

**Aus dem Institut für Biochemie und Pathobiochemie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Prof. Dr. med. Ulrich Walter**

**Aktivierung humaner Thrombozyten durch Streptokokken der Gruppe B:  
Molekulare Mechanismen und pathophysiologische Bedeutung**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Catharina Sophie Dornieden  
aus Vechta**

**Würzburg, August 2009**

**Referent: Prof. Dr. med. Martin Eigenthaler**

**Koreferent: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 11. März 2010**

**Die Promovendin ist Ärztin.**

**Meinen Eltern**

## **Publikationen**

Die Ergebnisse des „Pilot“-Versuches sind bereits veröffentlicht worden:

Siauw, C., Kobsar, A., Dornieden, C., Beyrich, C., Schinke, B., Schubert-Unkmeir, A., Abele-Horn, M., Speer, C.P. and Eigenthaler, M. (2006) Group B streptococcus isolates from septic patients and healthy carriers differentially activate platelet signaling cascades. *Thromb Haemost* 95(5), 836-849.

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Einführung.....	1
1.2	Thrombozyten – Physiologie und Pathophysiologie.....	2
1.3	Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Thrombozyten .....	8
1.4	Streptokokken .....	11
1.5	Wechselwirkungen zwischen Streptokokken und Thrombozyten.....	13
1.6	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Antikörper und Inhibitoren .....	16
2.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	17
2.3	Puffer und Lösungen.....	19
2.4	Geräte, Software .....	21
2.5	Präparation humaner Thrombozyten.....	21
2.6	B-Streptokokken – Stämme und Kultur .....	23
2.7	Aggregationsversuche .....	24
2.8	Durchflusszytometrie.....	25
2.9	Thromboxansynthese.....	26
2.10	Western Blot .....	26
3	Ergebnisse .....	30
3.1	„Pilot“-Versuch .....	30
3.1.1	Aggregationsverhalten .....	30
3.1.2	P-Selektin-Expression.....	31
3.1.3	Thromboxan-A <sub>2</sub> -Synthese.....	31
3.1.4	Fibrinogenbindung .....	32
3.1.5	Aktivierung unterschiedlicher Signalwege.....	32
3.2	Aggregationsversuche mit verschiedenen GBS-Stämmen .....	35
3.2.1	Septische Stämme.....	35
3.2.2	Kolonisierende Stämme.....	37
3.2.3	Meningitisstämme .....	39
3.2.4	Letale Stämme.....	41

3.2.5	GBS aus Vaginalabstrichen .....	43
3.2.6	GBS aus Ohrabstrichen .....	45
3.2.7	GBS aus Magensaft.....	47
3.3	Aktivierung unterschiedlicher Signalwege.....	49
3.4	Thrombozytenaggregation durch GBS unter Zusatz von ADP .....	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Aggregation durch Bakterien.....	54
4.2	Aggregationsverhalten durch verschiedene GBS-Stämme .....	55
4.3	CD62P-Expression, Thromboxansynthese und Fibrinogenbindung...	56
4.4	Aktivierung unterschiedlicher Signalwege.....	57
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis .....	62
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	78

## Abkürzungen:

°C	Grad Celsius
%	Prozent
AC	Adenylatzyklase
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
B. burgdorferi	Borrelia burgdorferi
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaMK II	Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II
CD62E	E-Selektin
CD62L	L-Selektin
CD62P	P-Selektin
COX-1	Zyklooxygenase 1
C. perfringens	Clostridium perfringens
DAG	Diacylglycerin
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
E. coli	Escheria coli
EfB	Extrazelluläres Fibrinogen bindendes Protein
ESPED	Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland
FbsA	Fibrinogenbindeprotein
FcγRIIA	thrombozytärer Fc-γ-Rezeptor IIA
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s <sup>2</sup>
GBS	Streptokokken der Gruppe B
Glc	Glucose
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
H. pylori	Helicobacter pylori

Ig	Immunglobulin
ITP	ideopathische thrombopenische Purpura
JNK/SAPK	c-Jun-Amino-terminale Kinase/Stress-aktivierte Protein-kinase
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LDL	Low density proteins
kDa	Kilodalton
m, cm, µm, nm	Meter, Zentimeter, Mikrometer, Nanometer
M, mM, µM	Mol, Millimol, Mikromol
MARCKS	Myristolated alaninreiches PKC-Substrat
min	Minute
MLC, MLCK	Myosinleichtketten, Myosinleichtkettenkinase
P38MAPK	p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase
PAAP	platelet aggregation-associated protein
PAI-1	Antithrombinaktivatorinhibitor Typ 1
PBS	Phosphate buffered saline
PI-3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKB/Akt	Proteinkinase B (Gen: Akt)
PLC, PLCγII	Phospholipase C, Phospholipase CγII
PKC	Proteinkinase C
PMP	Thrombozytäres mikrobizides Protein
PPP	Plättchenarmes Plasma (platelet-poor plasma)
PRP	Plättchenreiches Plasma (platelet-rich plasma)
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.	Streptococcus
S. aureus	Staphylokokkus aureus
ScIA	streptococcal collagen-like surface protein
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler

