrombin aktiviert in der *Amplifikationsphase* am Ort der Verletzung die Faktoren V, VIII (in Verbindung mit von-Willebrand-Faktor) und XI. Diese nun aktivierten Faktoren binden an die Plättchenoberfläche.

In der *Propagationsphase* werden große Mengen an Thrombin freigesetzt. Dieser „thrombin-burst“ entsteht durch die Konvertierung einer großen Menge an Prothrombin zu Thrombin durch einen Va/Xa-Komplex. Der dazu benötigte Faktor IXa wurde in der Initiationsphase mithilfe des tissue factors aktiviert. Dieser bildet dann zusammen mit dem Faktor VIIIa an der Plättchenoberfläche einen VIIIa/IXa-Komplex. Dieser Komplex aktiviert wiederum Faktor X, sodass der Va/Xa-Komplex entstehen kann, der zum sog. „thrombin-burst“ führt. Dieses Thrombin führt zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels durch lokal massive Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin.

Dieses feste Fibrinnetz fängt Blutzellen, bildet einen Blutpfropf und deckt den Defekt der Gefäßwand provisorisch (WEISS et al. 1990).

Wenn die Größe des Defektes die Kapazität der antithrombogenen Regulationmechanismen übersteigt, können die Gefäße sekundär durch embolisierende Thromben verschlossen werden, was zur Ischämie im Gewebe führt.

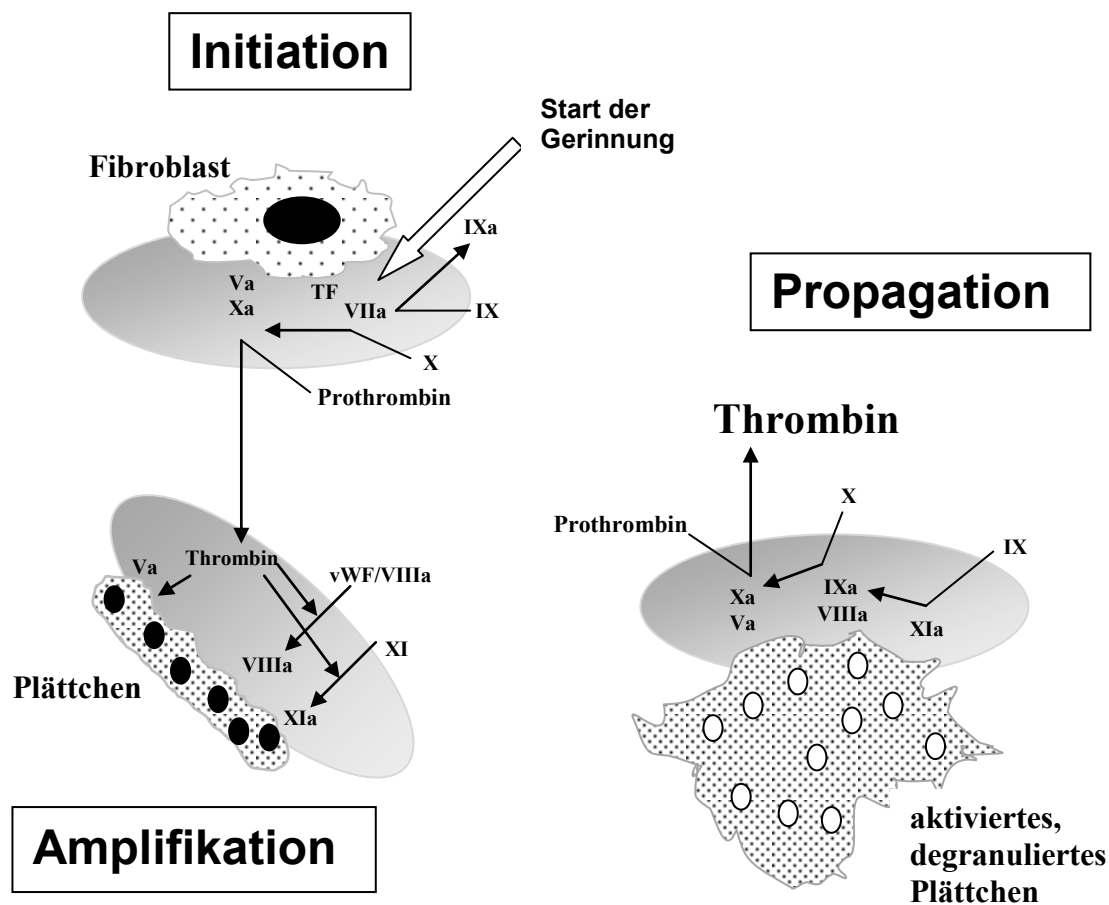


Abb. 1:

Schematischer Ablauf der Blutgerinnung (HOFFMAN and MONROE et al. 2001)

1.1.4.2 Entzündung

Blutplättchen sind nach erfolgreicher Blutungsstillung wichtige Initiatoren von Entzündungsprozessen. Neben Entzündungs- und antimikrobiellen Abwehrprozessen sind sie jedoch auch an den primären Reparaturmechanismen von Gefäßwänden beteiligt. Nach Aggregation am verletzten Endothel setzen sie Mediatoren wie Serotonin und Histamin aus ihren Granula frei. Dieses führt zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität (GENTRY et al. 1992, MANNAIONI et al. 1997, KLINGER et al. 2002). Aus ihren α -Granula freigesetzte Zytokine wirken chemotaktisch und stimulierend auf Leukozyten. Eine Entzündungsreaktion kann die Folge sein. Außerdem sorgen freigesetzte Wachstumsfaktoren für eine Einwanderung und Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Keratinozyten, die schließlich zur Sekundärwundheilung führen.

1.1.4.3 Infektabwehr

Plättchen sind in der Lage, Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze und Protozoen an sich zu binden und mit einer Stimulierung auf die Bindung zu reagieren. Diese Bindung kann durch hydrophobe Wechselwirkungen oder Ladungsdifferenzen erfolgen (YEAMAN et al. 2002). Auch die Bindung durch Vermittlung von spezifischen Rezeptoren an der Plättchenoberfläche wurde beschrieben (ALUGUPALLI et al. 2001). Diese Rezeptoren sind denen der Leukozyten sehr ähnlich. Manche Pathogene können über ein sog. Brückenmolekül, z.B. Plasmabestandteile wie Fibrinogen (CHEUNG et al. 1991; CLAWSON et al. 1980) oder Fibronectin (TOY et al. 1985) an die Plättchen binden. Einige Autoren (COGNASSE et al. 2005) haben auf der Oberfläche von Blutplättchen TOLL-like Rezeptoren (TLR) gefunden, die in der Lage sind, pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs = pathogen associated molecular patterns) zu erkennen. Diese Rezeptoren sind ein zentraler Bestandteil einer sehr ursprünglichen Infektabwehr und wurden bereits auf anderen Zellen der unspezifischen Abwehr gefunden (z.B. Makrophagen).

In früheren Studien vermutete man, dass Plättchen Infektionen eher begünstigen, weil sich Pathogene an der Oberfläche agglutinierten Plättchen besser anhaften und sich so lokal anreichern können (KLOTZ et al. 1989). Des Weiteren wurde vermutet, dass es Leukozyten und antibiotischen Substanzen erschwert wird, Pathogene zu erreichen, wenn diese zuvor von Plättchen internalisiert oder im Aggregat eingeschlossen wurden (CLAWSON et al. 1971; WEKSLER et al. 1992).

Heute ist man jedoch überwiegend der Meinung, dass Plättchen an der Infektabwehr beteiligt sind, da sie chemotaktisch auf Leukozyten wirken sowie deren Degranulation und Phagozytosefähigkeit positiv beeinflussen. Für eine Beteiligung der Plättchen am Entzündungsgeschehen und eine Stimulierung von Leukozyten spricht unter anderem ihre Ausstattung an Rezeptoren. So besitzen sie z.B. den Rezeptor für das C-reaktive Protein (BOUT et al. 1986), den Komplementrezeptor CR3 (COSGROVE et al. 1987) und die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR3, CCR4 und CXCR4 (CLEMENTSON et al. 2000). Außerdem decken die Blutplättchen Gewebsdefekte ab und schließen so potentielle Eintrittspforten.

Ein weiteres Indiz für die Bedeutung von Blutplättchen innerhalb der Infektabwehr ist die Beobachtung, dass Patienten mit einer Thrombozytopenie über eine eingeschränkte Infektabwehr verfügen. Dies wurde bei einer klinischen Studie bei Lebertransplantatempfängern beschrieben, die bei dauerhaft niedriger Plättchenzahl eine deutlich schlechtere Infektabwehr aufwiesen (CHANG et al. 2000). 1991 veröffentlichten FELDMAN et al. eine Studie, wonach ältere Patienten mit einer Thrombozytopenie häufiger an einer Lobärpneumonie (Erreger: *Streptococcus pneumoniae* und *Klebsiella pneumoniae*) erkrankten, als Patienten gleichen Alters mit normaler Plättchenzahl.

Es stellt sich daher die Frage, ob und mit welchen Mechanismen Plättchen in der Lage sind, Bakterien mit Erfolg zu bekämpfen. Andererseits wäre es interessant zu erfahren, ob und bis zu welchem Grade es möglich ist, eine bakterielle Infektion unterstützend mit plättchenhaltigen Blutprodukten zu bekämpfen.

1.2 Unspezifische Abwehr

Die unspezifische Abwehr bedarf zu ihrer Aktivierung keines Antigenkontaktes. Sie ist angeboren und als erstes verfügbar um Pathogene zu bekämpfen. Die spezifische Abwehr reagiert deutlich später, wird jedoch nicht immer in Gang gesetzt, da viele Pathogene bereits durch die unspezifische Abwehr erfolgreich bekämpft werden können. Die Mechanismen der unspezifischen Abwehr beruhen entweder auf der Wirkung einzelner Moleküle, die im Blut gelöst vorliegen können (humorale Abwehr) oder auf direkten Aktionen von Zellen wie Granulozyten oder Makrophagen (zelluläre Abwehr). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die bereits beschriebenen Komponenten der unspezifischen Abwehr (ROSS und PAWLINA 2006).

Zellvermittelte Abwehr	Humorale Abwehr
- Chemotaxis - Phagozytose - Zytolyse - Radikalproduktion	- Komplementsystem - C-reaktives Protein - mikrobiozide Peptide - Lysozym

Tab. 2: Prozesse und Komponenten der unspezifischen Abwehr (ROSS MH und PAWLINA W, Histology 5th edition, Lippincott, Williams and Wilkins, 2006)

1.2.1 Phagozytose

Die Phagozytose ist eine Form der Endozytose, bei der extrazelluläres Material in das Innere einer Zelle aufgenommen wird. Dabei werden diese Fremdpartikel von Zellen umschlossen und durch Einstülpfen bzw. Abschnüren der Zellmembran in derselben eingeschlossen. Anschließend können diese Partikel (z.B. Pilze, Bakterien, Sporen) mithilfe der Inhaltsstoffe der Lysosomen abgebaut werden.

Typische phagozytierende Zellen sind Makrophagen und Granulozyten. Auch Blutplättchen sind eventuell in der Lage, zu phagozytieren. Voraussetzungen für diese Eigenschaft sind das Erkennen und die Internalisierung von Fremdpartikeln und die Existenz von Lysosomen (NACHMAN et al. 1972; MESEGUER et al. 2002).

1976 wurde von LEWIS et al. erstmals gezeigt, dass Plättchen in der Lage sind, kleine ($\varnothing$ 0,1 μ m) Latexpartikel zu internalisieren. Sie wurden vermutlich durch das open canalicular system (OCS) aufgenommen und fanden sich anschließend in kleinen Zytoplasmavesikeln wieder, die keine Verbindung zum Extrazellularraum hatten.

Bakterien sind eventuell zu groß, um aktiv von Plättchen phagozytiert zu werden. WHITE et al. beschrieben 2005 die Interaktion von Plättchen und Bakterien als eine aktive Bedeckung einer Fremdoberfläche und bezeichneten die Plättchen

entsprechend als „covercytes“. YOUSSEFIAN et al. (2002) beobachteten eine erhöhte Aufnahme von *Staphylococcus aureus* durch Plättchen nach deren zusätzlicher Stimulation, fanden jedoch keine Hinweise darauf, dass die phagozytierten Bakterien auch abgetötet wurden.

Plättchen können also Partikel internalisieren, doch ob sie diese auch intrazellulär abtöten können, bleibt fraglich.

1.2.2 Mikrobiozide Peptide

Vor mehr als 100 Jahren wurden erstmals bakterizide Eigenschaften des Blutes beschrieben (FODOR et al. 1887). 1974 gelang der Nachweis von β -Lysin in Plättchen von Kaninchen als Komponente des Immunsystems (DONALDSON et al. 1974 und 1977). 1960 wurde die bakterizide Wirkung von Kaninchenserum beschrieben, welche jedoch erst nach erfolgter Blutgerinnung auftrat (HIRSCH et al. 1960). In den 70er und 90er Jahren gelang dann der Nachweis bakterizider Peptide in Kaninchenplättchen (NACHMAN et al. 1972; YEAMAN et al. 1997). Bei mikrobioziden Peptiden handelt es sich um kleine kationische Peptide, die aus ca. 12-50 Aminosäuren bestehen. Sie werden in den Granula der Leukozyten und auch in denen der Plättchen gespeichert und sind durch ihre positiv geladene hydrophobe Oberfläche in der Lage, Membranen von Pathogenen zu zerstören (SCHNEIDER et al. 2005). Manche dieser Peptide werden in der Leber hergestellt und als „Akute-Phase-Proteine“ bezeichnet (LEVY et al. 2000).

KRIJGSVELD et al. (2000) beschrieben erstmals bakterizide Peptide in humanen Plättchengranula und nannten sie Thrombozidine 1 und 2. 2002 beschrieben TANG et al. weitere bakterizid wirkende Peptide wie z.B. Plättchenfaktor 4 (PF4), RANTES, platelet basic protein (PBP) und connective tissue activating peptide 3 (CTAP3). Diese Peptide gehören zu den Chemokinen, welche neben ihren direkten mikrobioziden Eigenschaften auch als Entzündungsmediatoren wirken und somit Neutrophile, Makrophagen und Monozyten stimulieren können (YEAMAN et al. 2002).

1.2.3 Komplement

Das Komplementsystem, als Teil der unspezifischen Abwehr, ist eng mit der spezifischen Abwehr verknüpft. Es ist sowohl im Serum als auch im Plasma präsent und besteht aus ca. 30 löslichen, hitzelabilen, zellassozierten Proteinen (WALPORT et al. 2001). Die Aufgabe des Komplementsystems besteht darin, Pathogene zu markieren und Entzündungszellen durch Mediatoren anzulocken. Diese können dann komplementvermittelt phagozytiert und lysiert werden (FEARON et al. 1997).

Das Komplementsystem verbindet die unspezifische Abwehr mit der spezifischen Abwehr nicht nur über die Markierung von Bakterien, sondern auch über die Förderung der T-Zell-Antwort (BARRINGTON et al. 2001). Im Gegenzug wird auch das Komplement selber durch Antikörper des spezifischen Abwehrsystems aktiviert.

1.3 Verwendete Bakterien

1.3.1 Borrelien

Borrelien sind 0,3 – 0,6 µm dicke und 8 – 18 µm lange gramnegative, flexible und begeißelte Schraubenbakterien, sog. Spirochäten, die durchschnittlich 3 – 8 Windungen aufweisen und aufgrund von Rotation um die Längsachs zu intensiver Bewegung fähig sind. Die Windungen entstehen durch die Kontraktion außen liegender Flagellen. Im Inneren der Bakterien befindet sich ein Protoplasmazyylinder, der von einer Membran umgeben wird. Der Windungsabstand der unregelmäßigen Spiralen beträgt 2-4 µm. Durch ihre Flexibilität unterscheiden sie sich von den Spirillen (GARRITY et al. 2005).

Borrelien verursachen vektoriell (durch Zeckenbiss) übertragene Zoonosen. Beim Biss der Zecke werden nicht nur Bakterien, sondern auch plättchenhemmende Substanzen übertragen (RIBEIRO et al. 1985, SAUER et al. 1995). Für den Menschen bedeutsam sind *Borrelia burgdorferi*, der Erreger der Lyme-Borreliose, *Borrelia garinii*, Erreger der Polyomeningoradikulitis (Morbus Bannwarth) sowie *Borrelia recurrentis* und *Borrelia duttonii*, die das Rückfallfieber auslösen.

Die Lyme-Borreliose tritt weltweit auf. Sie ist die häufigste durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit (in Deutschland ca. 60000 Neuerkrankungen pro Jahr, ROBERT-KOCH-INSTITUT 2004). Nach dem Biss der Zecke kommt es zunächst zu einer lokalen Ausbreitung der Erreger. Durch diese Gewebsverletzungen können die Blutplättchen mit den Bakterien in Kontakt kommen und stimuliert werden.

Das klinische Bild der Infektionskrankheit erinnert an die in Stadien ablaufende Syphilis. In den Frühstadien der Lyme-Borreliose entscheidet die Effizienz der unspezifischen Abwehr, ob es zu einer spontan Ausheilung kommt, oder ob Antikörper gebildet werden und die Erkrankung chronifiziert. Eine spontane Ausheilung ist häufig. Es muss also im Menschen erfolgreiche spezifische und auch unspezifische Abwehrmechanismen geben. Zwischen Infektion und Manifestation der Erkrankung können Tage bis Jahre vergehen. Es werden drei Stadien unterschieden.

Typisch für das erste Stadium ist eine flächige Rötung der Haut mit zentraler Abblassung, die als Erythema migrans bezeichnet wird. Diese Läsion kann sich spontan zurückbilden, aber auch über Wochen persistieren (Erythema chronicum migrans). Das Erythem stellt eine Entzündungsreaktion dar, an der natürlich auch Blutplättchen beteiligt sind. Ein symptomloser Verlauf des ersten Stadiums ist möglich, sodass die Erkrankung erst im zweiten oder dritten Stadium bemerkt wird.

Neben der Haut sind im zweiten Stadium hauptsächlich das Herz, der Bewegungsapparat sowie das zentrale und periphere Nervensystem betroffen. Das dritte Stadium ist durch wechselnde rheumatische Beschwerden gekennzeichnet (LEITLINIEN FÜR DIAGNOSTIK UND THERAPIE IN DER NEUROLOGIE 2008). Borrelien gelangen dabei immer wieder in den Blutkreislauf und kommen somit auch wiederholt mit Blutplättchen in Kontakt.