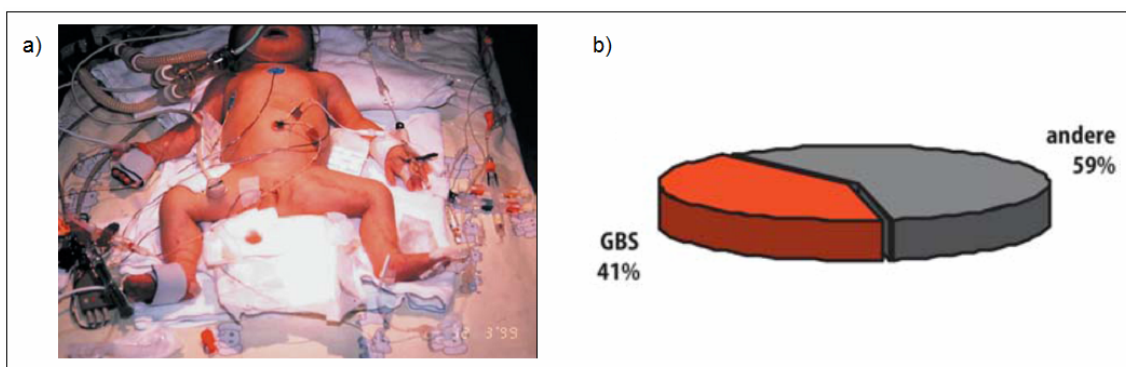


TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamine
tPMP	Thrombin induziertes thrombozytäres mikrobizides Protein
v	Volumen (volume)
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
w	Gewicht (weight)
vWF	Von-Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Infektionen mit Streptokokken der Gruppe B (GBS) sind immer noch die häufigste Ursache für early-onset Erkrankungen des Neugeborenen in den Industrieländern (Luck et al. 2003). Early-onset Infektionen zeichnen sich durch den Krankheitsbeginn in den ersten Lebenstagen aus und verlaufen fulminant als Meningitis und Sepsis mit petechialen Einblutungen, thromboembolischen Ereignissen, verschiedenen inflammatorischen Reaktionen bis hin zum septischen Schock (Speer 2005). Bei den erkrankten Neugeborenen führt dies zu einer beachtlichen neonatalen Morbidität, zu einer erhöhten Mortalität und längerfristig zu neurologischen Spätkomplikationen (Puopolo et al. 2005). Die Inzidenz einer early-onset Erkrankung beträgt dabei 3 - 6 Infektionen auf 1000 Geburten (Luck et al. 2003). In der Regel beruht der Infektionsweg auf einer Übertragung des Keims von der Mutter auf das Neugeborene. Eine symptomlose Besiedlung des Vaginaltraktes mit GBS findet sich bei 15 - 35 % aller Schwangeren und steht dabei im klaren Gegensatz zur niedrigen Häufigkeit der Erkrankungen beim Neugeborenen (Taylor et al. 2002). Diese vordergründige Diskrepanz lässt sich aber unter anderem durch den unterschiedlichen Reifegrad der Neugeborenen und die unterschiedliche Pathogenität einzelner Streptokokkenstämme erklären.



**Abbildung 1: a) Klinisches Bild einer GBS-Infektion und b) prozentualer Anteil von GBS an der early-onset Sepsis (Berner 2003)**

Ein präventiver Ansatz stellt die sogenannte intrapartale Chemoprophylaxe mit einem Antibiotikum dar. Die erste Wahl hierbei sind initial 5 Millionen Einheiten Penicillin G intravenös, darauf folgen 2,5 Millionen Einheiten alle 4 Stunden bis zur Geburt (Schrag et al. 2002). Diese Antibiotikaprofylaxe ist dann indiziert, wenn GBS im Urin nachgewiesen werden kann oder wenn Risikofaktoren bestehen. Risikofaktoren hierbei sind ein unbekannter GBS-Status sechs Wochen vor dem Geburtstermin und entweder Schwangerschaftsalter unter 37 Wochen oder Blasensprung 18 Stunden oder mehr vor der Geburt oder mütterliche Temperatur von 38°C oder höher. Weiterhin zählen eine positive GBS-Kultur zwischen der 35. und 37. Schwangerschaftswoche und ein vorheriges Neugeborenes mit einer GBS-Infektion dazu (Apgar et al. 2005). Besonders erhöhen also Frühgeburtlichkeit, frühzeitiger Blasensprung oder eine Chorioamnionitis das Risiko einer von GBS verursachten early-onset Sepsis (Benitz et al. 1999). Bei jedem Infektionsfall weisen die klinischen Symptome der septikämischen Erkrankung auf eine pathophysiologische Beteiligung des Gerinnungssystems hin.

## **1.2 Thrombozyten – Physiologie und Pathophysiologie**

Die Existenz von Thrombozyten oder Blutplättchen wurde 1882 erstmals von dem italienischen Pathologen Guilo Bizzozero beschrieben (Ribatti et al. 2007, Dyke 1924). Mit einem Durchmesser von 2 – 4  $\mu\text{m}$  sind die Thrombozyten die kleinsten korpuskulären Bestandteile des zirkulierenden Blutes und haben im Ruhezustand eine typisch diskoide Form mit einer Oberfläche von 8  $\mu\text{m}^2$ . Ihre physiologische Konzentration im Blut beträgt 150000 bis 300000 pro  $\mu\text{l}$ . Nachdem die Thrombozyten durch Abschnürung aus den Megakaryozyten im Knochenmark entstanden sind, haben sie eine durchschnittliche Überlebenszeit von 7 bis 10 Tagen und werden schließlich in der Leber und in der Milz abgebaut (Gawaz 1999). Die Thrombozyten besitzen keinen Zellkern, enthalten aber RNA in geringen Mengen und sind somit in gewissen Maßen dazu fähig, auf physiologische Stimuli mit einer Proteintranslation zu antworten (Macaulay et al. 2005).

Die Thrombozyten spielen in der primären Blutstillung (Hämostase) eine zentrale Rolle (Moore 1984). Wenn ein Blutgefäß verletzt ist, sorgen sie schnell dafür, die Blutung zu stillen und den Blutverlust zu stoppen (Holmsen 1989, Troup und Luscher 1962). Durch den Gefäßschaden kommen die Thrombozyten mit der subendothelialen extrazellulären Matrix in Kontakt, die aus Kollagen, Elastin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Thrombospondin, Mukopolysacchariden, Fibrinogen und Fibrin besteht. Die Blutplättchen adhären schnell an diese Matrixproteine, werden aktiviert, verändern ihre Form und aggregieren, um die Wunde zu verschließen (Williams et al. 1995). Verschiedene Glykoproteine (GP) in der Plasmamembran der Thrombozyten sind bei der Adhäsion und der Aggregation von erheblicher Bedeutung. Die Integrine, der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor GP Ib-IX-V und der Fibrinogenrezeptor GP IIb-IIIa, sind dabei durch ihre Interaktion mit vWF und Fibrinogen besonders wichtig (Schmugge et al. 2003). Bindet vWF an GP Ib-IX-V, führt dies intrazellulär zu einer Signalkaskade, die unter anderem eine Konformationsänderung des GP IIb-IIIa in einen aktivierten Zustand bewirkt. Der aktivierte Fibrinogenrezeptor kann nun neben Fibrinogen auch vWF, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin binden, diese Prozesse sind Teil der Thrombozytenaktivierung (Troxler et al. 2007, Ni et al. 2003). Sowohl durch die oben genannten Matrixbestandteile, aber auch durch lösliche Agonisten wie ADP, Thrombin oder Thromboxan werden die Thrombozyten aktiviert. Bei der Aktivierung finden in den Thrombozyten verschiedene Prozesse statt. Es werden sowohl Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise der Fibrinogenrezeptor aktiviert als auch verschiedene regulierende intrazelluläre Signalwege aktiviert oder gehemmt. Weiterhin steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration und bewirkt so eine Formveränderung der Thrombozyten („shape change“) durch das kontraktile Aktin-Myosin-System mit Pseudopodienbildung und Spreizung. Schließlich werden auch die intrazellulären Granula ausgeschüttet, dies wird als Sekretion bezeichnet (Gawaz 1999). Die Thrombozyten enthalten drei verschiedene Formen von Granula (Bang und Wilson 1999). Die dichten Granula sind nach ihrer elektronenmikroskopischen Dichte benannt und bestehen aus ADP, ATP,

Serotonin und Calcium. Die Ausschüttung dieser Bestandteile ist in erster Linie für die Thrombozytenaggregation von Bedeutung (Wu 1996). Die  $\alpha$ -Granula enthalten verschiedene Proteine, die neben der Thrombozytenadhäsion und Plättchenaggregation auch an verschiedensten Prozessen, wie Chemotaxis, Proliferation und Inflammation, beteiligt sind. Die lysosomalen Granula sind mit den Lysosomen anderer Zellen vergleichbar (Bennett und Kolodziej 1992). Bei der Thrombozytenaggregation werden zwei Thrombozyten über Fibrinogenbrücken miteinander verbunden (Ruggeri und Mendolicchio 2007). Der Ablauf lässt sich in zwei Phasen aufteilen. Ein entwickelnder Thrombus ist initial fragil und kann durch den Blutstrom wieder aufgelöst werden. Durch die prokoagulatorische Aktivität der Plättchen wird der fragile Thrombus schließlich mit einem Fibrinnetz stabilisiert (Andrews et al. 1990).

P-Selektin (CD62P) ist neben E- und L-Selektin (CD62E und CD62L) ein Teil der Selektinfamilie von Adhäsionsrezeptoren, die die Bindung an spezifische Kohlenhydrate enthaltende Liganden vermitteln (Ley 2003). So mediierten sie die Adhäsion zwischen Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen (Polgar et al. 2005). E-Selektin befindet sich auf zytokinaktivierten Endothelzellen und vermittelt die Granulozytenadhäsion, während L-Selektin an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen beteiligt ist. L-Selektin findet man konstitutiv auf Leukozyten und es wird bei der Aktivierung von der Leukozytenoberfläche abgeschert (Gawaz 1999). P-Selektin kommt in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen vor (McEver et al. 1989, Kansas 1996). Als Antwort auf inflammatorische Stimuli wird P-Selektin innerhalb von Sekunden aus den Weibel-Palade-Körperchen auf die Endotheloberfläche exprimiert (Frenette et al. 1998). Das thrombozytäre GP Ib, ein Teil des von-Willebrand-Faktor-Rezeptors GP Ib-IX-V, ist ein Rezeptor für P-Selektin. Folglich rollen sich Thrombozyten auf aktiviertem Endothel ab. Dieses Phänomen lässt sich durch Antikörper gegen P-Selektin und GP Ib blockieren (Romo et al. 1999). Weiterhin wird der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) auf Thrombozyten präsentiert. PSGL-1 assoziiert sich mit P-Selektin und vermittelt thrombozytäres Rollen auf der