1.3.2 *Bacillus subtilis*

Der natürliche Lebensraum des grampositiven, sporenbildenden, obligat aeroben Stäbchenbakteriums ist der Erdboden. *Bacillus subtilis* ist durchschnittlich 1 µm breit und 2 – 4 µm lang, unbegeißelt und besitzt eine aus Glutaminsäure-Polypeptid bestehende Kapsel. Die Sporen werden mittelständig gebildet.

Bacillus-Arten kommen aber auch in der Luft und im Wasser vor. Infektionen mit Bacillus-Bakterien sind in erster Linie opportunistisch (HÖLL et al. 2002). Die Übertragung erfolgt durch die ubiquitär vorkommenden Sporen. Bei immunkompetenten Menschen ist *Bacillus subtilis* selbst nicht pathogen. Er ist jedoch von medizinischem Interesse, da er Ähnlichkeiten zu pathogenen Erregern wie Staphylokokken und Listerien aufweist. Bei Immunschwäche gehen die Bakterien am Infektionsort in das vegetative Stadium über. Die Bacillus-Infektion kann lokalisiert in Form von Wundinfektion oder systemisch in Form von Sepsis, Meningitis oder Endokarditis verlaufen. Eine Immunität entsteht nach derzeitigem Wissensstand nicht.

Durch die Sporen-Bildung der Bacillus-Arten sind diese hochgradig widerstandsfähig gegenüber Hitze, Bestrahlung, Austrocknung und Desinfektionsmitteln (KÖGER et al. 2003).

1.3.3 Klebsiella pneumoniae

Klebsiellen sind fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen. Sie besitzen keine Geißeln und sind daher unbeweglich. Die meisten Stämme tragen jedoch Fimbrien und bilden eine dicke Polysaccharidkapsel, das K-Antigen, welches antiphagozytär wirkt. Das K-Antigen (= Kapselantigen), besteht aus verschiedenen Anteilen mit unterschiedlicher Wärmeempfindlichkeit und wird der Zellwand zugerechnet. Diese schleimartige Schutzschicht erschwert es potentiell schädigenden Substanzen wie z.B. Antibiotika, direkt auf das Bakterium zu wirken. Alle Klebsiella-Arten sind unempfindlich gegen Penicillin (GARRITY et al. 2002).

Klebsiella pneumoniae ist als Erreger der Friedländer-Pneumonie bekannt, kann aber auch Erreger von Harnwegsinfekten, eitrigen Lokalfektionen bis hin zur Sepsis sein.

Klebsiellen kommen ubiquitär vor. Bei ca. 10 % der gesunden Bevölkerung finden sie sich auch im Darm und im oberen Respirationstrakt. Häufiges Reservoir stellen Klimaanlage oder Luftbefeuchter dar, bei denen die Keimfreiheit des Wassers nicht gewährleistet ist. Es werden häufig Resistenzen gegen mehrere Antibiotika festgestellt (BARBOUR et al. 1986).

Im Rahmen meiner Untersuchungen stellte sich die besondere Frage, ob diese Schleimkapsel dem bakteriziden Angriff widerstehen kann.

1.3.4 Chlamydia pneumoniae

Chlamydien sind sehr kleine, obligat intrazellulär lebende Zellparasiten. Sie enthalten, wie andere Bakterien auch, DNS und RNS, Ribosomen, eine zytoplasmatische Membran und eine Zellwand, die im Aufbau der Wand gramnegativer Bakterien entspricht. Es fehlt jedoch die sowohl für grampositive, als auch gramnegative Bakterien typische Peptidoglykanschicht. Morphologisch und funktionell werden zwei unterschiedliche Erscheinungsformen unterschieden. Die eine Form findet sich extrazellulär und dient der Verbreitung. Die andere Form liegt intrazellulär vor und ist stoffwechselaktiv (HAHN et al. 2007).

Die kugeligen bis ovalen Elementarkörper, die durchschnittlich 300 nm groß sind, stellen die infektiöse Form dar. Sie können außerhalb der Wirtszelle existieren. Die Initialkörper, die auch als Retikularkörperchen bezeichnet werden, sind ebenfalls kugelig bis oval und haben eine durchschnittliche Größe von 1000 nm (KAUFMANN et al. 2004).

Es werden 3 humanpathogene Spezies voneinander abgegrenzt. Dabei handelt es sich um *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pneumoniae*. Letztere sind ebenfalls Gegenstand unserer Studie. *Chlamydia pneumoniae* ist Erreger respiratorischer Infektionen, wie z.B. Bronchitis, Tracheitis und Pneumonie. Seit 1992 wird die Beteiligung der Chlamydien an der Entstehung der koronaren Herzkrankheit diskutiert (MAASS et al. 1998). Auslöser waren serologische Befunde und ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten Antikörper-Titern gegen *Chlamydia pneumoniae* und der Arteriosklerose. Chlamydien wurden mittels PCR und Immunhistochemie nachgewiesen. In wenigen Fällen gelang auch der Nachweis von Chlamydien in lebendem und infektiösen Zustand in atheromatösen Plaques.

Nach Anheftung der Elementarkörper an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle werden diese endozytiert. In der Zelle wandeln sich die Elementarkörper in Initialkörper um, die metabolisch aktiv werden und sich dann vermehren. Nach

Rückbildung der Initialkörper zu Elementarkörperchen platzt die Wirtszelle. Die freiwerdenden Elementarkörper können nun weitere Zellen befallen. Es ist denkbar, dass Blutplättchen auf diese zerstörten Wirtszellen sowie auf die freigesetzten Elementarkörperchen reagieren.

Chlamydien sind aufgrund von Defekten in ihrem Energiestoffwechsel auf die Leistungen ihrer Wirtszelle angewiesen. Da den Chlamydien Enzyme für die Synthese von ATP, GPT und UTP fehlen, sind sie auf eukaryonte Wirtszellen als Nukleotid-Quelle angewiesen. Damit gelten sie als Energieparasiten (HAFERKAMP et al. 2008).

Der in unserer Studie verwendete Stamm CV-6 wurde aus Koronararterien-Plaques isoliert und in Hep-2 Zellen kontinuierlich vermehrt.

1.4 Arbeitshypothese

Wir vermuteten, dass thrombinaktivierte Plättchen zu eigenen Abwehrleistungen gegenüber verschiedenen Bakterien fähig sind.

Zur Klärung unserer Überlegungen planten wir verschiedene Versuche mit möglichst verschiedenartigen Bakterien, um ein breites Wirkspektrum zu untersuchen. Zunächst untersuchten wir den Einfluss der Blutplättchen auf die beweglichen Spirochäten *Borrelia garinii* (B29) und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* (B31), bei denen bakterizide Auswirkungen wie z.B. Verlust der Mobilität, bereits ohne Fluoreszenzmarkierungen erkennbar sind (Vgl. auch Kapitel Material). Bei einer Borrelieninfektion beobachtet man des Öfteren bakteriämische Schübe, in deren Folge verschiedene Gewebe und Organe besiedelt werden können. Somit ist ein direkter Kontakt der Plättchen mit den Bakterien möglich. Das Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) ist ubiquitär verbreitet, bildet sehr resistente Sporen und synthetisiert sogar selbst ein Antibiotikum (Bacitracin; AZEVEDO et al. 1993).

Wir fragten uns, wie Bakterien mit anderen Abwehrmechanismen bzw. schwerer zugänglichen Lebensräumen auf aktivierte Blutplättchen reagierten. Dazu untersuchten wir die zur Schleimbildung (K-Antigen) fähigen *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), deren Schleimfilm eine Schutzfunktion hat und antibiotischen Substanzen den Zutritt zum Bakterium erschweren kann.

Der Bakterienstamm *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*), persistiert intrazellulär z.B. in Gefäßwänden und ist deshalb für verschiedene Abwehrmechanismen nur schwer zugänglich. *C. pneumoniae* spielt möglicherweise eine Rolle in arteriosklerotischen Prozessen.

Wir koinkubierten sowohl intakte Blutplättchen mit den o.g. Bakterien, als auch bereits degranulierte Plättchen. Bei letzteren wurden die gespeicherten Peptide somit vor dem Bakterienkontakt entfernt. Zur Stimulation benutzten wir verschiedene Agonisten, wie z.B. Thrombin oder SFLLRN. Letzterer induziert lediglich die Freisetzung der Granula, ohne weitere Mechanismen der Aktivierung in Gang zu setzen.

Die Ergebnisse unserer Experimente beschrieben wir qualitativ mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), um festzustellen, welche schädigenden Mechanismen es gibt und ob die Phagozytose eine Rolle spielt. Als

Schädigungszeichen wären Defekte in der Bakterienwand (bei *B. subtilis* vorhanden), ein Anschwellen bzw. eine Veränderung zytoplasmatischer Strukturen durch Störungen der Permeabilität von Membranen, oder gar eine Fragmentierung der Membranen denkbar. Zudem suchten wir nach Hinweisen auf eine mögliche Internalisierung von Bakterien.

Eine Fluoreszenz-Doppelfärbung der DNA ermöglichte die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien. Die quantitative Auswertung erfolgte durch Auszählen der Bakterien. Unsere Arbeit sollte folgendes klären:

1. Sind humane Blutplättchen in der Lage, Bakterien mit unterschiedlichsten Verteidigungsstrategien und in unterschiedlichen Lebensräumen wie *Bacillus subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia garinii*, *Klebsiella pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae* nach Stimulierung abzutöten?
2. Sind vom stimulierten Plättchen freigesetzte Inhaltsstoffe (in den Überständen enthalten) allein bakterizid oder sind weitere Bestandteile des Plättchens für die bakteriziden Effekte nötig?
3. Ist eine begrenzte Stimulierung (nur Sekretion der Granula) ausreichend für bakterizide Effekte (alternatives Stimulans anstatt Thrombin)?
4. Ist die Distanz bzw. eine direkte Bindung zwischen Bakterien und Plättchen für die bakteriziden Effekte von Bedeutung?

Wir möchten mit unserer Arbeit zeigen, dass stimulierte Blutplättchen in der Lage sind, zum Teil hocheffektiv Bakterien abzutöten, auch wenn diese über unterschiedliche Schutzmechanismen und Überlebensstrategien verfügen.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

- Araldit, Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Bleizitrat, Merck, Darmstadt, Deutschland
- BSK-H Medium, BioConcept, Umkirch, München, Deutschland
- Cacodylatpuffer, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glutaraldehyd, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Helipur, Braun, Melsungen
- Kaninchenserum, BioConcept, Umkirch, München, Deutschland
- L-Glutamin, Sigma-Aldrich Chemie, Schnelldorf, Deutschland G-7513
- LIVE/DEAD® BacLight™ (L-7012, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)
- Natriumchlorid-Lösung (NaCl), Sigma
- Osmiumtetroxid (OsO₄), Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
- Paraformaldehyd Merck 4005, Merck, Darmstadt, Deutschland
- PBS (phosphate buffered saline), Apotheke UK S-H, Sigma D-5652
- Synthetischer Thrombinrezeptoragonist SFLLRNPNDKYEPF, Sigma S-7152
- Thrombin, Sigma T-4648
- Uranylazetat, Merck, Darmstadt, Deutschland

2.2 Verbrauchsmittel

- Bakteriennährboden, Casein-Sojamehlpepton-Agar, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland
- HiCrome Klebsiella Selective Agar Base, Sigma
- Deckgläser 24 x 40mm, Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Eppendorf-Röhrchen, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Objektträger, Superfrost, Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Zentrifugierröhrchen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3 Geräte

- Densitometer, Densimat, bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland
- Digitale Kamera, AxioCam, Axiovision 2.05, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- Elektronenmikroskop, TEM 400T, Philips, Hamburg, Deutschland
- Eppendorf Research Pipetten, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Fluoreszenzmikroskop, Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Laborzentrifuge Labofuge 300, Hereus Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
- Ph-Meter, Inolab, Wissenschaftlich-technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
- Ultramikrotom, Ultracut E, Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland
- Waage, BP310P, Sartorius, Göttingen, Deutschland
- Wasserbad, Thermostat C10, Thermo Haake, Karlsruhe, Deutschland
- Zählkammer Neubauer, Sigma-Aldrich Chemie, Schnelldorf, Deutschland

2.4 Plättchenpräparation

Die für die vorliegende Forschungsarbeit verwandten Thrombozytenkonzentrate (TK) stammen aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck. Die Blutbank der Universität zu Lübeck gewinnt die TKs aus den Blutspenden gesunder Vollblutspender zu Transfusions- und Forschungszwecken.

Es gibt prinzipiell 3 Methoden um Plättchenkonzentrate herzustellen:

- aus plättchenreichem Plasma (PRP-Methode),
- die „buffy-coat“ – Methode, und
- die Herstellung mittels Zellseparatoren.

Plättchenkonzentrate können aus plättchenreichem Plasma im sog. PRP-Verfahren hergestellt werden, welches im Wesentlichen auf einer scharfen Zentrifugation des Plasmas und anschließender Trennung der Sedimente basiert. Die sedimentierten Plättchen werden nach 1-2 Stunden vorsichtig resuspendiert. Diese Technik war und ist vor allem in den USA gebräuchlich.

In Europa werden hingegen mehrheitlich Blutplättchen im sogenannten „buffy-coat“-Verfahren (BC-Verfahren) durch spezielle Zentrifugationstechniken aus Vollblut isoliert.

Seit den 70er Jahren kommt jedoch eine zum BC-Verfahren alternative verfeinerte Methode zum Einsatz, die Gewinnung der TKs durch Zellseparatoren (Zentrifugation bei 360g, 6 min), welche nach dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation (Elutriation) arbeitet.

Wie auch bei den anderen Verfahren wird das Vollblut zunächst zentrifugiert. Dabei wird das Abpressen von 1 bzw. 2 optischen Detektoren gesteuert, welche die Plasma-Zell-Grenze erkennen und die Klemmen der Verbindungsschläuche je nach Bedarf öffnen oder schließen. Im Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin kamen die Separatoren CS3000 plusTM, später der AmicusTM (Baxter, Biotech, München) zum Einsatz.

Diese Geräte ermöglichen die Gewinnung von Plättchenkonzentraten aus einzelnen Spendern (sog. single donor platelets, SDP) mit einer Leukozytenkontamination von $< 1 \times 10^6$ /ml.

Die durch Zellseparation und buffy-coat-Verfahren hergestellten Plättchenkonzentrate sind qualitativ vergleichbar, wie anhand der folgenden Parameter gezeigt werden kann: Die Kontamination durch Leukozyten ist gering, und die Plättchen verfügen über eine gute Aggregationsfähigkeit sowie eine geringe Vor-Aktivierung. Letzteres wird anhand des Erhalts der diskoiden Form, der geringen Freisetzung von PF-4 - und β -Thromboglobulin sowie der niedrigen Expression von GP IIb/IIIa und GMP-140 deutlich (KLINGER und KLÜTER et al. 1996). Bei beiden Herstellungsverfahren konnten die Plättchen zum Zeitpunkt der Experimente unter ständiger Bewegung für 5 Tage bei 22 °C gelagert werden. Die Haltbarkeit der Plättchenkonzentrate wurde jedoch inzwischen auf 4 Tage verkürzt. Die Blutplättchen liegen in einer durchschnittlichen Konzentration von 6×10^8 Plättchen/ml im TK vor.

Zu Beginn unserer Arbeit wurden die Konzentrate aus Vollblutspenden separiert; alle Experimente mit Borrelien wurden mit derartigen Plättchen durchgeführt. Dieses Verfahren wurde dann jedoch eingestellt, und man arbeitete fortan mit Zellseparatoren zur Plättchengewinnung.

2.5 Bakterienkulturen

Um die Wirkmechanismen möglichst breit gefächert untersuchen zu können, haben wir möglichst unterschiedliche Bakterien ausgewählt.

Für die in dieser Forschungsarbeit durchgeführten Versuche werden die Bakterienstämme *Borrelia garinii* B29, *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* und *Bacillus subtilis* verwendet.

Bacillus subtilis ist ein grampositives, obligat aerobes Stäbchenbakterium, das zur Sporenbildung fähig ist. Diese Sporen sind sehr hitzebeständig und trotzen somit herkömmlichen Sterilisationsverfahren (ERRINGTON et al. 1993).

Bacillus subtilis wächst auf Casein-Pepton-Agar-Platten (Fa. Oxoid, Wesel, Germany). Die Beimpfung der Agarplatten mit diesem Bakterium erfolgte 24 Stunden vor jedem Experiment unter sterilen Bedingungen.

Der gramnegative Schleimbildner *Klebsiella pneumoniae* ist als nosokomialer Problemkeim bekannt und als Erreger der atypischen Pneumonie besonders bei Immundefizienten Patienten gefürchtet. Das Bakterium hat die Fähigkeit, sich mit schleimartigen Substanzen zu umgeben. Dies erschwert antibiotischen Substanzen den Zugang zur Bakterienzelle. Klebsiellen wachsen auf einem Trypsin-Medium bei 37°C. Für unsere Versuche wurden die Agarplatten ebenfalls 24 h vor Experimentbeginn unter sterilen Bedingungen beimpft.

Die beweglichen Borrelien sind ebenfalls von klinischer Bedeutung, da sie für die in Stadien ablaufende Lyme-Borreliose verantwortlich sind (BARBOUR und HAYES 1986). Die von uns verwendeten Borrelienstämme *Borrelia garinii* B29 und *Borrelia burgdorferi sensu stricto* B31 wurden aus Zecken isoliert und benötigen zum Wachstum ein modifiziertes BSK-H-Medium (BioConcept, Umkirch, Deutschland), das mit 6,25% Kaninchenserum (BioConcept, Umkirch, Deutschland) und 2 mmol/l L-

Glutamin (Sigma) versetzt ist. Das Wachstum erfolgte bei 37°C und wurde von mir zweimal wöchentlich anhand bestimmter Kriterien kontrolliert. Beobachtet wurde die Dichte der Bakterien pro Gesichtsfeld, Beweglichkeit, Anzahl der toten Bakterien (strichförmig, unbeweglich), eventuelle Kontamination mit anderen Spezies. Bei diesen Kontrollen wurden die Borrelien auch mit neuem Medium beimpft.

Als obligat intrazellulär lebende Parasiten, die extrazellulär als besonders widerstandsfähige Elementarkörperchen vorkommen, interessierten uns die Chlamydien, um den Einfluss aktivierter Plättchen auf diese möglicherweise besonders resistente Spezies zu untersuchen. Ihre Anwesenheit wurde wiederholt in arteriosklerotischen Plaques beobachtet, was die Vermutung nahe legt, dass diese geschädigten Zellen eine günstige biologische Nische für Chlamydien darstellen (MAASS et al. 1998).