Endotheloberfläche unter erhöhten Scherkräften (Frenette et al. 2000). Ähnlich wie in den Endothelzellen wird auch bei Thrombozyten nach der Aktivierung P-Selektin mit der  $\alpha$ -Granulamembran in die Zellmembran eingebaut und kann so Zelladhäsion vermitteln (Polgar et al. 2005). P-Selektin ist ein wichtiger Adhäsionsrezeptor für Leukozyten bei der Inflammation. Fehlt P-Selektin zum Beispiel in Mäusen, so können hieraus resultierende Defizite im Leukozytenverhalten nachgewiesen werden. Eine erhöhte Zahl von zirkulierenden Granulozyten, fehlendes Abrollen von Leukozyten in Mesenterialvenen und verzögerte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in den Peritonealraum bei der Inflammation sind die Folge (Mayadas et al. 1993).

Für ADP sind an Thrombozyten neben einer Bindungsstelle am GP-IIb-IIIa-Komplex drei verschiedene Rezeptoren P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> bekannt (Daniel et al. 1998, Gachet 2005, Gawaz 1999). Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor ist ein Liganden-gebundener Ionenkanal, der für den schnellen Calciumeinstrom durch ATP verantwortlich ist (Vial et al. 2003; Fung et al. 2007). Insgesamt ist dieser Rezeptor unfähig, Aggregation selbst zu vermitteln (Takano et al. 1999). Es konnte aber gezeigt werden, dass er an Kollagen und Scherkraft-induzierter Aggregation beteiligt ist (Toth-Zsomboki et al. 2003; Hechler et al. 2003). So spielt er eine Rolle bei Thrombusbildung in kleinen Arterien (Hechler et al. 2003). Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist an inhibitorische G-Proteine G<sub>i</sub> gekoppelt. Er vermittelt so über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) die Freisetzung von intrazellulären Calciumionen, was zu einer thrombozytären Formänderung führt (Jin et al. 1998). Wird der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor durch selektive kompetitive Antagonisten in seiner Funktion behindert, lässt sich die Aggregation durch ADP inhibieren. Dies zeigt, dass der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Aggregation spielt (Hechler et al. 1998). Genau wie der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist auch der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor an inhibitorische G-Proteine G<sub>i2</sub> gekoppelt (Ohlmann et al. 1995). Nachfolgend wird die Adenylatzyklase (AC) inhibiert (Hollopeter et al. 2001), so dass die verhinderte cAMP-Produktion keinen ursächlichen, aber einen fördernden Effekt für die Plättchenaktivierung

hat (Savi et al. 1996). Zusätzlich wird durch den geringen cAMP-Spiegel die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) verhindert, das phosphoryliert ein negativer Modulator für die Fibrinogenrezeptoraktivierung ist (Horstrup et al. 1994). Weiterhin stimuliert der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI-3K), die für die Aufrechterhaltung der Aggregation wichtig ist (Kauffenstein et al. 2001). Daneben wird auch die kleine GTPase Rap1b durch einen PI-3K-unabhängigen Mechanismus aktiviert (Larson et al. 2003). Neben der Initiation einer Aggregation durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor für eine Amplifikation der Aggregation verantwortlich (Gachet 2005). Dies erklärt auch den Einsatz von Thienopyridinen wie Clopidogrel und Ticlopidin in der antithrombotischen Therapie, die am P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor angreifen und so eine Amplifikation der Aggregation verhindern (Foster et al. 2001).