Das Arbeiten mit den Bakterien erfolgte unter sterilen Bedingungen und unter Berücksichtigung der Infektionsgefahr. Zur Desinfektion verwendeten wir eine Helipur®-Lösung (Braun, Melsungen) sowie 70%igen Alkohol.

2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Versuche und die Beurteilung der Vitalität der Bakterien erfolgten mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Es wurde der DNS-Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit verwandt (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dieser Farbstoff besteht aus den zwei Komponenten SYTO 9 und Propidiumjodid, die im Verhältnis 1:1 vorliegen und eine Fluoreszenzdoppelfärbung der Bakterien ermöglichen. Während SYTO 9 sein Emissionsmaximum bei 500 nm besitzt und somit grünes Licht emittiert, sendet Propidiumjodid nach DNA-Bindung rotes Licht bei einer Wellenlänge von 635 nm aus.

LIVE/DEAD® BacLight™ ist ein Indikator für eine gestörte Membranpermeabilität bei Bakterien. SYTO 9 diffundiert durch intakte Membranen, bindet an die DNA und stellt das Bakterium im Fluoreszenzmikroskop grün dar. Ist die Membranpermeabilität des Bakteriums gestört und die Membran damit durchlässig für die Komponente Propidiumjodid, dann verdrängt Propidiumjodid das SYTO 9 aus seiner Bindung an die DNA und das Bakterium fluoresziert rot, da sich das Emissionsmaximum in den

langwelligeren Bereich verschiebt. Der Hintergrund fluoresziert nicht. So lassen sich die lebenden Bakterien eindeutig von den toten Bakterien unterscheiden. Die so erhaltenen Ergebnisse korrelieren sehr gut mit der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien, die durch Auszählen der gewachsenen Bakterienkolonien beschrieben werden kann. Im Folgenden verwende ich die Begriffe "lebend" und "tot" synonym für eine grüne bzw. rote Anfärbung in der Fluoreszenz.

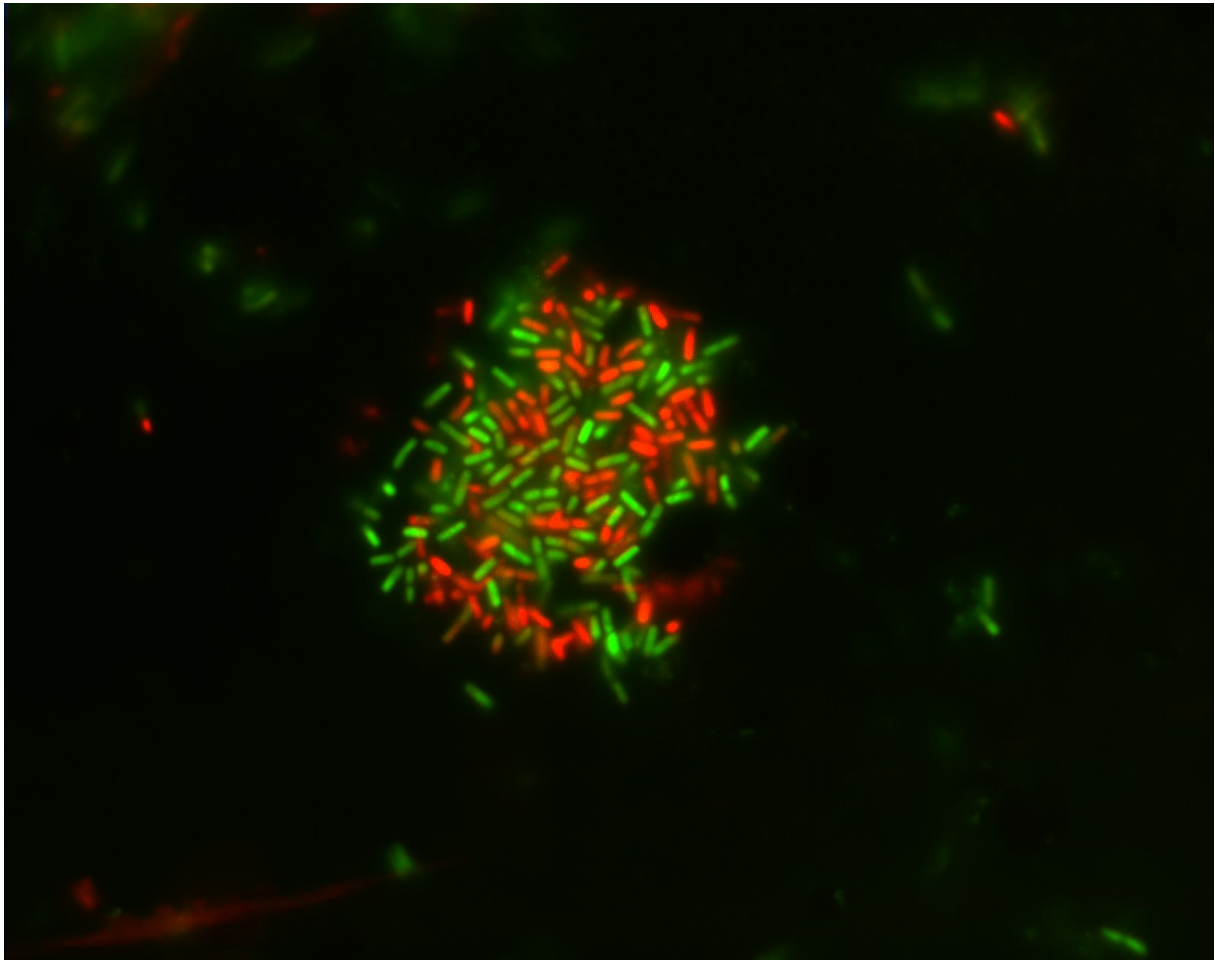


Abb. 2: *Bacillus subtilis* in der LIVE/DEAD® BacLight™ - Doppelfärbung

2.7 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden 50 µl Plättchen, gegebenenfalls stimuliert und mit 50 µl Bakterien ergänzt, für 15 min koinkubiert. Sie wurden dann mit 2,5%igem Glutaraldehyd in 0.1 M Cacodylatpuffer (pH 7, 4) für eine Stunde fixiert. Danach wurden sie mit 1%igem OsO₄ in 0.1 M Cacodylatpuffer für

zwei Stunden behandelt, anschließend mit aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol dehydriert und in Araldit (Fluka, Buchs, Schweiz) eingebettet. Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultracut E (Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) hergestellt und mit 1% Uranylazetat und gesättigter Bleizitratlösung nachkontrastiert. Die Schnitte wurden mit einem Philips TEM 400T ausgewertet und fotografiert.

2.8 Versuchsaufbau

Das vorliegende Forschungsprojekt umfasst verschiedene Teilerperimente, die alle nach dem folgend beschriebenen Schema ablaufen:

1. Die Vorbehandlung der folgenden Bakterien

- *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia garinii*
- *Bacillus subtilis*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Chlamydia pneumoniae*

umfasst, wenn nötig, das Aufmörsern der Wirtszellen (Chlamydien), das Auszählen der Bakteriendichte (Borrelien, Bacillus, Chlamydien) bzw. das Bestimmen der Bakterienanzahl mithilfe des Verfahrens nach McFarland (Klebsiellen).

2. Das eigentliche Experiment umfasst eine

- Koinkubation von Bakterien mit Thrombin-aktivierten Plättchen, oder die
- Koinkubation mit den Überständen aktivierter Plättchen, oder eine
- Koinkubation mit einer alternativen Stimulation der Plättchen durch einen synthetischen Thrombinrezeptoragonisten (nur bei Borrelien durchgeführt) oder die
- Koinkubation mit den Überständen der Plättchen, die mit einem synthetischen Thrombinrezeptoragonisten stimuliert wurden (nur bei Borrelien durchgeführt).

3. Alle derartig hergestellten Präparate werden schließlich gefärbt, fixiert und qualitativ durch Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie sowie quantitativ durch Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet.

2.8.1 Kontrollpräparate

Wir wollten ausschließen, dass weder unstimulierte Plättchen, noch Blutplasma, Thrombin, SFLLRN oder andere Chemikalien eine eigenständige bakterizide Wirkung entfalten. In Vorversuchen haben wir festgestellt, dass ohne Einsatz eines Stimulators (Thrombin, SFLLRN) keinerlei bakterizide Effekte zu beobachten waren. Das bedeutet, dass weder die unstimulierten Plättchen, noch ihre Suspensionslösungen allein (Blutplasma, Pufferlösungen) bakterizid wirken können. Unterschiede konnten wir jedoch immer bei den „Basistoten“ (tote Bakterien in Kultur) feststellen. Zu jedem Experiment gehörten deshalb Vergleichspräparate, welche parallel und unter identischen Bedingungen angefertigt wurden, um den Anteil der toten Bakterien in Kultur zu bestimmen. Zur Auswertung zogen wir wiederum je 10 Gesichtsfelder heran (Abb. 9).

2.8.2 Inkubation und Färbung

Vor Experimentbeginn beurteilte ich die Borrelien im Mikroskop (Phasenkontrast) mit Hilfe der Neubauer - Zählkammer im Hinblick auf Vitalität und Konzentration. Für die Borrelienstämme stellte ich durchschnittlich Anzahlen von 5×10^8 / ml ein. Für die Plättchen ergaben sich regelmäßig Anzahlen von 6×10^8 / ml. Die Borrelien und Plättchen liegen somit in einem Konzentrationsverhältnis von 1: 1,2 vor.

Anschließend stellten wir eine Thrombinlösung her. Dazu wurden 0,5 mg Thrombin (Sigma T-4648) in 100 µl Aqua bidest gelöst. Das Thrombin lag hier nun in einer Konzentration von 2000 U/ml (Units pro ml) vor.

Bei den Versuchen vermischten wir jeweils 5 µl Bakterien mit 5 µl Plättchenkonzentrat auf einem sterilen Objektträger. Das Auftragen der Bakterien und Plättchen erfolgte mit Pipetten (Eppendorf Variopetten, 10 µl) unter sterilen Bedingungen. Die Plättchen wurden anschließend mit 1 µl der Thrombinlösung stimuliert (1 µl entspricht 2 Units und gilt als Standard für eine komplette Aktivierung der Plättchen). Nach der gründlichen Vermischung der Komponenten auf dem

Objektträger erfolgte die Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer.

Während dieser Inkubationszeit erfolgte das Ansetzen der Gebrauchslösung des Fluoreszenzfarbstoffes. Dazu werden 0,5 µl LIVE/DEAD® BacLIGHT™ (LIVE/DEAD® BacLIGHT™, (L-7012) Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), mit 100 µl 0,9% NaCl-Lösung unter sterilen Bedingungen vermischt und bis zur Verwendung dunkel gestellt.

Zur Herstellung der Fixierungslösung werden 0,2 g Paraformaldehyd in Pulverform in 10 ml Phosphatpuffer (PBS-Puffer) unter alkalischen Bedingungen gelöst. Nach vollständigem Lösen wurde mit 25%iger Salzsäure neutralisiert, indem wir wieder einen pH-Wert von 7,0 einstellten. Anschließend wurden die Präparate für 2 min mit 10 µl des 200fach verdünnten Fluoreszenzfarbstoffs LIVE/DEAD® BacLight™ gefärbt und mit 10 µl der 2%igen Paraformaldehydlösung fixiert. Die Objektträger deckten wir mit sterilen Deckgläschen ab. Von jedem Plättchenkonzentrat wurden pro Blutspender 3 Präparate mit stimulierten Plättchen erstellt und je 10 Gesichtsfelder ausgewertet.

Bei den Experimenten mit den Klebsiellen, die ebenso wie *Escherichia coli* zu den Enterobakterien gehören, bedienten wir uns einer anderen Möglichkeit zur Zählung der Bakterien. Klebsiellen haben die Fähigkeit, sich mit schleimigen Substanzen zu umgeben und bilden so größere Aggregate, was die Anwendung der Neubauer Zählkammer stark einschränkte. Aus diesem Grunde entschlossen wir uns, die für *Escherichia coli* gebräuchliche Methode nach McFarland auch auf diesen Bakterienstamm anzuwenden.

Bei dieser Methode wird mithilfe eines Densitometers (Densimat®, bioMérieux GmbH, Nürtingen, Deutschland) die optische Dichte einer Flüssigkeit (NaCl, 0,9%) gemessen, in der sich Bakterien befinden. Die Absorption des Lichtes durch die Bakterien wird bei den Wellenlängen 520 nm und 700 nm gemessen und in einer durch das Gerät festgelegten Arbeitseinheit angegeben. Die Bestimmung nach McFarland ist eine gebräuchliche und anerkannte Methode zur Quantifizierung von Bakterien.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die möglichen Einstellungen des McFarland. Einstellung bedeutet in diesem Zusammenhang die Herstellung einer

bestimmten Bakterienkonzentration, erkennbar an dem eingestellten Wert am entsprechenden Gerät.

Arbeitseinheiten	1	2	3	4	5	6
Bakterien in $\times 10^6/\text{ml}$	300	600	900	1200	1500	1800

Tab. 3: McFarland – Einstellungen bezogen auf *E. coli* (Fa. bioMérieux®)

Die Methode nach McFarland ist auch auf *Klebsiella pneumoniae* anwendbar. Bei diesem Verfahren wird eine ausreichend große Bakterienkolonie von der Agarplatte des Brutschanks mit 4 ml einer physiologischen NaCl-Lösung in einem Reagenzglas vermischt und in das optische Messgerät gegeben. Danach wird der Messwert des Gerätes durch Zugabe von NaCl-Lösung auf einen Wert von 2 gebracht, was bedeutet, dass sich nun in der Flüssigkeit eine Konzentration von $600 \times 10^6 / \text{ml}$ (also $6 \times 10^8 / \text{ml}$) Bakterien befindet.

Die Chlamydien sind obligat intrazellulär lebende Bakterien und wurden uns tiefgefroren und in Wirtszellen befindlich überlassen. Die Zellen wurden aufgetaut und mit Hilfe von Rüttler und Glasperlen aufgebrochen. Anschließend folgten eine kurze Zentrifugation und das Abpipettieren des chlamydienhaltigen Überstandes. Das Zählen erfolgte wiederum in der Neubauer-Zählkammer. Der weitere Versuchsablauf entspricht dem der vorangegangenen Experimente.

Die gewünschte Konzentration von *Bacillus subtilis* wurde ebenfalls mit Hilfe der Neubauer-Kammer entsprechend unseren Vorgaben kontrolliert bzw. eingestellt.

Zu den Möglichkeiten der Stimulation der Plättchen (Koinkubationsmöglichkeiten):

Neben der Verwendung von humanem Thrombin, welches wir für den größten Teil unserer Experimente verwendet haben, gibt es weitere Möglichkeit der Stimulation der Blutplättchen. Die von uns verwandte alternative Methode bestand in der Stimulation der Plättchen mit einem synthetischen Thrombinrezeptoragonisten mit

der Aminosäuresequenz SFLLRNPNDKYEPF (Abkürzung SFLLRN, Sigma S-7152). Dieses Stimulans aktiviert nur *einen* Thrombinrezeptor (Protease activated receptor-1; PAR-1). SFLLRN sorgt hauptsächlich für eine Degranulierung der Plättchen ohne Formveränderung (KINLOUGH-RATHBONE et al. 1993).

Den Experimenten ist gemeinsam, dass nach erfolgter Exposition der Bakterien mit den potentiell bakteriziden Komponenten die Färbung und Fixierung der Präparate folgte.

Wir untersuchten insgesamt 3 verschiedene Möglichkeiten, Bakterien mit aktivierten Plättchen oder deren Inhaltsstoffen zu beeinflussen.

Die Inkubation der Bakterien mit humanem Thrombin wurde in 1. schon ausführlich beschrieben.

Um darzustellen, inwieweit nur die Inhaltsstoffe der Plättchen eine Bakterizidie ausüben, wurden Plättchen isoliert stimuliert, und nach Retraktion des Plättchen-Aggregates wurde der Überstand entnommen. Wir untersuchten dann dessen Wirkung auf die einzelnen Bakterien.

Dazu stimulierten wir je 10 µl der Plättchen in separaten Gefäßen mit 1 µl Thrombin. Nach 10 min hatte sich ein Plättchenaggregat gebildet, das mithilfe einer Pipettenspitze entfernt wurde. Im Überstand verblieben nur die Inhaltsstoffe der Plättchen. Mit diesem Überstand wurde dann in den Experimenten genauso verfahren wie mit den Thrombin-stimulierten Plättchen. Alle von uns untersuchten Bakterien setzten wir diesem Überstand aus. Die Experimente erfolgten meist parallel zu denen, die mit direkter Anwesenheit Thrombin-stimulierter Plättchen erfolgten.

2.8.3 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der einzelnen Präparate erfolgte mit einer Vergrößerung von 400 x, 630 x bzw. 1000 x. Bei den verhältnismäßig großen Borrelien genügte oftmals eine 400fache Vergrößerung. Bei den intrazellulär lebenden und somit viel kleineren Chlamydien griffen wir dann jedoch auf eine höhere Vergrößerung zurück. Zur Dokumentation dient eine elektronische Kamera (AxioCam, AxioVision 2.05, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland).

Nach der Einstellung der entsprechenden Vergrößerung werden nach dem Zufallsprinzip 10 Gesichtsfelder ausgewählt, in denen die lebenden sowie die toten Bakterien quantitativ erfasst werden. Mithilfe eines Filters können die rot fluoreszierenden toten Bakterien von den grün erscheinenden lebenden abgegrenzt werden; und es wird der Quotient aus den Zahlen toter und lebender Bakterien errechnet.

Für die Auswertung unserer Experimente zählten wir zuerst native Vergleichspräparate aus, ohne Zusatz bakterizider Komponenten, um die stark schwankende natürliche Absterberate in der Bakterienkultur zu ermitteln. Die Anteile der bereits in Kultur abgestorbenen Bakterien nannten wir Basistote. Die übrigen Präparate wurden unmittelbar danach betrachtet. Pro Versuch wurden 3 Objektträger a 10 Gesichtsfelder betrachtet und die darin enthaltenen lebenden sowie toten Bakterien gezählt. Aus den Ergebnissen der Zählung (in 30 Gesichtsfeldern pro Experiment) wird der Mittelwert gebildet (sog. Gesamtabsterberate), der dann mit dem Mittelwert der zuvor ermittelten Basistoten in Beziehung gesetzt wird, um den Bakterizidie-Index zu errechnen.

Dabei bedienen wir uns folgender Formel:

$$\text{Bakterizidie-Index in Prozent} = \frac{(\text{Gesamtabsterberate} - \text{Basistote}) \times 100}{(100 - \text{Basistote})}$$

Die gewonnenen Ergebnisse stellen also den tatsächlichen Anteil an Bakterien dar, die durch den direkten Einfluss der aktivierten Plättchen oder deren Granula abgetötet bzw. geschädigt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Aspekte der Plättchen-vermittelten bakteriziden Effekte

3.1.1 Blutplättchen

Die Plättchen arrangieren sich nach Stimulation mit Thrombin in Aggregaten. Ein solches Plättchenaggregat ist im folgenden elektronenmikroskopischen Bild dargestellt. Es sind viele unterschiedlich stark degranulierte Plättchen erkennbar.

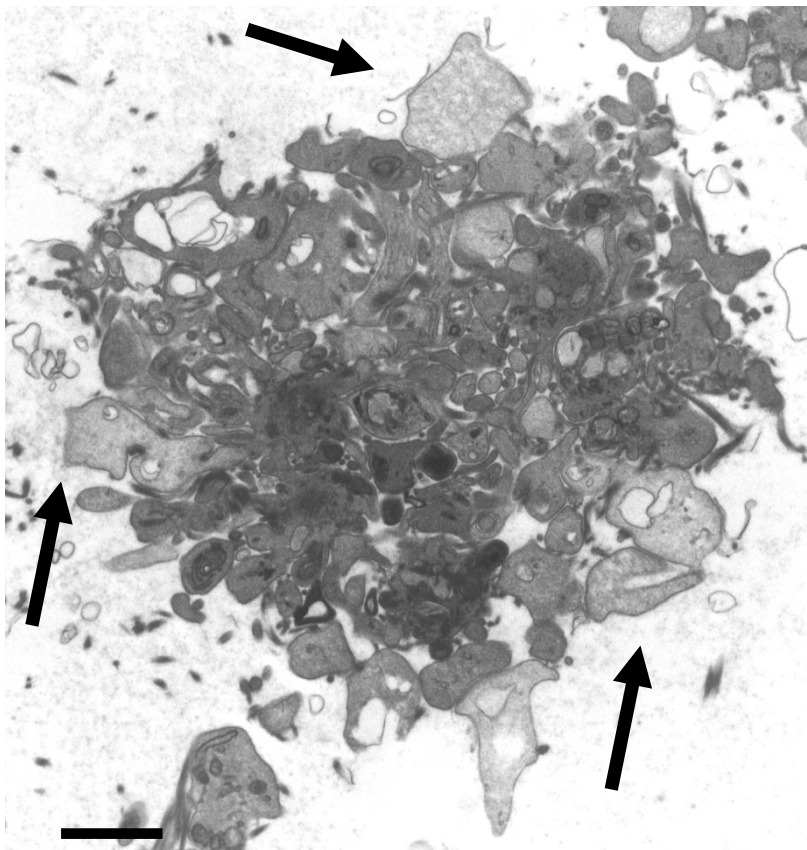


Abb. 3: Durch Einwirkung von Thrombin aggregierte Blutplättchen, die im äußeren Bereich zum Teil komplett degranuliert sind (Pfeile).

Maßstabsbalken: 3 μm

3.1.2 Borrelien

Borrelien sind 0,3 – 0,6 µm dicke, 8 – 18 µm lange, flexible Spirochäten, die aus einem inneren Zytoplasmazyylinder und einer äußeren Zellmembran bestehen. Zwischen diesen beiden Strukturen finden sich Endoflagellen. Diese kontrahieren asynchron, führen zum helikalen Erscheinungsbild und ermöglichen dem einzelnen Bakterium eine typische Schraubenbewegung. Die Anzahl der Endoflagellen variiert in den einzelnen Subtypen, wodurch sich die Borrelien u.a. klassifizieren lassen. Borrelien weisen durchschnittlich 3 – 8 Windungen auf. Durch Rotation um die Längsachse sind sie zu intensiver Bewegung fähig.

Borrelien lassen sich durch das DNA-Farbstoff-Gemisch LIVE/DEAD® BacLIGHT™ anfärben, dabei fluoresziert das Bakterium in Abhängigkeit von der Permeabilität der Außenmembran grün (bei intakter Membran) oder rot (Abb. 4a/b).

Nach Koinkubation mit stimulierten Plättchen bzw. deren Inhaltsstoffen verloren die Borrelien ihre typische helikale Struktur teilweise oder ganz (Abb. 4b). Einige von ihnen sahen strichförmig aus, andere erschienen zusammengerollt. Zusätzlich waren oftmals endständige Auftreibungen als Zeichen der Schädigung zu erkennen (Abb. 4b).

Im elektronenmikroskopischen Bild sind der innere Zytoplasmazyylinder mit konstantem Durchmesser, die Flagellen sowie die äußere Membran klar darstellbar. Im Querschnitt fallen kleine Ausbuchtungen der Außenmembran auf, die die Endoflagellen enthalten (Abb. 5a).

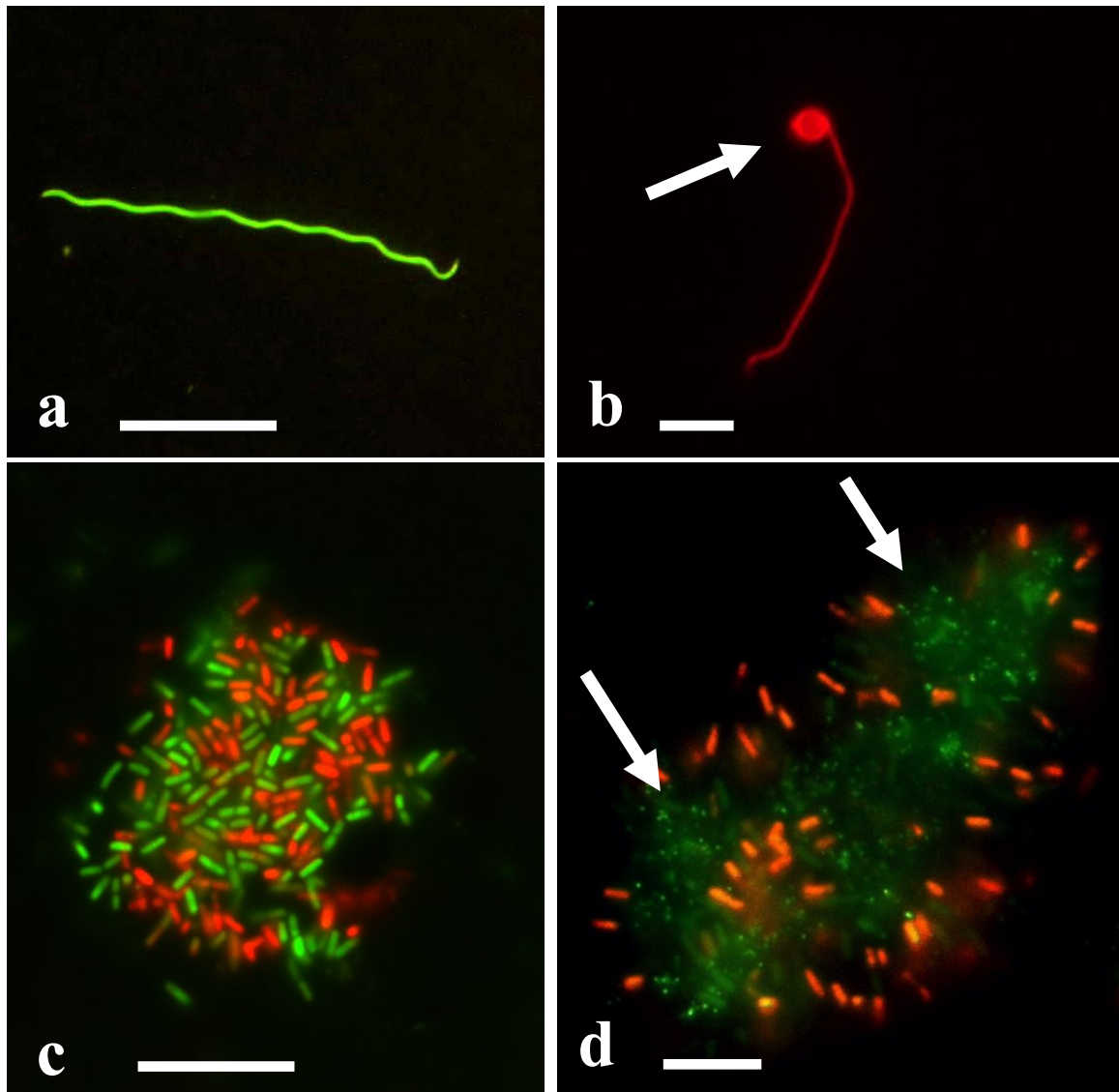


Abb. 4: LIVE/DEAD® Doppelfluoreszenzfärbung von Borrelien (a und b) sowie *Bacillus subtilis* (c und d). Intakte Borrelien zeigen eine helikale Struktur und färben sich grün (a), geschädigte Borrelien färben sich rot, verlieren ihre Windungen und zeigen zum Teil umschriebene Anschwellungen, sogenannte Gemmata (Pfeil in b).

Eine Mischpopulation mit teils intakten, teils geschädigten *Bacillus subtilis* ohne Plättchen (c). Blutplättchen nehmen ebenfalls den grünen Farbstoff auf und lassen eine feingranuläre Anfärbung ihrer Mitochondrien erkennen (Pfeile in d).

Maßstabsbalken: 10 µm

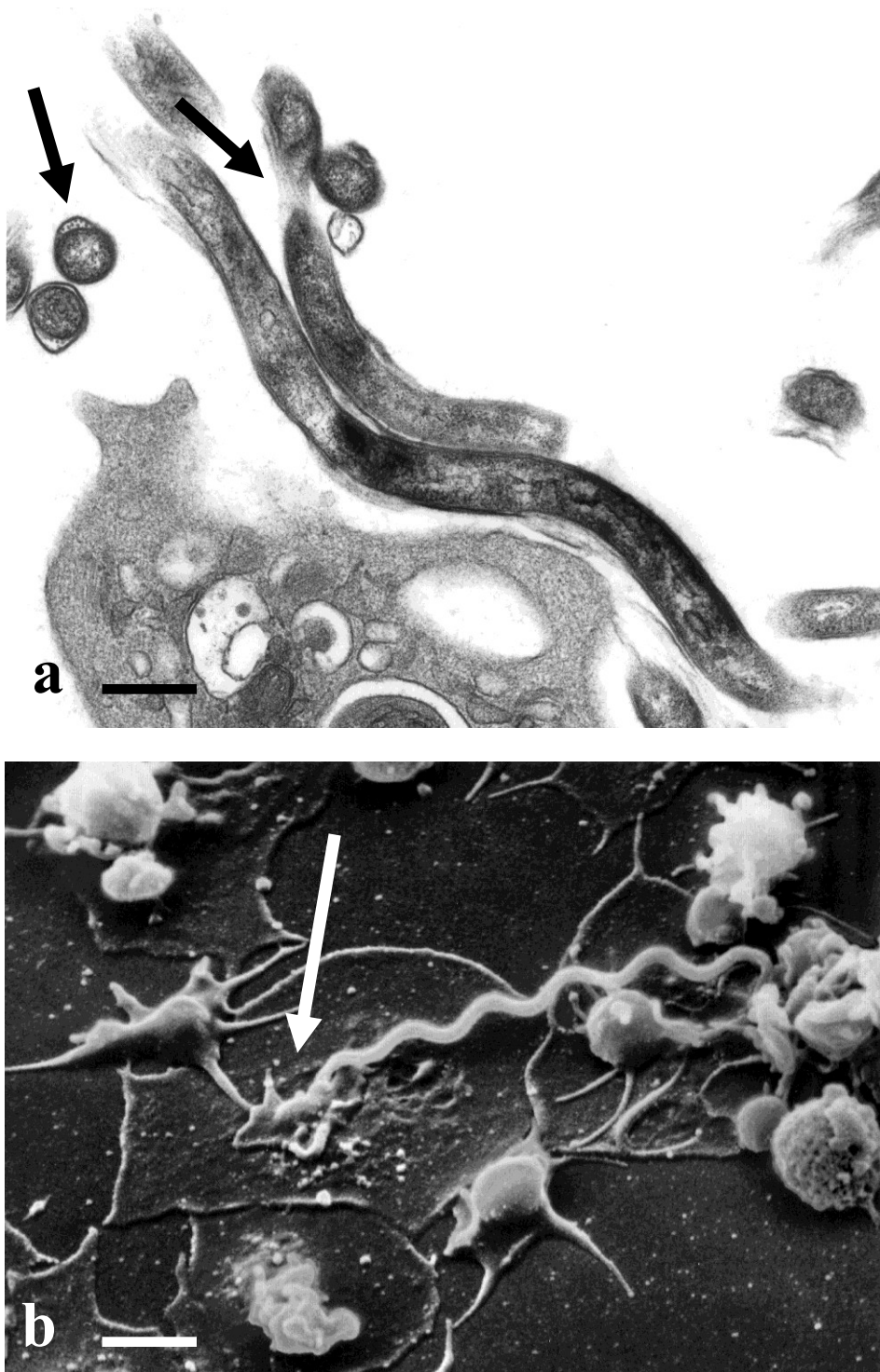


Abb. 5: Intakte *Borrelia burgdorferi* im Längs- und Querschnitt (a). Die Pfeile weisen auf die Flagellen, die für die helikale Struktur sowie die Beweglichkeit der Bakterien verantwortlich sind. Borrelien binden bei Koinkubationen oft mit einem Ende an Plättchen, die hier auf einem Deckgläschen gespreitet sind (b; Pfeil).

Maßstabsbalken: 250 nm in a; 3 µm in b

Geschädigte Borrelien erkennt man am vergrößerten Querschnitt; in Analogie zur roten Fluoreszenzfärbung führt die gestörte Permeabilität der Außenmembran offenbar zum unkontrollierten Einstrom von Wasser und damit zum Anschwellen der Bakterien. Zunächst schwillt der Raum zwischen Zytoplasmazyylinder und äußerer Membran an. Man spricht von sogenannten Gemmata (Abb. 4b), die auf zweierlei Weisen interpretiert werden können: In Kultur gefundene Gemmata sind als Anpassungsform beschrieben worden; derartige Schwellungen werden aber auch als Ausdruck einer Schädigung angesehen.

Zusätzlich zum äußeren Raum kann auch der innere Zytoplasmazyylinder anschwellen; und nach Koinkubation mit stimulierten Blutplättchen finden sich oft Gruppen kleiner Vesikel, die vermutlich Reste zerfallener Borrelien sind (Pfeilspitzen in Abb. 6a).

Vereinzelt konnten auch Anschnitte von Borrelien innerhalb von Plättchen gefunden werden; aktivierte Blutplättchen können Krankheitserreger offenbar nicht nur durch ihre Inhaltsstoffe schädigen, sondern sind auch in der Lage, komplette Bakterien einzukapseln. Die folgenden TEM-Aufnahmen (Abb. 6b und c) zeigen dieses Ereignis deutlich, die angeschnittenen Borrelien weisen allerdings eine intakte Struktur auf.

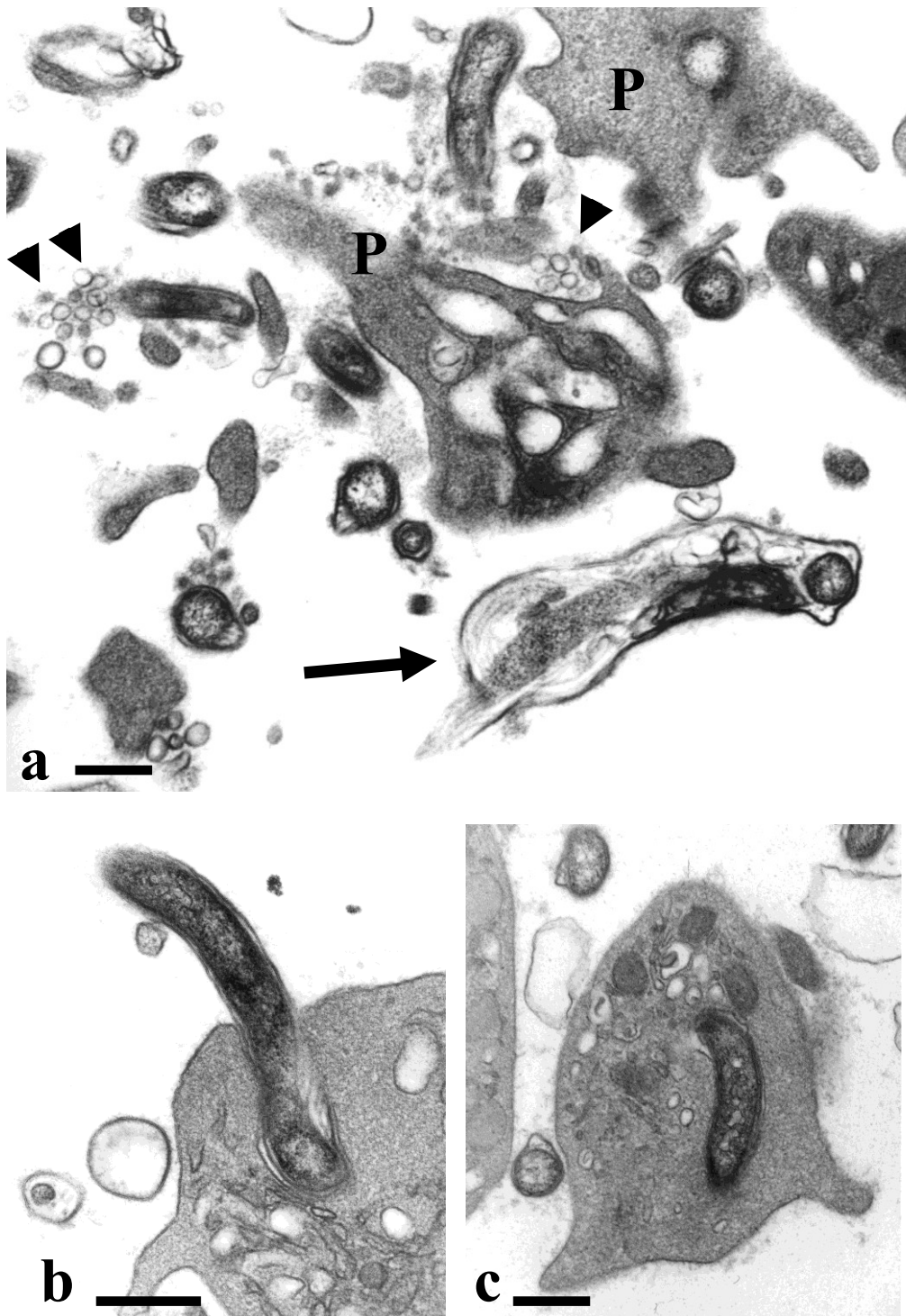


Abb. 6: Nach Kontakt mit stimulierten und degranulierten Plättchen (P) zeigen die Borrelien zum Teil Anschwellungen der äußeren Hülle mit Loslösung der Flagellen vom Zytoplasmazyylinder (Pfeil in a). Gruppen von kleinen Vesikeln sind wahrscheinlich Überreste von komplett zerfallenen Bakterien (Pfeilspitzen in a). Vereinzelt finden sich intakte Borrelien innerhalb von Plättchen (b und c). Maßstabsbalken: 250 nm

3.1.3 *Bacillus subtilis*

Ein intaktes Bakterium der Spezies *Bacillus subtilis* ist ungefähr $2 \times 0,5 \mu\text{m}$ groß. Es hat ein elektronendichtes Zytoplasma und enthält viele Ribosomen. Die Zellmembran ist von einer dichten Zellwand umgeben (Abb. 7a). Ein variabler Anteil der Bakterien lässt die Entstehung von Sporen erkennen, die ihrerseits auch nach Einfluss schädigender Agenzien keinerlei morphologische Anzeichen einer Schädigung zeigen (Abb. 7c). *Bacillus subtilis* lässt sich ebenfalls mit LIVE/DEAD® BacLIGHT™ exzellent anfärben (Abb. 2).