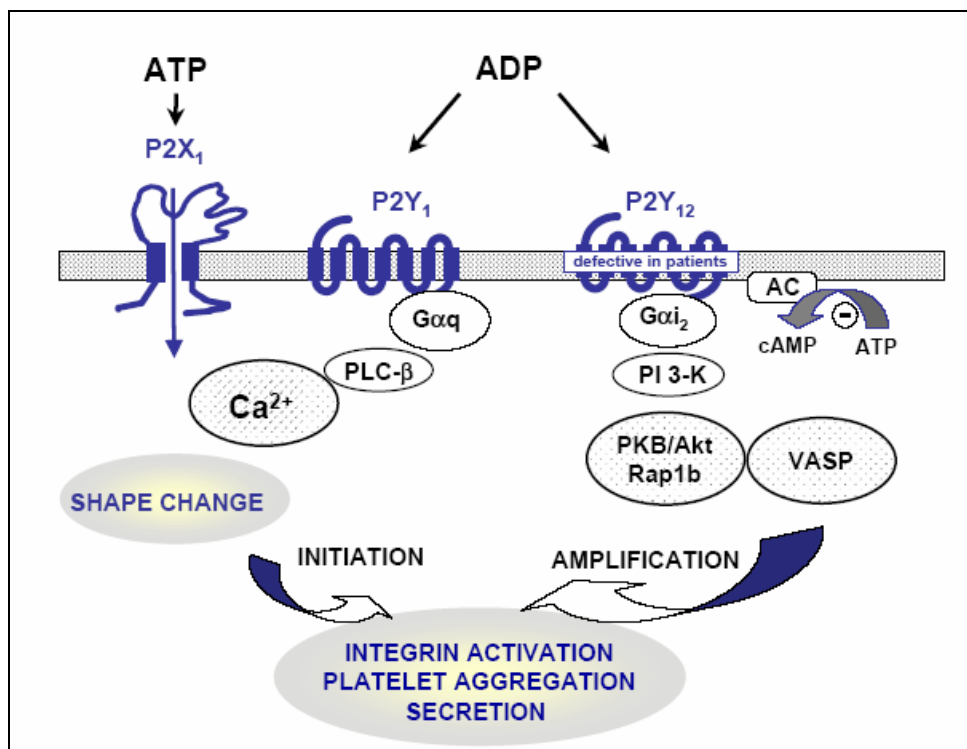


Abbildung 2: Thrombozytenaktivierung durch ADP und ATP (Gachet 2005)

Zunehmend ist es offenkundig, dass sowohl die anderen thrombozytären Signalwege als auch die Rezeptoren an Bedeutung gewinnen. Nachdem ein Ligand an den thrombozytären Fc- $\gamma$ -Rezeptor IIA (Fc $\gamma$ R1IA) bindet oder diese Rezeptoren quervernetzt werden, folgen verschiedene intrazelluläre Ereignisse wie Tyrosinphosphorylierung, Aktivierung der Phospholipase C $\gamma$ II (PLC $\gamma$ II) und Calciumsignale (Anderson und Anderson 1990, Gratacap et al. 1998). Weiterhin wird die Calcium-Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMK II) phosphoryliert und die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) aktiviert, die ihrerseits eine Phosphorylierung der Myosinleichtketten (MLC) bewirkt, was schließlich zur Thrombozytenaktivierung führt (Stull et al. 1993, Siauw et al. 2006). Dabei korreliert die MLC-Phosphorylierung im Aktin-Myosin-Zytoskelett des Thrombozyten stark mit der thrombozytären Formänderung (Daniel et al. 1983). Das Schlüsselenzym, das in diesem Signalweg an der Thrombozytenaktivierung beteiligt ist, ist PLC $\gamma$ II. Dieses aktiviert nachgeschaltet Tyrosinkinase, mit ihnen zusammen fördert es Calciummobilisation und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) mittels Secondmessenger durch die Hydrolyse von Phosphatidyl(3,4,5)-triphosphat (Gratacap et al. 1998, Rhee et al. 1997). PKC wiederum ist beteiligt sowohl an der thrombozytären Formänderung und Granulasekretion als auch an der Regulation von calcium-induzierter Thrombozytenaggregation (Dandona 1996). Weiterhin wird myristoyliertes alaninreiches PKC-Substrat (MARCKS) der Thrombozytenagonistenstimulation durch PKC phosphoryliert und kann nicht mehr an intrazelluläre Aktinfilamente binden (Elzagallaai et al. 2001). An einem weiteren Signalweg, der im Thrombozyten eine Rolle spielt, ist p38-mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) beteiligt. Diese wird durch Agonisten wie Thrombin, Thromboxan A<sub>2</sub> und ADP aktiviert und induziert eine Aktinpolymerisation im Thrombozyten (Begonja et al. 2007, Kramer 1995, Mazharian et al. 2007).



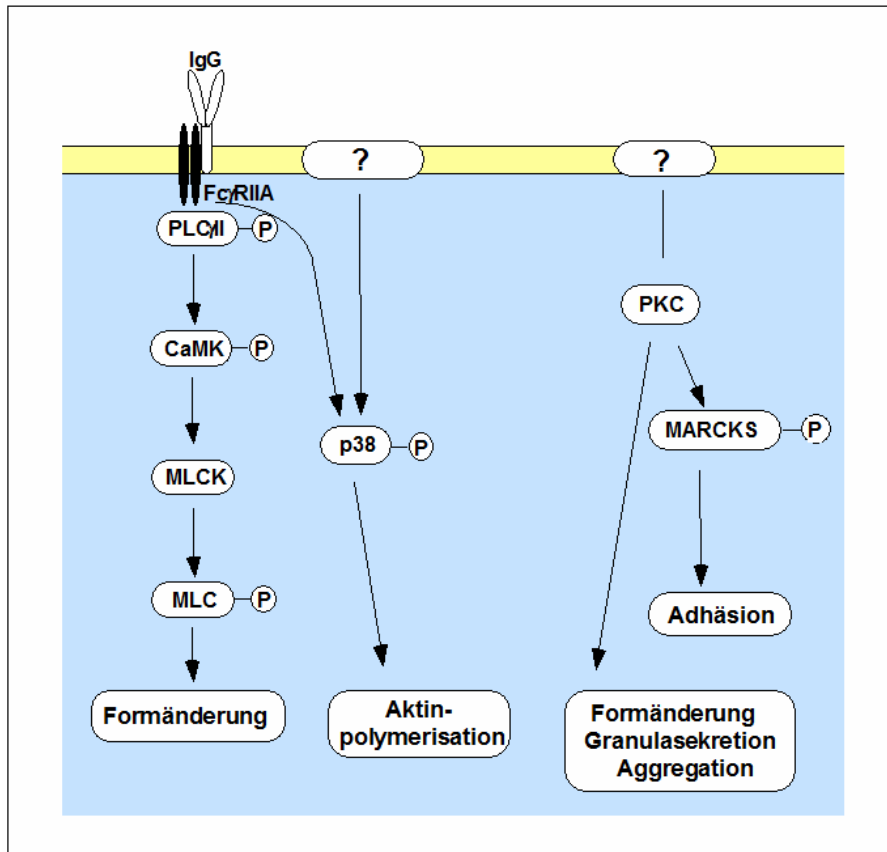


Abbildung 3: Ausgewählte Signalwege im Thrombozyten (nach Siau et al. 2006)

### 1.3 Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Thrombozyten

Bei vielen Infektionen, wie beispielsweise der Endokarditis, der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) oder der idiopathischen thrombopenischen Purpura (ITP), spielt das Gerinnungssystem in der Erkrankungspathogenese eine wichtige Rolle (Fitzgerald et al. 2006). Eine Beziehung der sekundären Hämostase und der Inflammation im Rahmen einer Infektion durch Protein C, Protein S, Antithrombin und Antithrombinaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) wurde bereits aufgezeigt (Levi et al. 2003). Auch Interaktionen der aktivierten Thrombozyten mit Endothelzellen und hämatologischen Stammzellen wurden im Hinblick auf die Pathogenese der Atherosklerose und Inflammation beschrieben (Ofosu 2002). Eine Beteiligung der primären Hämostase am Entzündungsprozess zeichnet sich durch die Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Thrombozyten aus. Diese sind charakterisiert durch die Bindung der Bakterien an die Thrombozyten. Die Interaktionen geschehen entweder

direkt durch ein bakterielles Oberflächenprotein oder indirekt sowohl durch sezernierte bakterielle Produkte als auch durch ein plasmaüberbrückendes Molekül, das an bakterielle und thrombozytäre Oberflächenrezeptoren bindet (Kerrigan et al. 2002, Bhakdi et al. 1988, O'Brien et al. 2002, Fitzgerald et al. 2006). Daraus resultiert eine Adhäsion oder eine Aktivierung der Thrombozyten, die voneinander unabhängig und durch verschiedene bakterielle Komponenten und verschiedene thrombozytäre Rezeptoren bedingt sind (Fitzgerald et al. 2006). Im folgenden sollen anhand der Bakterien *Staphylokokkus aureus* (*S. aureus*), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) und *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Beispiele für eine Interaktion mit Thrombozyten gegeben werden.

Eine der wohl am besten charakterisierten Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Bakterien ist die Interaktion mit *S. aureus*. Als häufigster Erreger von zahlreichen Infektionen, die die Haut, Weichteile, Knochen, die Lunge und das Zentralnervensystem betreffen oder durch Katheter vermittelt sein können, verursacht eine *S. aureus* Bakteriämie komplizierte Krankheitsverläufe wie eine Endokarditis (Bamberger et al. 2005). Ein Hauptvirulenzfaktor in der Pathogenese der Endokarditis ist die direkte Bindung an Thrombozyten (Sullam et al. 1996). *S. aureus* kann durch verschiedene Oberflächenproteine Thrombozytenaggregation hervorrufen. Während die Fibrinogenbindepoteine Clumping Faktor A und B und das Serin-Aspartat repetierende Protein SdrE eine Aggregation induzieren, kann das Protein A nur einen laufenden Aggregationsprozess verstärken (O'Brien et al. 2002, Siboo et al. 2001). Dafür ist das Protein A in der Lage, als Adhäsionsprotein vWF zu binden (Hartleib et al. 2000). *S. aureus* produziert weiterhin das hämolytisch wirkende Exotoxin,  $\alpha$ -Toxin (Freer et al. 1968). Dieses vermittelt durch seine Attacke an humanen Thrombozyten Blutkoagulation (Bhakdi et al. 1988). Das  $\alpha$ -Toxin bewirkt sowohl die calciumabhängige exozytotische Freigabe von Faktor V aus den  $\alpha$ -Granula des Thrombozyten mit einer begleitenden Kosekretion von Plättchen Faktor 4, als auch davon unabhängig die Eigenschaft, vermehrt externen Faktor V zu binden. Die Ansammlung von Prothrombinasekomplexen

durch diese zwei Mechanismen zählt zu der prokoagulatorischen Komponente des  $\alpha$ -Toxins (Arvand et al. 1990). *S. aureus* kann auch mindestens ein Protein erzeugen, das die Aktivierung von Thrombozyten blockiert. Das extrazelluläre Fibrinogen-bindende Protein (EfB) erhöht zwar die Fibrinogenbindung an die Thrombozyten, blockiert aber durch eine Konformationsänderung des an GP IIb-IIIa gebundenen Fibrinogens die Thrombozytenaggregation (Palma et al. 2001).