Die Koinkubation mit aktivierten Blutplättchen führt offensichtlich zu einer Permeabilitätssteigerung der bakteriellen Membran (durch Rot-Fluoreszenz nach Färbung mit LIVE/DEAD® BacLIGHT™ erkennbar; Abb. 2) sowie zu Rupturen in der Zellwand. Dies führt zum Wassereinstrom, was eine Abnahme der Elektronendichte und einen Verlust an Ribosomen und anderen intrabakteriellen Strukturen zur Folge hat (Abb. 7b und c).

Von allen untersuchten Bakterien zeigte *Bacillus* die stärkste Bindung an die stimulierten Plättchen. An der direkten Kontaktstelle zwischen *Bacillus* und den Plättchen zeigten letztere häufig eine gekräuselte Membran, das sog. „membrane ruffling“, sowie feine Filamente im Zytoplasma (Abb. 7d). Derartige Strukturen sind u.a. bei Granulozyten und Osteoklasten beschrieben worden und gelten als morphologisches Äquivalent der lokalen Anreicherung und Aktivierung von NADPH-Oxidase, die freie Sauerstoffradikale generiert.

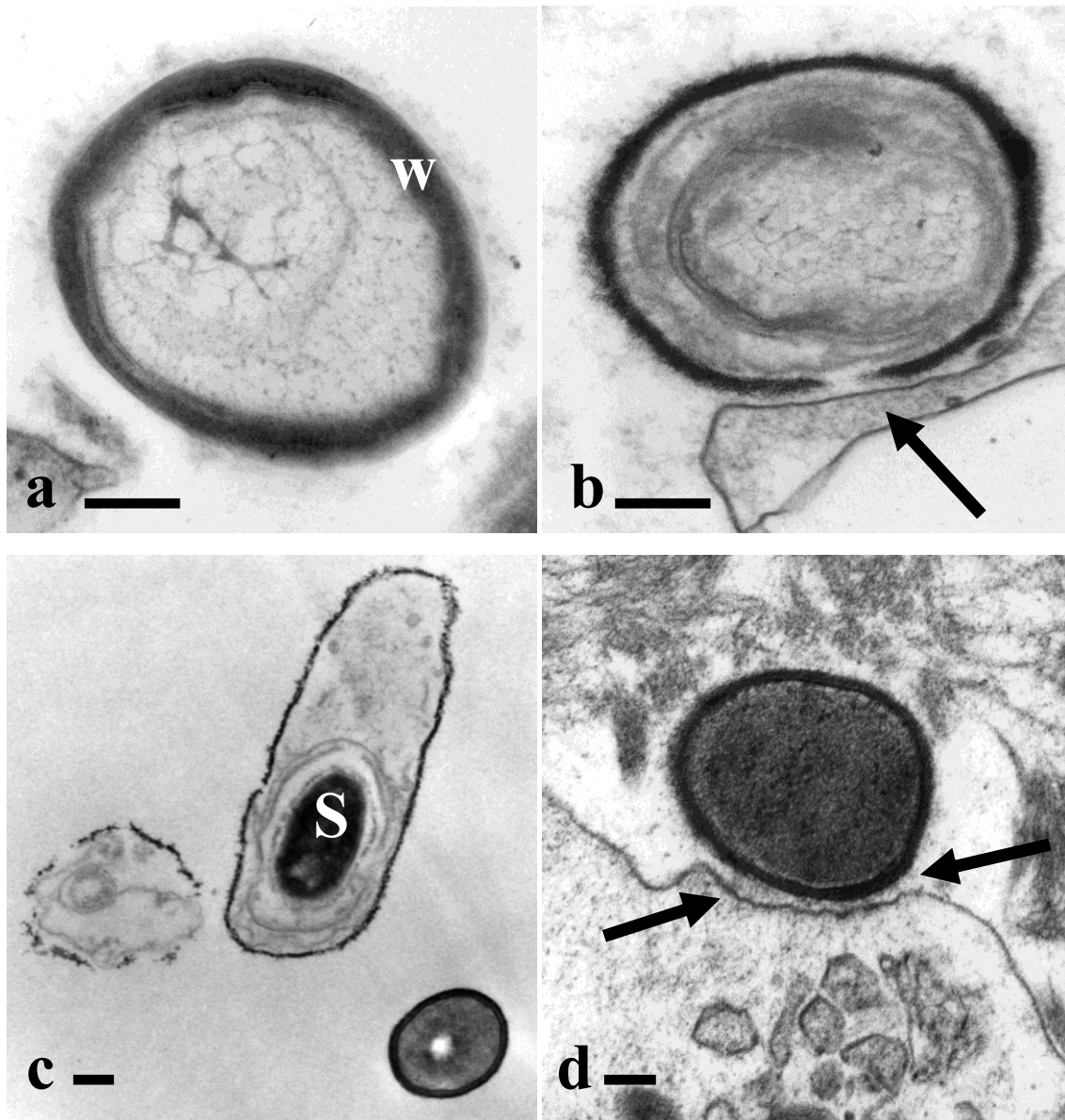


Abb. 7: Intakte Bakterien der Art *Bacillus subtilis* sind etwa $2\ \mu\text{m} \times 0,5\ \mu\text{m}$ groß und zeigen eine elektronendichte Zellwand (W in a). Die bakterizide Wirkung der Thrombin - stimulierten Plättchen zeigt sich in Rupturen der Zellwand (Pfeil in b) bis hin zum kompletten Zerfall der Wand und einer massiven Auflockerung des Zytoplasmas (c). Die Sporen bleiben dabei morphologisch unauffällig (S in c). Nach Bindung von *B. subtilis* zeigt die Membran von stimulierten Plättchen häufig das sogenannte "membrane ruffling" (Pfeile in d), welches in Granulozyten und Osteoklasten typisch für die lokale Synthese von Sauerstoff-Radikalen ist.

Maßstabsbalken: 100 nm

3.1.4 *Klebsiella pneumoniae*

Die Gattung *Klebsiella* umfasst gramnegative Stäbchenbakterien der Familie der Enterobacteriaceae. Benannt wurden sie nach dem ostpreußischen Bakteriologen Edwin Klebs. Die Bakterien haben keine aktive Bewegung und sind von einer Schleimkapsel umgeben. Die Kapsel ist ein Schutzmechanismus der Bakterienzelle gegenüber schädigenden Umwelteinflüssen bzw. gegenüber den Abwehrmechanismen des Wirtes. Der Kapselverlust geht mit Virulenzverlust einher. Die Schleimkapsel hat entsprechend die Anfärbbarkeit der Bakterien mit LIVE/DEAD® BacLIGHT™ erschwert; eine Zuordnung von lebenden und toten Bakterien im Präparat war jedoch eindeutig möglich.

3.1.5 *Chlamydia pneumoniae*

Chlamydien sind sehr kleine, obligat intrazellulär lebende Organismen. In der Wirtszelle liegen sie als Retikularkörperchen vor, sind metabolisch aktiv und vermehren sich. Außerhalb ihrer Wirtszellen existieren sie als Elementarkörperchen von ca. 0,2 - 0,4 µm Durchmesser. In dieser Form haben wir sie in unseren Experimenten benutzt (Abb. 8). Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer rein intrazellulären Vermehrung wurden Chlamydien bis in die sechziger Jahre hinein den Viren zugerechnet; das intrazelluläre Persistieren erschwert es zudem bakteriziden Abwehrmechanismen des Wirtes, diese Bakterien erfolgreich zu bekämpfen.

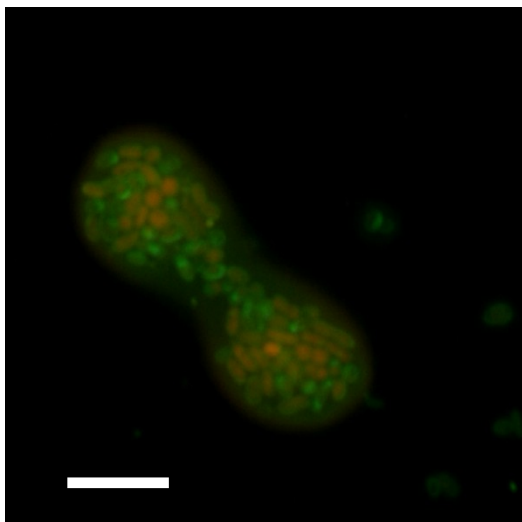


Abb. 8: Bakterien der Art *Chlamydia pneumoniae* zeigen im Vergleich zu Borrelien und *B. subtilis* eine deutlich schwächere Fluoreszenz; die Färbung mit LIVE/DEAD® erlaubt aber noch eine zuverlässige quantitative Auswertung. Maßstabsbalken: 10 µm

3.2 Quantitative Erfassung der bakteriziden Effekte

3.2.1. Ausgangssituation und Kontrollwerte

Da wir in Vorversuchen ausgeschlossen haben, dass unstimulierte Plättchen, die Aktivatoren allein oder die Suspensionslösungen allein bakterizid wirken, haben wir als Negativkontrolle in allen Experimenten den Prozentsatz der Bakterien bestimmt, die bereits in Kultur avital waren (physiologische Absterberate bzw. Basistote). Bei diesen Basistoten gab es in Abhängigkeit von der Bakterienart große Unterschiede: Die wenigsten Basistoten fanden sich in Kulturen von *Bacillus subtilis* (5%), die höchsten Werte fanden wir bei *Chlamydia pneumoniae* mit knapp 15%. Diese starken Streuungen zwangen uns, im Sinne der Vergleichbarkeit der Ergebnisse eine Korrekturformel einzuführen, um die reelle Wirksamkeit der Plättchen-vermittelten Bakterizidie zu ermitteln (siehe Kapitel 2.8.3).

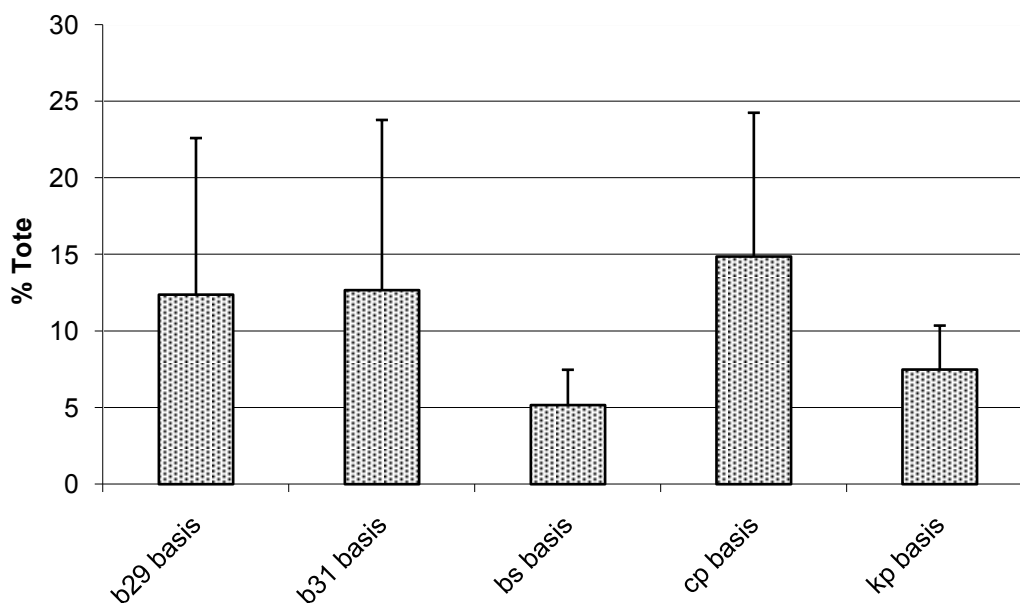


Abb. 9: Übersicht der in den Kulturen befindlichen avitalen Bakterien

Der Anteil an toten Bakterien in Kultur schwankte deutlich und lag mindestens bei 5,1% (*Bacillus subtilis*; bs basis) und maximal bei 14,9% (*Chlamydia pneumoniae*; cp basis)

3.2.2 Borrelien

Der Anteil der Basistoten belief sich bei B29 im Mittel auf 12,4 % und bei B31 auf 12,7 %. Es ergab sich, dass 91 % (*Borrelia garinii* B29) bzw. 91,2 % (*Borrelia burgdorferi* B31) durch Zusatz von aktivierten Plättchen abgetötet werden konnten. Damit wurden sehr hohe Bakterizidieraten erreicht. Bei den Experimenten, bei denen die Borrelien mit den Überständen der zuvor mit Thrombin degranulierten Plättchen koinkubiert wurden, zeigte sich eine Bakterizidie von 52% (B29) bzw. 60% (B31). Nach Plättchenstimulation mit SFLLRN und Koinkubation waren 17,4% (B29) bzw. 16,6% (B31) der Bakterien nicht mehr vital. Der Anteil abgetöteter Bakterien sank noch weiter, als die Borrelien nur mit den Überständen SFLLRN-stimulierter Plättchen koinkubiert wurden. Dieser lag bei beiden Stämmen bei 13%. (Tab. 4, Abb. 10 u. 11). Bei der Koinkubation mit Thrombin-stimulierten Plättchen habe ich zwischen Gesichtsfeldern mit und ohne Plättchen unterschieden. Bei Anwesenheit von Plättchen im Gesichtsfeld ergab sich ein Bakterizidie-Wert von 95% (B29) bzw. 96% (B31) und ohne anwesende Plättchen fanden sich 89% (B29) bzw. 90% (B31) avitale Bakterien. Der Unterschied zwischen diesen Werten war statistisch nicht zu sichern (Tab. 5).

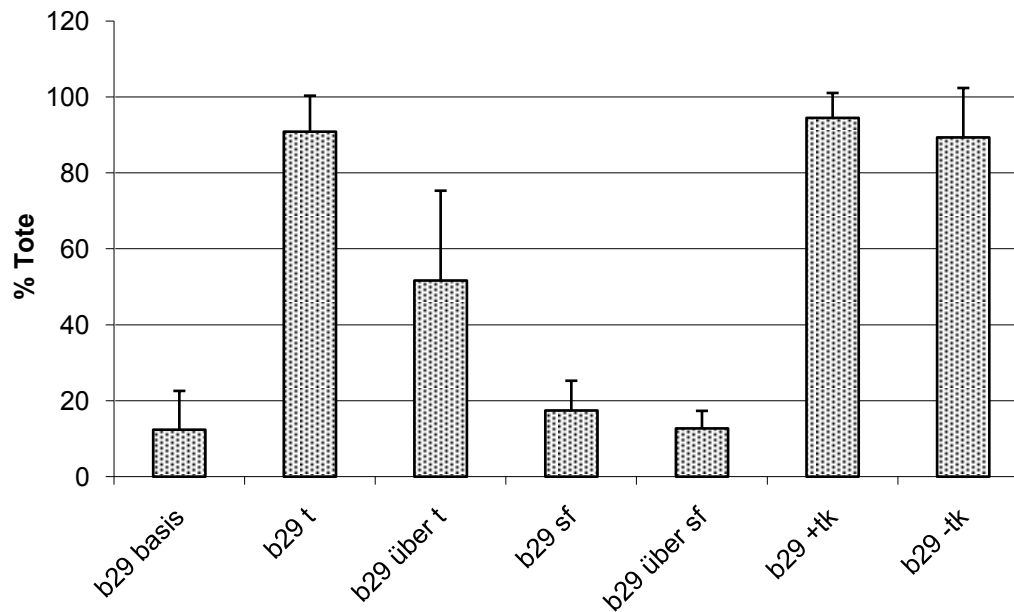


Abb. 10: Abtötung von *Borrelia garinii* (b29) durch Einwirkung von Plättchen bzw. Überständen

Bei *Borrelia garinii* (b29) lag Anteil an abgetöteten Bakterien durch Thrombin-stimulierte Plättchen bei 91% (b29 t; n=37). Es wurden 52% der Bakterien durch die Überstände aktivierter Plättchen abgetötet (b29 über t; n=31). Die Einfluss durch den synthetischen Thrombinrezeptoragonisten SFLLRN war deutlich geringer und ergab eine Bakterizidie von 17,4% (Plättchenstimulation mit SFLLRN (b29 sf; n=5) bzw. 13% (Überstände (b29 über sf; n=5). Es fand sich kein signifikanter Unterschied bei der Auswertung mit/ohne Plättchen im Gesichtsfeld (b29 +tk/ b29 -tk). Der Anteil an Basistoten (b29 basis) lag bei 12,4%.