*B. burgdorferi* wird durch Zecken auf den Menschen übertragen und ist der Erreger der Lyme-Borreliose, die sich klinisch durch ein Erythema migrans, durch eine Meningoradikoneuritis und durch Akrodermatitis chronicum atrophicans äußert (Stanek und Strle 2003). Durch Bindung an den thrombozytären GP IIb-IIIa-Rezeptor, wahrscheinlich durch das Borrelien Oberflächenprotein p66, kann *B. burgdorferi* Thrombozyten aktivieren (Alugupalli et al. 2003).

*C. perfringens* ist der Erreger des Gasbrandes. Bei der Pathogenese spielt als Virulenzfaktor die Phospholipase C des Bakteriums eine bedeutende Rolle (Flores-Diaz und Alape-Giron 2003). Diese ist in der Lage, den thrombozytären GP IIb-IIIa-Rezeptor zu aktivieren und auf diese Weise eine Thrombozytenaggregation mit nachfolgenden Gefäßverschlüssen und Myonekrosen zu erzeugen (Bryant et al. 2000).

*H. pylori* kann den menschlichen Magen besiedeln und vor Ort Ulzera und Adenokarzinome des Magens verursachen (Prinz et al. 2006, Blaser und Atherton 2004). Ebenfalls ist eine Infektion mit *H. pylori* mit einigen Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder ITP assoziiert. Wird nun *H. pylori* bei ITP-Patienten eradiziert, steigen in Folge die Thrombozytenzahlen und weisen auf eine Interaktion zwischen *H. pylori* und Thrombozyten hin (Gasbarrini et al. 1998, Emilia et al. 2001).

Ein ganz anderer Aspekt der Wechselwirkung zwischen Bakterien und Thrombozyten beinhaltet die Immunabwehr gegen Bakterien. Thrombozyten können nämlich thrombozytäre mikrobizide Proteine (platelet microbial protein, PMP oder thrombin-induced PMP, tPMP) nach Stimulation durch Bakterien oder durch Agonisten entlassen (Yeaman und Bayer 1999), die lokal gegen verschiedene Bakterien wie *S. aureus* oder *Escheria coli* (*E. coli*) und Pilze wie *Candida albicans* vorgehen (Tang et al. 2002).

#### 1.4 Streptokokken

Streptokokken (*S.*) sind in Ketten angeordnete eiförmige grampositive unbewegliche Kokken ohne Sporenbildung und verdanken ihren Namen Theodor Billroth, der diese Keime erstmals 1874 im Mikroskop sah (Hof und Dörries 2005). Die Einteilung erfolgt entweder nach dem Hämolyseverhalten in  $\beta$ -Hämolyse,  $\alpha$ -Hämolyse und  $\gamma$ -Hämolyse oder nach der Antigenstruktur der Zellwand, der C-Substanz, in der Lancefeldeinteilung von A bis W (Oethinger 2004).

Vollständige oder $\beta$ -Hämolyse	A-Streptokokken ( <i>S. pyogenes</i> ) B-Streptokokken ( <i>S. agalactiae</i> , GBS) Streptokokken der Serogruppe C, F und G
Teil- oder $\alpha$ -Hämolyse	„vergrünende Streptokokken“, <i>S.</i> der Viridans-Gruppe ( <i>S. sanguis</i> , <i>S. gondii</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> und andere) Pneumokokken ( <i>S. pneumoniae</i> )
Keine oder $\gamma$ -Hämolyse	Streptokokken der Serogruppe D ( <i>Enterococcus faecalis</i> und <i>Enterococcus faecium</i> ) Nicht hämolysierende orale Streptokokken Peptostreptokokken (obligat anaerobe Streptokokken)

**Tabelle 1: Einteilung der Streptokokken nach ihrem Hämolyseverhalten (Oethinger 2004, Facklam 2002)**

Beim Menschen werden die klassischen Streptokokkenerkrankungen von A-Streptokokken, B-Streptokokken und Pneumokokken herbeigeführt. Alle anderen Streptokokken stellen nur opportunistisch pathogene Keime dar (Hof und Dörries 2005). Zu diesen gehören auch die Viridans-Streptokokken, die neben eitrigen Infektionen auch Erreger der Endokarditis sein können (Coykendall 1989).

A-Streptokokken verursachen eine breite Anzahl an menschlichen Erkrankungen, die sich in vier Hauptgruppen einteilen lassen. Oberflächliche Erkrankungen umfassen die Pharyngitis, Haut- und Weichteilinfektionen sowie die Vaginitis. Tiefe Infektionen äußern sich in Bakteriämie, nekrotisierender Faziitis, Myositis, Perikarditis, Meningitis und Pneumonien. Während Scharlach und das „streptococcal toxic shock-like syndrome“ Toxin vermittelt sind, werden das rheumatische Fieber, die akute Glomerulonephritis und die reaktive Arthritis zu den autoimmun vermittelten Erkrankungen gezählt (Efstratiou 2000, Cunningham 2000).