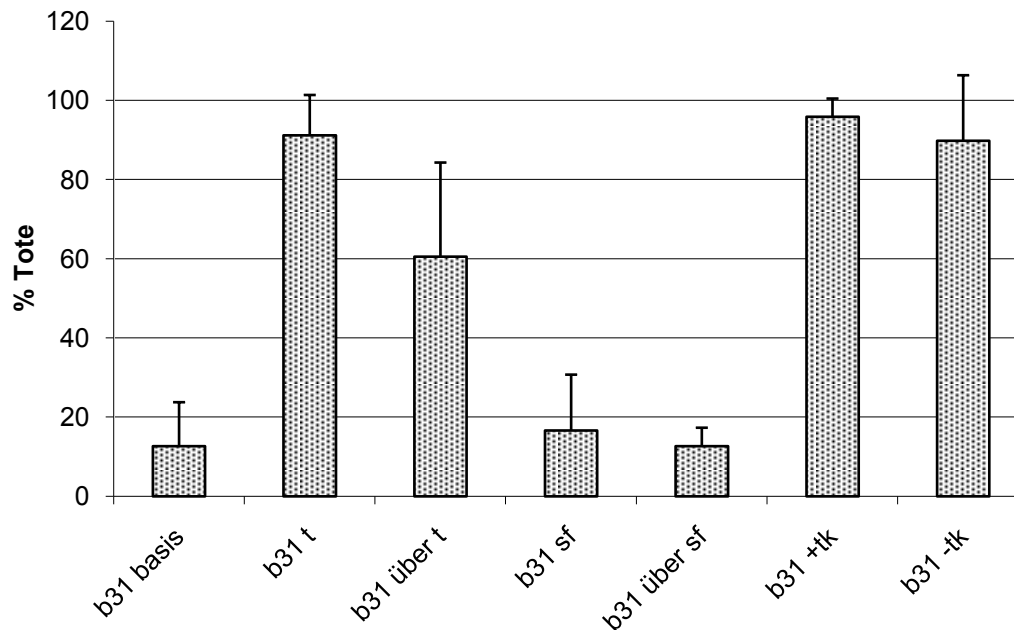


Abb. 11: Abtötung von *Borrelia burgdorferi* (b31) durch Einwirkung von Plättchen bzw. Überständen

Bei *Borrelia garinii* (b31) lag die Bakterizidie durch Thrombin-stimulierte Plättchen bei 91,2% (b31 t; n=37). Es wurden 60% der Bakterien durch die Überstände aktivierter Plättchen abgetötet (b31 über t; n=32). Bei den Experimenten mit SFLLRN als Plättchenstimulator ergab sich eine Bakterizidie von 16,6% (Plättchenstimulation mit SFLLRN (b31 sf; n=5) bzw. 13% (Überstände (b31 über sf; n=5). Es fand sich auch hier kein signifikanter Unterschied bei der Auswertung mit/ohne Plättchen im Gesichtsfeld (b31 +tk/ b31 -tk). In Kultur waren 12,6% der Bakterien avital (b31 basis).

3.2.3 *Bacillus subtilis*

Bei *Bacillus subtilis* wurden regelmäßig auch 30 % der gebildeten Sporen gefärbt. Diese färbten sich rot, sind jedoch eindeutig von toten Bakterien zu unterscheiden.

Der Anteil der in der Kultur befindlichen avitalen Bakterien lag hier bei 5,1 %.

Bacillus subtilis reagierte ebenfalls hochgradig sensibel auf die aktivierten Plättchen. Durch den Einfluss der aktivierten Plättchen und deren Inhaltsstoffe, waren durchschnittlich 77 % der Bakterien nicht mehr vital. Der Anteil toter Bakterien nach Koinkubation mit den Überständen Thrombin-stimulierter Plättchen lag bei 36% und war damit deutlich geringer. (Tab. 4, Abb. 12). Bei der Koinkubation mit Thrombin-stimulierten Plättchen habe ich hier ebenfalls zwischen Gesichtsfeldern mit und ohne

Plättchen unterschieden. Bei Anwesenheit von Plättchen im Gesichtsfeld ergab sich ein Bakterizidie-Wert von 86% und ohne anwesende Plättchen fanden sich 60% avitale Bakterien. Der Unterschied zwischen diesen Werten war statistisch signifikant (Tab. 5).

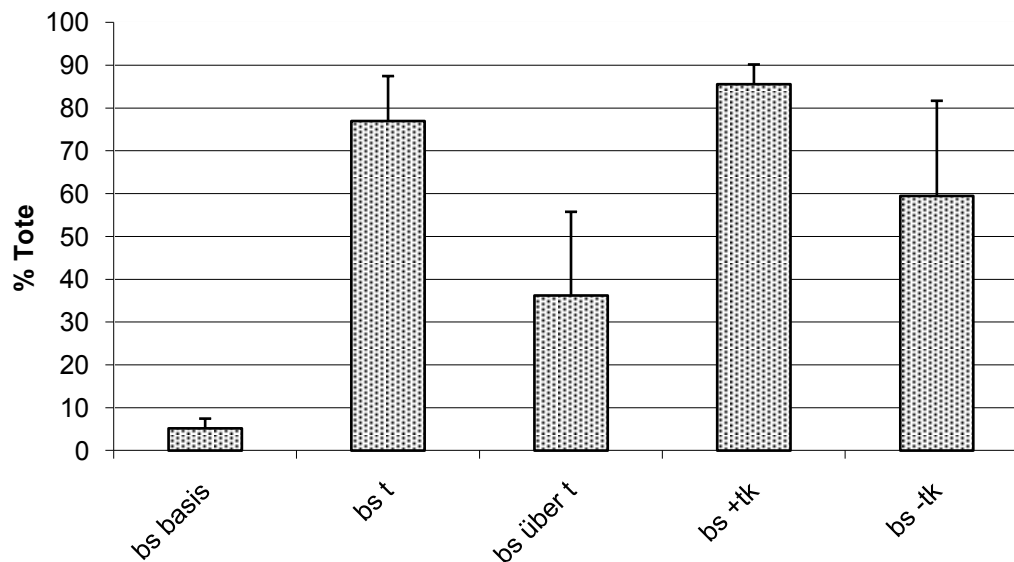


Abb. 12: Abtötung von *Bacillus subtilis* (bs) durch Einwirkung von Plättchen bzw. Überständen

Wie bereits beschrieben, fand sich bei *Bacillus subtilis* der geringste Anteil an toten Bakterien in Kultur (5,1%; bs basis). Durch Koinkubation mit Thrombin-stimulierten Plättchen waren 77% der Bakterien nicht mehr vital (bs t; n=7). Der Bakterizidieindex nach Koinkubation mit den Überständen Thrombin-stimulierter Plättchen lag bei 36,2% (bs über t; n=20). Bei der Auswertung der Gesichtsfelder mit und ohne Plättchen (bs +tk/ bs -tk) fand sich auch hier ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$; Rangsummentest nach Wilcoxon), der noch deutlicher war als bei den Chlamydien.

3.2.4 *Klebsiella pneumoniae*

Der Anteil an in der Kultur befindlichen avitalen Bakterien betrug bei den Klebsiellen durchschnittlich 7,5 %. Nach Inkubation mit Thrombin-aktivierten Plättchen lag der Anteil der toten Klebsiellen bei 78,5 %. Nach Zugabe der Überstände Thrombin-stimulierter Plättchen und Koinkubation waren mit 52% nur mäßige bakterizide Effekte erkennbar (Tab. 4, Abb. 13). Bei der Koinkubation mit Thrombin-stimulierten Plättchen habe ich auch bei den Klebsiellen zwischen Gesichtsfeldern mit und ohne Plättchen unterschieden. Bei Anwesenheit von Plättchen im Gesichtsfeld ergab sich

ein Bakterizidie-Wert von 79% und ohne anwesende Plättchen fanden sich 85% avitale Bakterien. Der Unterschied zwischen diesen Werten war statistisch nicht zu sichern (Tab. 5).

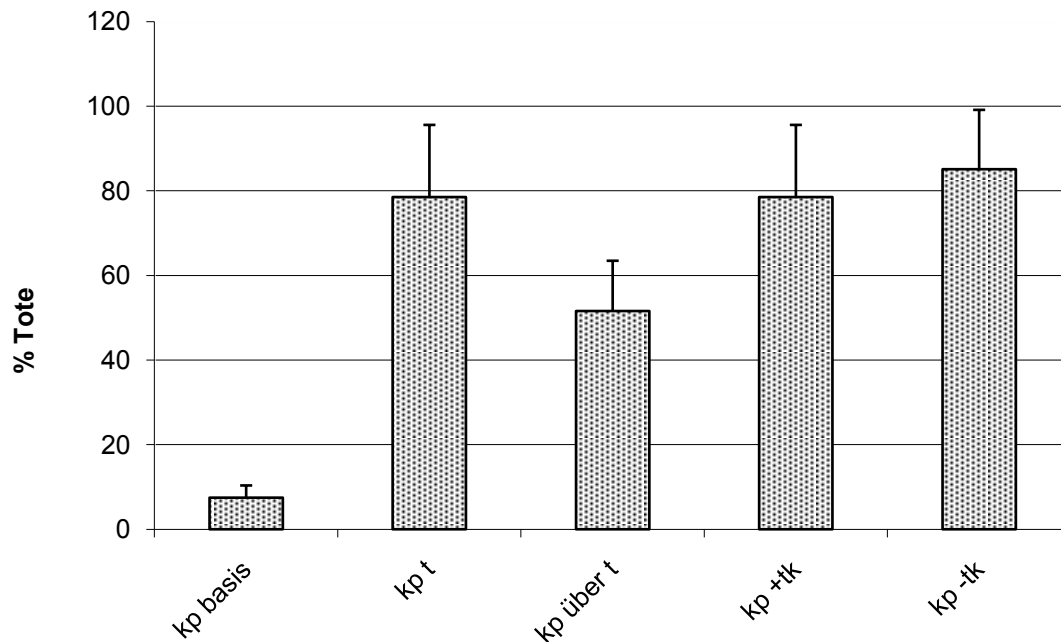


Abb. 13: Abtötung von *Klebsiella pneumoniae* (kp) durch Einwirkung von Plättchen bzw. Überständen

Der Anteil an toten Bakterien in Kultur lag bei 7,5% (kp basis). Bei *Klebsiella pneumoniae* (kp) lag der Anteil an abgetöteten Bakterien durch Thrombin-stimulierte Plättchen bei 78,5% (kp t; n=21). Es wurden 52% der Bakterien durch die Überstände aktivierter Plättchen abgetötet (kp über t; n=7). Ein signifikanter Unterschied bei der Auswertung mit/ohne Plättchen im Gesichtsfeld (kp +tk/ kp -tk) gelang nicht.

3.2.5 *Chlamydia pneumoniae*

Der Anteil an in der Kultur befindlichen avitalen Bakterien belief sich bei den Chlamydien auf 14,9 %. Nach Koinkubation mit den Thrombin-stimulierten Plättchen war auch hier eine deutliche Bakterizidie erkennbar. 80,8 % der Chlamydien waren nicht mehr vital. Der Einfluss durch die Überstände war mit 67,6 % nur wenig geringer (Tab. 4, Abb. 14). Bei der Koinkubation mit Thrombin-stimulierten Plättchen habe ich zudem zwischen Gesichtsfeldern mit und ohne Plättchen unterschieden. Bei Anwesenheit von Plättchen im Gesichtsfeld ergab sich ein Bakterizidie-Wert von 78%

und ohne anwesende Plättchen fanden sich 85% avitale Bakterien. Der Unterschied zwischen diesen Werten war statistisch nicht zu sichern (Tab. 5).

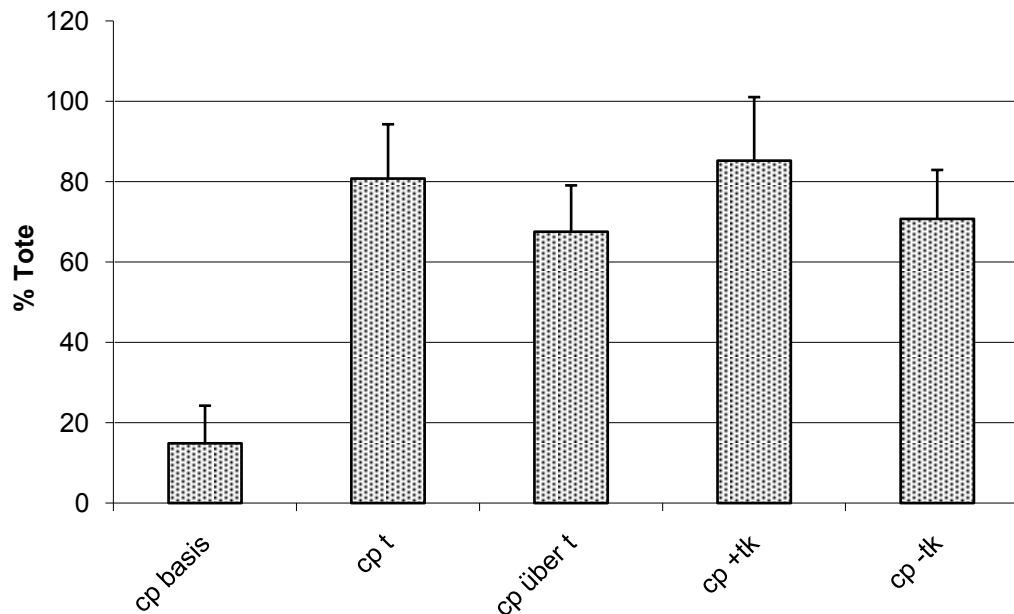


Abb. 14: Abtötung von *Chlamydia pneumoniae* (cp) durch Einwirkung von Plättchen bzw. Überständen

Der Anteil an toten Bakterien in Kultur war bei *Chlamydia pneumoniae* (cp) mit 14,9% am höchsten (cp basis). Nach Zugabe von Thrombin-stimulierten Plättchen und nachfolgender Koinkubation stieg der Anteil auf 80,8% (cp t; n=8). Durch die Überstände Thrombin-stimulierter Plättchen ließen sich 67,6% der Bakterien abtöten (cp über t; n=8). Es fand sich ein signifikanter Unterschied bei der Auswertung der Gesichtsfelder mit/ohne Plättchen (cp +tk/cp -tk). Dieser lag bei $p = 0,039$; Rangsummentest nach Wilcoxon.

Die folgende tabellarische Übersicht soll noch einmal zusammenfassend darstellen, zu welchen Leistungen die Plättchen-vermittelte Bakterizidie in der Lage ist:

Ausgehend von immer <15% toten Bakterien in Kultur vermag die Stimulation von Plättchen durch Thrombin stets mehr als 75% der Bakterien abzutöten (Tab. 4). Die bakterizide Wirkung von Überständen ist immer deutlich geringer und bleibt meist unter 60% (Abb. 10 bis 14).

Bakterium	In Kultur befindliche avitale Bakterien in % +/- SD	Maximale Wirkung in % +/- SD
<i>Borrelia garinii</i> B29	12,4 +/- 10,2	91 +/- 9,4
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31	12,7 +/- 11,1	91,2 +/- 10,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,5 +/- 2,9	78,5 +/- 17
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	14,9 +/- 9,4	80,8 +/- 13,5
<i>Bacillus subtilis</i>	5,2 +/- 2,3	77 +/- 10,5

Tab. 4: Gegenüberstellung von in Kultur befindlichen avitalen Bakterien und maximaler bakterizider Wirkung stimulierter Plättchen.

3.2.6 Einfluss von direkten Kontakten

Während der mikroskopischen Auswertung entstand der Eindruck, dass in unmittelbarer Nähe von Plättchen mehr tote Bakterien aufzufinden sind als in Gesichtsfeldern ohne sichtbare Plättchen. Deshalb möchte ich hier noch einmal diese Ergebnisse zusammengefasst darstellen.

Bakterienart	Plättchen im Gesichtsfeld* in % +/- SD	Keine Plättchen im Gesichtsfeld* in % +/- SD
<i>Borrelia garinii</i> B29 (n=25)	94,8 +/- 6,5	89,4 +/- 13
<i>Borrelia burgdorferi</i> B31 (n=26)	95,9 +/- 4,6	89,8 +/- 16,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=13)	78,5 +/- 17	85,1 +/- 14,1
<i>Chlamydia pneumoniae</i> (n=7)	85,3 +/- 15,8	70,8 +/- 12,2
<i>Bacillus subtilis</i> (n=6)	85,6 +/- 4,6	59,5 +/- 22,2

Tab. 5: Einfluss des direkten Kontaktes zwischen Plättchen und Bakterien auf die Absterberate

*im Gesichtsfeld bedeutet, man sah einen direkten Kontakt bzw. Überlagerungen von Plättchen und Bakterien

Es ergaben sich bei den Borrelien und den Klebsiellen nach statistischer Auswertung jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsreihen ($p_{B29} = 0,425$; $p_{B31} = 0,308$; $p_{K.p.} = 0,313$; Rangsummentest nach Wilcoxon).

Anders jedoch bei *Chlamydia pneumoniae* und *Bacillus subtilis*: Hier erwies es sich als signifikant, dass der direkte Kontakt der Bakterien zu den aktivierten Plättchen einen höheren Anteil an toten Bakterien zur Folge hatte ($p_{C.p.} = 0,039$; $p_{B.s.} = 0,002$).

In Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich also feststellen:

Durch den Einfluss Thrombin-stimulierter Plättchen ergab sich bei allen untersuchten Bakterienstämmen demnach eine maximale Wirkung zwischen 77% und 91%.

Der Anteil an avitalen Bakterien durch die Koinkubation mit den Überständen Thrombin-stimulierter Plättchen schwankte deutlich mehr und lag zwischen 36% und 68%.

Ein signifikanter Nachweis, dass die direkte Nähe von Bakterien und Plättchen einen Einfluss auf die Bakterizidie hat, gelang nur bei Chlamydien und Bacillus.

4 Diskussion

Die zentrale Rolle der Plättchen bei der Blutungsstillung ist weitgehend erforscht, und es ist seit langem bekannt, dass im Rahmen von Plättchenaggregation und -stimulation eine breite Palette von Entzündungsmediatoren freigesetzt wird (HERD und PAGE et al. 1994; KLINGER et al. 1997). Dadurch und aufgrund ihrer vielfältigen Zusammenarbeit mit Leukozyten wird den Plättchen auch eine zentrale Rolle bei Entzündungsprozessen zugeordnet (KLINGER und JELKMANN et al. 2002). In Anbetracht dieser funktionellen Verknüpfungen ist zu erwarten, dass Plättchen ebenfalls an der Infektabwehr beteiligt sind; und entsprechende antibakterielle Wirkungen von Blutplättchen werden bereits seit ca. 50 Jahren beschrieben (HIRSCH et al. 1960; WEKSLER et al. 1992).

Blutplättchen stehen bei Verletzungen des Gefäßendothels als erste Zellen zur Verfügung, um Entzündungs- und Abwehrprozesse zu starten. Schon während der Blutstillung können sie mit möglicherweise eingedrungenen pathogenen Keimen in Kontakt treten, und je nach eigenem Aktivierungszustand, auf diese reagieren. Dieser Kontakt zwischen Plättchen und Pathogenen wird bis heute in zwei kontroversen Richtungen diskutiert:

Zum einen können sich Pathogene, entweder direkt oder über Brücken-Proteine, gut an die Plättchenoberfläche anheften und damit die Plättchen als Vehikel für eine körperweite Vermehrung benutzen. Diese Interaktion ist zweifellos für eine Ausbreitung der Infektion förderlich (KLOTZ et al. 1989; YEAMAN et al. 1992). Ein zweiter infektionsförderlicher Prozess ist die Internalisierung von Pathogenen in entstehenden Plättchenaggregaten, in denen dann der Zutritt von bakteriziden Substanzen erschwert oder gar unmöglich ist (CLAWSON et al. 1971; ZANDER und KLINGER 2009).

Zum anderen verfügen Plättchen, in struktureller und funktioneller Analogie zu Granulozyten, über verschiedene Möglichkeiten, eingedrungene Pathogene zu bekämpfen. Blutplättchen können nach Stimulierung bakterizide Peptide ausschütten (NACHMANN et al. 1972; YEAMAN et al. 1997, KRIJGSVELD et al. 2000), und sie können Pathogene internalisieren (CLAWSON et al. 1975, YOUSSEFIAN et al. 2002, WHITE et al. 2005). Plättchen sind ebenfalls in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies freizusetzen, aber deren Menge scheint für bakterizide Effekte nicht ausreichend zu

sein (ZANDER und KLINGER 2009). Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle zum einen die von Plättchen freigesetzten Substanzen und zum anderen eine mögliche Phagozytose spielen, um die beobachteten bakteriziden Effekte zu erklären.

Um bei der Beobachtung der bakteriziden Effekte ein breites Wirkungsspektrum zu erfassen, haben wir als Untersuchungsobjekte Bakterien ausgewählt, die sich durch effektive Strategien den Abwehrprozessen von Wirtsorganismen widersetzen, die verschiedene Kompartimente im Körper besiedeln oder die durch Überleben an unwirtlichen Standorten eine hohe Streßresistenz beweisen.

Bacillus subtilis ist ubiquitär verbreitet und kann aus Boden (insbesondere Komposterde), Wasser und Luft isoliert werden. Sein natürlicher Standort sind aber die oberen Schichten des Bodens. Dort ist es z.B. Schwankungen der Lufttemperatur und der Luftfeuchte relativ ungeschützt ausgesetzt, die eintretende Verdunstung kann zum Absinken der Wasseraktivität und zur Ausbildung hoher Ionenstärken und osmotischer Drücke führen, einsetzender Regen zum hypoosmotischen Schock. Diesen und anderen Stresssituationen begegnet *B. subtilis* u.a. mit der Bildung von Osmoprotektiva, der Sezernierung extrazellulärer Enzyme zur Erschließung neuer Nahrungsquellen sowie der Freisetzung eines Antibiotikums zur Hemmung von Konkurrenten (BERNHARDT et al. 2000).

Bakterien der Art *Borrelia burgdorferi* besitzen mehrere Überlebensstrategien: Sie siedeln in wechselnden physikalischen Nischen wie in verschiedenen Geweben oder Zellen; und sie passen ihre Oberflächenstrukturen dem gerade genutzten Wirt an, indem sie z.B. die Expression ihrer "outer surface proteins" ändern. Diese Strategien führen dazu, dass ein großer Teil der Infektionen lange symptomlos bleibt und noch nach Jahren die Bakterien aus Haut oder Synovia isoliert werden können. Man nimmt an, dass so ca. 20% der Infektionen chronifizieren (SCHÄFER et al. 2005).

Klebsiella pneumoniae produziert als einziges Mitglied der Enterobacteriaceae große Mengen von Kapselpolysacchariden. Diese Kapsel stellt den wichtigsten Pathogenitätsfaktor der Spezies dar, denn sie schützt die Zellen vor Phagozytose, vor dem Komplementsystem, der spezifischen Immunabwehr, vor antimikrobiellen Peptiden der angeborenen Immunantwort, und vor anderen Antibiotika. *K. pneumoniae* ist ein opportunistischer Krankheitserreger, der nosokomiale Infektionen

bei immungeschwächten Patienten hervorruft und z.T. als panresistent bezeichnet wird (BURAK et al. 2007).

Bakterien der Art *Chlamydia pneumoniae* sind ebenfalls sehr erfolgreiche Mikroorganismen, die in vielen Fällen symptomarme oder -freie chronische Infektionen verursachen. Ihr Generationswechsel zwischen infektiösen, metabolisch inaktiven, extrazellulären Elementarkörperchen und intrazellulär vorkommenden, metabolisch aktiven Retikularkörperchen dürfte dazu beitragen, dass sich diese Erreger weitgehend dem Zugriff der Abwehrmechanismen des Wirtes entziehen (STAMM et al. 2000).

In Anbetracht dieser genannten Abwehrstrategien ist es beeindruckend zu sehen, wie effektiv stimulierte humane Blutplättchen die Bakterien zu schädigen vermögen. Selbst die gegen extreme osmotische Bedingungen resistenten *B. subtilis* zeigen im elektronenmikroskopischen Bild schwere strukturelle Schäden. Die Koinkubation mit stimulierten Plättchen führt bei allen untersuchten Bakterien zu Anschwellungen der äußeren Membran, zu Verlust an inneren Strukturen, und bei *B. subtilis* auch zur Ruptur der Zellwand. Bei den Borrelien löst sich häufig die Außenmembran vom inneren Zytoplasmazyylinder ab, und Borrelien zerfallen z.T. in Gruppen von kleinen Vesikeln, die gelegentlich auch im Inneren von Plättchen zu beobachten sind. Voraussetzung für einen derartigen Abwehrerfolg ist aber stets eine adäquate Stimulierung der Plättchen; unstimulierte Plättchen stellen wahrscheinlich keinen relevanten Abwehrmechanismus dar.

Plättchen können auf unterschiedliche Weise stimuliert werden. Eine Stimulation mit dem physiologischen Agonisten Thrombin ist nicht zwingend Voraussetzung für eine Aktivierung, Thrombin ist jedoch der effektivste Stimulator. Thrombin entsteht im Organismus im Rahmen der Blutgerinnung und wirkt auch selber über proteolytische Reaktionen, u.a. auf seinen eigenen Rezeptor.

Plättchen können auch durch Endothelverletzungen, wie beim Stich der Zecke als Übertragungsvektor der Borrelien, durch Entzündungen als Reaktion des Körpers auf eindringende Pathogene oder andere Mechanismen stimuliert werden. Speziell der Stich der Zecke bringt wiederum einen weiteren Einfluss ins Spiel: Im Zeckenspeichel selbst sind gerinnungshemmende Substanzen enthalten, welche

ebenfalls auf die Blutplättchen hemmend wirken (RIBEIRO et al. 1985, SAUER et al. 1995).

In meinen Versuchen habe ich Blutplättchen auf unterschiedliche Art und Weise stimuliert. Bei der Stimulation durch Thrombin wird eine maximale Antwort der Plättchen erzielt; die Plättchen aggregieren und sezernieren den Inhalt ihrer verschiedenen Granula. Die erzielten Abtötungsraten liegen bei allen untersuchten Bakterien über 77%. Gleichzeitig wird das im Plättchenkonzentrat vorhandene Fibrinogen durch die Aktivität der Serinprotease Thrombin zu Fibrin konvertiert. Der Anteil an abgetöteten Bakterien ist stets wesentlich größer als bei der Stimulation durch den synthetischen Thrombinrezeptoragonisten SFLLRN. Dieser induziert lediglich eine Sekretion von Granulainhalt, spielt jedoch keine Rolle für Aggregation oder Gerinnung (KINLOUGH-RATHBONE et. al. 1993). Bei meinen Experimenten mit *Borrelia* konnte durch Einwirkung von SFLLRN kaum ein bakterizider Effekt gefunden werden; eine Freisetzung von gespeicherten Substanzen allein ist offensichtlich nicht für die beobachteten starken bakteriziden Wirkungen verantwortlich. Diese Aussage wird auch durch die Beobachtungen gestützt, dass die Inkubation von Bakterien mit den isolierten Überständen stimulierter Plättchen nie signifikante bakterizide Effekte erzielen konnte. Bereits in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe, bei denen *Borrelia* mit aufgereinigten Thrombozytinen inkubiert wurden, zeigte sich, dass das Abtöten der Bakterien durch isolierten Einsatz dieser plättcheneigenen Inhaltsstoffe eher unwahrscheinlich ist (WOBKER et al. 2001).

In einigen EM-Aufnahmen finden sich intakte *Borrelia*, aber auch Bakterientrümmern wie kleine Vesikel innerhalb von Hohlräumen der Plättchen. Diese Hohlräume sind meist als Komponenten des offenen kanalikulären Systems zu identifizieren. Damit wäre ein Hinweis für eine erfolgte Phagozytose gegeben, es muss aber betont werden, dass innerhalb des OCS extrazelluläres Milieu herrscht. Ob es in Blutplättchen überhaupt eine Phagozytose im klassischen Sinne gibt, wird bezweifelt; vielmehr wird eine Internalisierung von extrazellulärem Material in dieses Kompartiment als eine Membranverschiebung interpretiert, die dem typischen Spreiten von Plättchen auf Fremdoberflächen entspricht (WHITE et al. 2005).

Es ist zudem auch denkbar, dass die Bakterientrümmern erst nach extrazellulär erfolgtem Absterben des Bakteriums in das Plättchen gelangten. Gerne hätten wir

diesen Aspekt weiter verfolgt, der Vorgang war jedoch zu selten zu beobachten, um daraus belastbare Schlüsse ziehen zu können.

Im Bereich der Bindungsstellen von *B. subtilis* zeigt die Plättchenmembran oft ein gefälteltes Bild im Sinne von "ruffled membranes" als Ausdruck einer möglichen, lokal begrenzten Synthese von Sauerstoffradikalen, wie sie z.B. von neutrophilen Granulozyten und Osteoklasten bekannt ist (ROBINSON et al. 1995, KEY et al. 1994). Die mögliche Wirkung von Radikalen bei direktem Kontakt mit Bakterien veranlasste weitere Forschungen in unserer Arbeitsgruppe (Dissertation von Dorit Zander), die allerdings zeigten, dass die Anwesenheit von Sauerstoffradikalen keine entscheidende Rolle bei der Abtötung von Bakterien spielt. Anscheinend sind das Vorhandensein von Plasmaproteinen und die Aktivierung von Plättchen mittels proteolytischer Mechanismen nötig, um effektiv auf Bakterien zu wirken. In dieser Arbeit wurde die Vermutung geäußert, dass Plasmaproteine durch Thrombin gespalten und damit selbst bakterizid werden. Diese Spaltung findet bevorzugt an der Plättchenoberfläche statt (ZANDER und KLINGER 2009).

Auch in den von mir verwendeten Plättchenkonzentraten befindet sich neben zugesetzten Puffersubstanzen noch ein Rest Plasma, da die Konzentrate keine gründlichen Waschprozeduren durchlaufen. Der Anteil des Plasmas beträgt beim BC-Verfahren mindestens 30 %, bzw. zumindest 10% bei „single-donor“ Verfahren (KLINGER et al. 1996). Aus der Arbeit ZANDER und KLINGER (2009) wissen wir, dass eine maximale Bakterizidie erst ab einem Plasmaanteil von 20% in der Inkubationslösung erreicht wird.

Daß Komponenten des Blutplasmas bzw. deren Prozessierung an der Plättchenoberfläche beim Abtöten von Bakterien eine Rolle spielen könnten, wird auch durch andere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe deutlich (KLINGER und ULBRICHT 2003): Die bakteriziden Effekte waren in allen Experimenten gering, in denen entweder der Plasmaanteil durch Doppelstimulation und Waschen der Plättchen minimiert wurde oder keine Plättchenoberfläche zur Verfügung stand. Im Gegenteil, die Anwesenheit von Plättchen (im Gesichtsfeld des Beobachters) ging zumindest in den Experimenten mit *B. subtilis* und *C. pneumoniae* mit signifikant höheren Abtötungsraten einher.

Bezüglich unserer anfänglich aufgestellten Hypothesen können nun folgende Aussagen getroffen werden:

1. Thrombinstimulierte Plättchen sind in der Lage, den ubiquitär vorkommenden *Bacillus subtilis*, sowie die beweglichen *Borrelia burgdorferi* und *Borrelia garinii* abzutöten. Auch auf die mit einer Schleimkapsel umgebenen *Klebsiella pneumoniae* und die intrazellulär lebenden, im Experiment jedoch herausgelösten *Chlamydia pneumoniae* wirkten aktivierte Plättchen effektiv.
2. Die Überstände degranulierter Plättchen haben weit weniger bakterizides Potential im Vergleich zu Versuchsansätzen, bei denen komplette Plättchen und Anteile von Blutplasma zugegen sind. Der Granulainhalt der Plättchen scheint also für die beobachteten bakteriziden Effekte eine untergeordnete Rolle zu spielen.
3. Eine limitierte Stimulation von Plättchen mit dem degranulierenden Thrombinrezeptoragonisten SFLLRN führt kaum zu bakteriziden Effekten. Kokubiert man jedoch derartig degranulierte Plättchen erneut mit Bakterien und stimuliert dann mit Thrombin, lassen sich Bakterien abtöten. Die bakterizide Kompetenz dieser degranulierten Plättchen ist jedoch deutlich geringer als die primär thrombinstimulierter und granulahaltiger Blutplättchen.
4. Die direkte Nähe bzw. Bindung von aktivierten Plättchen und Bakterien hat kaum einen Einfluss auf die Bakterizidie. Lediglich bei den Experimenten mit *Bacillus subtilis* und *Chlamydia pneumoniae* fand sich eine signifikant bessere Effektivität der bakteriziden Effekte bei direktem Kontakt von Plättchen und Bakterien bei der Stimulation mit Thrombin.

Abschließend lässt sich festhalten, daß stimulierte humane Blutplättchen Bakterien aus sehr unterschiedlichen Lebensräumen und mit vielfältigen Überlebensstrategien erfolgreich bekämpfen können. Neben den Plättchen spielen dabei die Protease Thrombin sowie die Anwesenheit von Blutplasma eine zentrale Rolle. Aus anderen

Arbeiten der Arbeitsgruppe wissen wir, daß es sich dabei um hitzelabile Plasmaproteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa handelt, die vermutlich durch proteolytische Einwirkung von Thrombin in eine bakterizid wirkende Form überführt werden. Im Vergleich zu diesen Plasmaproteinen scheinen die originär im Plättchen gespeicherten Substanzen nur eine untergeordnete Rolle bei den von uns beobachteten bakteriziden Effekten zu spielen.

Daß der Plättchen-vermittelte Mechanismus der Bakterizidie auch in vivo eine Rolle spielt, wird durch etliche tierexperimentelle (BAYER et al. 1998; KUPFERWASSER et al. 2002; MERCIER et al. 2000; SULLAM et al. 1993) und klinische (CHANG et al. 2000; FELDMAN et al. 1991; KIRKPATRICK et al. 2004; SARATZIS et al. 2008) Beobachtungen bestätigt. In Anbetracht der zunehmenden Probleme mit multiresistenten Keimen wäre es sicher interessant, diesen Mechanismus näher aufzuklären und in Analogie zur Anwendung von in Plättchen gespeicherten Wachstumsfaktoren auch deren mikrobiozides Potential zu nutzen. Die enge Interaktion mit Thrombin und damit Einbindung in das Geschehen der Blutgerinnung wird aber eine artifizielle Nachnutzung dieses Mechanismus schwieriger gestalten als die relativ simple Applikation von granulär gespeicherten Wachstumsfaktoren. Denkbar wäre aber z.B. eine in vitro-Vorbehandlung der inaktiven Plasmaproteine mit Thrombin, um die proteolytischen Prozesse nachzuahmen, die unter physiologischen Bedingungen bei jeder Verletzung des Endothels an der Oberfläche stimulierter Plättchen ablaufen und schließlich auch zur lokal begrenzten, explosionsartigen Generierung von Thrombin führen.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Neben ihrer klassischen Funktion bei der Blutungsstillung sind Blutplättchen auch an Entzündungs- und Abwehrreaktionen beteiligt. Als erste Blutkörperchen, die schnell und in großer Zahl an jeder Verletzungsstelle akkumulieren, starten sie die unspezifische Abwehr gegen eindringende Pathogene über die Internalisierung von Bakterien und die Sekretion von mikrobioziden Peptiden. Eigene Voruntersuchungen lassen noch weitere bakterizide Mechanismen vermuten. **Material und Methoden:** Um ein möglichst breites Wirkungsspektrum der Bakterizidie zu erfassen, haben wir je einen grampositiven (*Bacillus subtilis*; B.s.), gramnegativen und schleimbildenden (*Klebsiella pneumoniae*; K.p.), obligat intrazellulären (*Chlamydia pneumoniae*; C.p.) und beweglichen (*Borrelia garinii*; B29 und *Borrelia burgdorferi sensu stricto*; B31) Bakterienstamm ausgewählt. Zur qualitativen Erfassung bakterizider Effekte wurden koinkubierte Plättchen und Bakterien elektronenmikroskopisch untersucht. Quantitative Daten wurden fluoreszenzoptisch mittels einer DNA-Doppelfärbung mit LIVE/DEAD® BacLIGHT™ erhoben. Um die bakteriziden Mechanismen näher aufzuklären, haben wir verschiedene Stimulationsmodelle sowie bereits degranulierte Plättchen in den Koinkubationen eingesetzt. **Ergebnisse:** Die Koinkubation mit stimulierten Plättchen führt bei allen untersuchten Bakterien zu Anschwellung, Verlust innerer Strukturen und Ruptur. Im Bereich der Bindungsstellen von B.s. zeigt die Plättchenmembran oft ein gefälteltes Bild im Sinne von «ruffled membranes». Die alleinige Einwirkung von Überständen stimulierter Plättchen erbringt moderate Abtötungsraten (zwischen 36 und 68%), während die direkte Anwesenheit Thrombin-stimulierter Plättchen die bakteriziden Effekte stark erhöht (zwischen 77 und 91%). Auch bereits zuvor degranulierte Plättchen üben nach Stimulation mit Thrombin noch eine bakterizide Wirkung auf B.s. aus (41%).

Schlussfolgerungen: Neben der Sekretion mikrobiozider Peptide verfügen humane Blutplättchen auch über weitere Mechanismen zur Abtötung von Bakterien. Das Erscheinungsbild der Plättchenmembran an der Bakterien- Bindungsstelle lässt dabei an eine lokale Freisetzung zytotoxischer Radikale denken; möglich ist aber auch eine proteolytische Umwandlung von Plasmaproteinen in bakterizide Peptide.

Summary

Background: Besides their classical functions in hemostasis, blood platelets actively contribute to inflammatory and defense reactions. As the first cellular elements that accumulate at any site of injury to the vascular wall, platelets start the innate host defense against any invading pathogens by means of internalization of bacteria and secretion of microbicidal peptides. Our own observations suggest that there are further platelet defense capabilities. **Material and Methods:** Gram-positive (*Bacillus subtilis*; B.s.), Gram-negative (*Klebsiella pneumoniae*; K.p.), intracellular (*Chlamydia pneumoniae*; C.p.) and mobile (*Borrelia garinii*; B29 und *Borrelia burgdorferi sensu stricto*; B31) bacteria were included in our study. Morphological aspects of bactericidal effects were investigated by transmission electron microscopy, and bacterial killing rates were determined by fluorescence double labeling of bacteria with LIVE/DEAD® BacLight™. Bacteria were co-incubated with stimulated platelets or with stimulated, previously degranulated platelets, or were exposed to supernatants from stimulated platelets. **Results:** When co-incubated with stimulated platelets, bacteria from all three strains displayed swelling, loss of internal structures, and rupture of the cell wall. At binding sites of B.s., the platelet membrane often showed a ruffled appearance. Exposure to supernatants from stimulated platelets yielded moderate killing rates (from 36 to 68%), whereas killing rates strongly increased if stimulated platelets were co-incubated instead (from 77 to 91%). Even degranulated platelets exerted bactericidal effects on B.s. (41%) if stimulated with thrombin. **Conclusions:** Besides the release of microbicidal peptides, human platelets also have additional mechanisms to kill invading bacteria. Since ruffled membranes are indicative for release of reactive oxygen species, platelets seem to contribute to antimicrobial host defense by a local release of free radicals, or by proteolytic processing of plasma proteins into bactericidal compounds.

6 Literaturverzeichnis

Aas KA, Gardner FH. Survival of blood platelets labeled with chromium. J Clin Invest. 37 (9), 1257-68 (1958)

Alugupalli KR, Michelson AD, Barnard MR, Robbins D, Coburn J et al. Platelet activation by a relapsing fever spirochaete results in enhanced bacterium-platelet interaction via integrin α IIb β 3 activation. Mol Microbiol. 39 (2), 330-340 (2001)

Azevedo EC, Rios EM, Fukushima K and Campos-Takaki GM. Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*. Appl Biochem Biotechnol 42, 1-7 (1993)

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

Barrington R, Zhang M, Fischer M, und Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. Immunol Rev. 180, 5-15 (2001)

Bayer AS, Cheng D, Yeaman MR, Corey GR, McClelland RS et al. In vitro resistance to thrombin-induced platelet microbicidal protein among clinical bacteriemic isolates of *Staphylococcus aureus* correlates with an endovascular infectious source. Antimicrob Agents Chemother. 42 (12), 3169-3172 (1998)

Bernhardt J. *Bacillus subtilis*.
<http://microbio1.biologie.uni-greifswald.de:8080/institute/85/>; (2000)

Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, Kruger SF, und Furie B. Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. N Engl J Med. 305 (5), 242-248 (1981)

Blomback B, Blomback M, Hessel B, und Iwanaga S. Structure of N-terminal fragments of fibrinogen and specificity of thrombin. Nature. 215 (109), 1445-1448 (1967)

Bout D, Joseph M, Pontet M, Vorng H, Deslee D, und Capron A. Rat resistance to schistosomiasis: platelet-mediated cytotoxicity induced by C-reactive protein. Science. 231 (4734), 153-156 (1986)

Burak S, Mechanismen, durch die *Klebsiella pneumoniae* zum Erreger nicht beherrschbarer nosokomialer Infektionen werden kann. Dissertationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (2007)

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)

Cheung AL, Krishnan M, Jaffe EA, und Fischetti VA. Fibrinogen acts as a bridging molecule in the adherence of *Staphylococcus aureus* to cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 87 (6), 2236-2245 (1991)

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

Clawson CC und Repine JE. Proceedings: Products of platelet aggregation and release as a chemotactic factor for human leucocytes. *Thromb Diath Haemorrh.* 34 (2), 603 (1975)

Clawson CC, White JG, und Herzberg MC. Platelet interaction with bacteria. VI. contrasting the role of fibrinogen and fibronectin. *Am J Hematol.* 9 (1), 43-53 (1980)

Clemetson KJ, Clemetson JM, Proudfoot AE, Power CA, Baggiolini M, und Wells TN. Functional expression of CCR1, CCR3, CCR4, and CXCR4 chemokine receptors on human platelets. *Blood.* 96 (13), 4046-4054 (2000)

Cognasse F, Hamzeh H, Chavarin P, Acquart S, Genin C, Garraud O. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol Cell Biol.* 83,196–198 (2005)

Cosgrove LJ, d'Apice AJ, Haddad A, Pedersen J, McKenzie IF. CR3 receptor on platelets and its role in the prostaglandin metabolic pathway. *Immunol Cell Biol* 65 (6), 453-460 (1987)

Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, und Lefkowitz RJ. Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem.* 60, 653-688 (1991)

Donaldson DM, Roberts RR, Larsen HS, und Tew JG. Interrelationship between serum betalysin, lysozyme, and the antibody-complement system in killing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 10 (3), 657-666 (1974)

Donaldson DM und Tew JG. beta-Lysin of platelet origin. *Bacteriol Rev.* 41 (2), 501-513 (1977)

Entelmann M. Freisetzungsreaktionen stimulierter Thrombozyten sowie ihre Bedeutung für Allergien und Entzündungen, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Medizinische Universität zu Lübeck, Diss. (1996)

Errington J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiol Rev.* 57 (1), 1-33 (1993) Review

Faruqi TR, Weiss EJ, Shapiro MJ, Huang W, und Coughlin SR. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function. *J Biol Chem.* 275 (26), 19728-19734 (2000)

Fearon DT, Kelsoe G, Kinet J-P, MacLennan I, Parham P, und Rajewsky K. Komplement. In: Janeway C A und Travers P, editors. Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 317-335 (1997)

Feldman C, Kallenbach JM, Levy H, Thorburn JR, Hurwitz MD, und Koornhof HJ. Comparison of bacteraemic community-acquired lobar pneumonia due to *Streptococcus pneumoniae* and *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *Respiration*. 58 (5-6), 265-270 (1991)

Fodor J. Die Fähigkeit des Blutes Bakterien zu vernichten. *Dtsch Med Wochenschau* 13, 745-747 (1887)

Francis CW, Markham RE, Jr., Barlow GH, Florack TM, Dobrzynski DM, und Marder VJ. Thrombin activity of fibrin thrombi and soluble plasminic derivatives. *J Lab Clin Med*. 102 (2), 220-230 (1983)

Fresenius M, Heck M. Repetitorium Intensivmedizin, Springer, Heidelberg, 3. Auflage, 481-484 (2007)

Garrity GM. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York 2. Auflage (2005)

Gentry PA. The mammalian blood platelet: its role in haemostasis, inflammation and tissue repair. *J Comp Pathol*. 107 (3), 243-270 (1992) Review

Hartwig JH. Platelet Structure. In: Michelson AD, editors. Platelets. San Diego: Elsevier Science 37-52 (2002)

Haferkamp I, Trentmann O. Laborjournal, Universität Kaiserslautern 7-8 (2008)

Hahn H, Kaufmann SHE. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer, 6. Auflage, 416ff. (2007)

Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev*. 7 (1), 52-62 (1993)

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)

Hirsch JG. Comparative bactericidal activities of blood serum and plasma serum. *J Exp Med*. 112, 15-22 (1960)

Höll K. Wasser: Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung. de Gruyter, 8. Auflage 360ff (2002)

Hoffman M, Monroe DM. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thromb Haemost*. 85, 958-965 (2001)

- Hollenberg MD, Compton SJ. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 54 (2), 203-217 (2002)
- Holmsen H. Platelet metabolism and activation. *Semin Hematol.* 22 (3), 219-240 (1985)
- Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 30, 119-134 (1979)
- Kaufmann SHE. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer, 4. Auflage (2004)
- Key LL, Wolf WC, Gundberg CM, Ries WL. Superoxide and bone resorption. *Bone* 15, 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 (6), 1019-1023 (1993)
- Klinger MHF. Platelets and inflammation. *Anat Embryol.* 196, 1-11 (1997)
- Klinger MHF, Jelkmann W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokin Res.* 22, 913-922 (2002)
- Klinger MHF, Josch M, Klüter H. Platelets stored in a glucose-free additive solution or in autologous plasma - an ultrastructural and morphometric evaluation. *Vox Sang.* 71 (1), 13-20 (1996)
- Klinger MHF, Ulbricht T. Participation of Human Blood Platelets in Antimicrobial Host Defense. *Transf Med Hemother* 30:57-62 (2003)
- Klotz SA, Harrison JL, und Misra RP. Aggregated platelets enhance adherence of *Candida* yeasts to endothelium. *J Infect Dis.* 160 (4), 669-677 (1989)
- Krijgsveld J, Zaat SA, Meeldijk J, van Veelen PA, Fang G, Poolman B, Brandt E, Ehlert JE, Kuijpers AJ, Engbers GH, Feijen J, Dankert J. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem.* 275 (27), 20374-20381 (2000)
- Koger P. Sporen und Sporizide – der besondere Zweikampf im Sterilbereich. *Steriltechnik*, GIT Verlag Darmstadt 1,29–32 (2003)
- Kupferwasser LI, Yeaman MR, Shapiro SM, Nast CC, Bayer AS. In vitro susceptibility to thrombin-induced platelet microbicidal protein is associated with reduced disease progression and complication rates in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis: microbiological, histopathologic and echocardiographic analyses. *Circulation.* 105 (6), 746-752 (2002)
- Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; Georg Thieme Verlag Stuttgart 4. Auflage, 654ff (2008)

- Levy O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: templates for novel antimicrobial agents. *Blood* 96 (8), 2664-2672 (2000)
- Lewis JC, Maldonado JE, Mann KG: Phagocytosis in human platelets: Localization of acid phosphatase- positive phagosomes following latex uptake. *Blood* 47, 833-840 (1976)
- Liu LW, Vu TK, Esmon CT, und Coughlin SR. The region of the thrombin receptor resembling hirudin binds to thrombin and alters enzyme specificity. *J Biol Chem.* 266 (26), 16977-16980 (1991)
- Maass M, Gieffers J, Krause E, Engel PM, Bartels C, Solbach W. Poor correlation between microimmunofluorescence serology and polymerase chain reaction for detection of vascular *Chlamydia pneumoniae* infection in coronary artery disease patients. *Med Microbiol Immunol.* 187 (2), 103-106 (1998)
- Mannaioni PF, Di Bello MG, und Masini E. Platelets and inflammation: role of plateletderived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflamm Res.* 46 (1), 4-18 (1997)
- Mercier RC, Rybac MJ, Bayer AS, Yeaman MR. Influence of platelets and platelet microbicidal protein susceptibility on the fate of *Staphylococcus aureus* in an in vitro model of infective endocarditis. *Infect Immun.* 68 (8), 4699-4705 (2000)
- Meseguer J, Esteban MA, und Rodriguez A. Are thrombocytes and platelets true phagocytes? *Microsc Res Tech.* 57 (6), 491-497 (2002)
- Michelson A (ED), Platelets. Academic Press, New York (2002)
- Nachman RL, Weksler B. The platelet as an inflammatory cell. *Ann N Y Acad Sci.* 201, 131-137 (1972)
- Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med.* 161 (2), 332-44 (1985)
- Robert-Koch-Institut: Erkrankungen an Lyme-Borreliose im Jahr 2004. Analyse auf der Basis der Meldedaten der 6 östlichen Bundesländer. *Epid Bull* 20, 84-85 (2005)
- Robinson JM, Badwey JA. The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view. *Histochem Cell Biol* 103, 163-180 (1995)
- Roth GJ. Platelets and blood vessels: the adhesion event. *Immunol Today.* 13, 100-105 (1992)
- Ross MH, Pawlina W, Histology 5th edition, Lippincott, Williams and Wilkins, 2006
- Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC. Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol.* 40, 245-267 (1995)

- 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. *J Extra Corpor Technol.* 40 (1), 52-56 (2008)
- Savage B, Shattil SJ, und Ruggeri ZM. Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein(integrin alpha IIb Beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 267 (16), 11300-11306 (1992)
- Schäfer H, Borreliose, <http://www.lymeborreliose.de> (2005)
- Schmidt RF, Lang F, Thews G. *Physiologie des Menschen.* 29. Auflage. Springer (2004)
- Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M, Korting HC. Human defensins. *J Mol Med* (2005)
- Sherry S, Troll W. The action of thrombin on synthetic substrates. *J Biol Chem.* 208 (1), 95-105 (1954)
- Stamm WE. Potential for antimicrobial resistance in *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis.* 181 (3), 456-459 (2000)
- Sullam PM, Frank U, Yeaman MR, Tauber MG, Kaplan C, Berche P. Human platelet aggregation by *Yersinia pseudotuberculosis* is mediated by invasin. *Infect Immun Dis.* 168 (4), 910-914 (1993)
- Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70 (12), 6524-6533 (2002)
- Tolentino AR, Bahou WF: Thrombin Receptors. In: Michelson AD, editor. *Platelets.* 117- 138, London, Academic Press, 2002
- Toy PT, Lai LW, Drake TA, und Sande MA. Effect of fibronectin on adherence of *Staphylococcus aureus* to fibrin thrombi in vitro. *Infect Immun.* 48 (1), 83-86 (1985)
- 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)
- Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med.* 344 (14), 1058-1066 (2001)
- Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med.* 344 (15), 1140-1144 (2001)
- Weiss C, Jelkmann W. Funktionen des Blutes. In: Schmidt RF und Thews G, editors. *Physiologie des Menschen.* Springer 422-460 (1990)
- Weksler BB. Platelets. In: Gallin J, Goldstein I, und Snyderman R, editors. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates.* New York: Raven Press; 543-557 (1992)

White JG. Identification of platelet secretion in the electron microscope. *Sem Haematol.* 6, 429-459 (1973)

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

Wobker C, Klinger MHF. Die Beteiligung humaner Blutplättchen an der unspezifischen Abwehr - Untersuchungen an verschiedenen Borrelienstämmen. *FOCUS MUL* 18 (2), 91-98 (2001)

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

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

Yeaman MR, Tang YQ, Shen AJ, Bayer AS, und Selsted ME. Purification and in vitro activities of rabbit platelet microbicidal proteins. *Infect Immun.* 65 (3), 1023-1031 (1997)

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

Youssefian T, Drouin A, Masse JM, 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, 4021-4029 (2002)

Zander DMW, Klinger MHF. The blood platelets contribution to innate host defense – What they have learned from their big brothers. *Biotechnol. J.* 4, 914–926 (2009)

7 Danksagung

Ich danke meiner Frau für ihr Verständnis für viele Abende, die ich zum Erstellen dieser Arbeit vor dem Computer verbrachte.

Dank an meine Eltern für die stets beigebrachte Unterstützung während meiner Promotionsarbeit und meiner Studiengänge Medizin und Zahnmedizin und die unermüdlichen Erinnerungen meines Vaters, der mich nie vergessen ließ, dass da noch eine Doktorarbeit „auf mich wartet“.

Besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. med. Matthias Klinger für die Bereitstellung des Themas und die bereitwillige Hilfestellung und Beantwortung fast aller an ihn herangetragenen Fragen. Trotz seines oft sehr engen Terminplans nahm er sich stets kurzfristig Zeit für mich.

Danke an Jutta Endler und Kerstin Fibelkorn für die Einbettung der Proben und die Hilfe am Elektronenmikroskop.

Danke an Tine Asmus für die Arbeit mit den Bakterien am Fluoreszenzmikroskop.

Danke auch an Dr. med. Carola Clasing und Dr. med. vet. Dorit Zander für die Hilfe bei formalen und fachlichen Fragen bezüglich der Erstellung einer Dissertation.

Danke an die Mitarbeiter der Blutspende, die unermüdlich dafür sorgen, dass sowohl die Krankenhäuser, als auch Forschungslabors ständig Nachschub an frischem Blutbestandteilen erhalten. Danke an die Blutbank der Medizinischen Universität zu Lübeck für das Bereitstellen der Plättchen.

Danke auch an Dr. med. Regine Kämmerer und Priv. Doz. Dr. med. Jens Gieffers für die Hilfestellung beim Umgang mit den Bakterien.

Danke an Prof. Dr. Harald Klüter und Priv. Doz. Dr. Peter Schlenke für die Hilfestellung beim Umgang mit den Blutprodukten.

Danke an alle Motivationshelfer.

8 Lebenslauf und Publikationen

Name: Tobias Ulbricht
Geburtsdatum: 01. November 1975
Geburtsort: Brandenburg an der Havel
Familienstand: verheiratet

Schulausbildung

1981-1990	Grundschule	Joliot-Curie-Oberschule, Brandenburg
1990-1995	Gymnasium	Bertolt-Brecht-Gymnasium, Brandenburg
1995	Abitur	

Zivildienst

1995-1996 Diakonie Sozialstation, Brandenburg

Hochschulausbildung

10/1996 – 10/2002	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
09/1999	1. Staatsexamen
10/2001	2. Staatsexamen
11/2002	3. Staatsexamen
10/2002-03/2006	Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
03/2006	Staatsexamen Zahnmedizin
1999-2003	Experimenteller Teil der Doktorarbeit im Institut für Anatomie der Medizinischen Universität zu Lübeck

Beruf

Seit 08/2004 Assistenzarzt in der Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie der Medizinischen Universität zu Lübeck, Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Peter Sieg

Publikationen und Vorträge

Ulbricht T, Klinger MHF: Bactericidal effects of stimulated human blood platelets on Gram-negative bacteriae. Vortrag auf dem 10. Treffen der Ostsee-Anatomen, Kiel, 16.6.2000; Ann Anat 183:187 (2000)

Klinger MHF, Ulbricht T. Participation of Human Blood Platelets in Antimicrobial Host Defense. Transf Med Hemother 30:57-62 (2003)