Pneumokokken sind eine häufige Ursache der akuten Otitis media und der Sinusitis, jedoch können sie lebensbedrohliche invasive Erkrankungen wie Meningitis, Sepsis und Pneumonie mit erhöhter Morbidität und Mortalität hervorrufen (Garcia-Suarez et al. 2006).

B-Streptokokken oder GBS wurden 1887 das erste Mal als tierpathogener Erreger der Rindermastitis beschrieben (Bisharat et al. 2004). Beim Menschen sind sie die Erreger der neonatalen Sepsis und Meningitis. Hierbei unterscheidet man die early-onset Infektionen, bei denen sich die Sepsis in den ersten Lebenstagen manifestiert und in 41 % der Fälle von GBS verursacht wird, von den late-onset Formen, die ab der 2. Lebenswoche bis zum Ende des 3. Lebensmonats auftreten (Berner 2003). Weiterhin können GBS urogenitale Infektionen und Pneumonien verursachen (Girgitzova et al. 1991, Edwards and Baker 2005). Die Differenzierung der B-Streptokokken in verschiedene Serotypen basiert auf Kapselpolysacchariden oder Zellwandproteinantigenen;

es gibt allerdings auch einige nicht typisierbare Stämme (Cleary und Cheng 2006).

### **1.5 Wechselwirkungen zwischen Streptokokken und Thrombozyten**

Über die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Streptokokkengruppen und Thrombozyten sind verschiedene Interaktionsmechanismen bereits bekannt, die allerdings nicht vollständig verstanden sind.

Der Viridans-Streptokokkenstamm *S. sanguis* kann sowohl Thrombozyten aktivieren als auch eine Aggregation auslösen (Herzberg et al. 1983). Dies wird unter anderem über eine IgG-Interaktion mit dem thrombozytären Fc $\gamma$ R1a Rezeptor vermittelt (Sullam et al. 1988). Weiterhin ist bekannt, dass Antikörper gegen thrombozytäres GP Ib, eine Untereinheit des von-Willebrand-Rezeptors, in Hinblick auf eine Thrombozytenaggregation inhibitorisch wirken (Kerrigan et al. 2002). Ebenfalls präsentiert die bakterielle Oberfläche Komplementproteine, zudem interagiert auch plasmatisches IgG mit dem thrombozytären Fc $\gamma$ R1A (Ford et al. 1996, Ford et al. 1997). Einige Stämme von *S. sanguis* präsentieren ein collagenartiges Protein PAAP (platelet aggregation-associated protein) auf ihrer Oberfläche, das die Aggregation vermittelt (Gong et al. 1995, Erickson und Herzberg 1993). *S. sanguis* beteiligt bei der Thrombozytenaktivierung zwei Signalwege mit Tyrosinphosphorylierung über Fc $\gamma$ R1A und GP IIb-IIIa (Pampolina und McNicol 2005). Ein weiterer Viridans-Streptokokkenstamm *S. gordonii* kann thrombozytäres GP Ib durch das bakterielle, in der Zellwand verankerte Oberflächenprotein GspB binden und Thrombozytenaktivierung stimulieren (Bensing et al. 2004, Takahashi et al. 2004). Ähnlichkeit zu GspB hat das Protein Hsa, das von verschiedenen Stämmen von *S. gordonii* exprimiert wird (Takamatsu et al. 2006). Sowohl GspB als auch Hsa vermitteln die Bindung an N-Acetylneuraminsäure-Resten auf dem Thrombozytenrezeptor GPIb, dies lässt vermuten, dass GPIb ein wichtiger Rezeptor für die *S. gordonii*-Thrombozyten-Interaktionen und damit unter anderem für die Pathogenese der Endokarditis ist (Bensing et al. 2004). Wie man gezeigt hat, ist durch die

Mutation des Proteins Hsa Endocarditis in einem Tiermodell reduziert worden (Takahashi et al 2006). Auch ist vom Viridansstamm *S. mitis* bekannt, dass dieser an Thrombozyten binden kann (Bensing et al. 2001).

Darüber hinaus sind ebenfalls von anderen Streptokokkenstämmen als den Viridans-Streptokokken Wechselwirkungen mit humanen Thrombozyten beobachtet worden. Die A-Streptokokken (*S. pyogenes*) können Thrombozytenaggregation induzieren (Kurpiewski et al. 1983). Abhängig vom Komplementsystem und von Antikörpern wird dies durch das Zellwandprotein M-Protein vermittelt (Beachey und Stollerman 1971). Weiterhin wurde auf der Oberfläche der A-Streptokokken sogar ein kollagenartiges Protein ScIA (streptococcal collagen-like surface protein) beschrieben (Rasmussen et al. 2000). Bei den Pneumokokken ist die Thrombozytenaggregation von Antikörpern abhängig (Zimmerman und Spiegelberg 1975).

Ebenfalls sind B-Streptokokken in der Lage, Thrombozytenaggregation zu induzieren. Mittels monoklonaler Antikörper gegen streptokokkale N-Acetylneuraminsäure lassen sich die Aggregation und die Serotoninsekretion verhindern (Wood und Gray 1986). Ein wichtiger Virulenzfaktor ist das Fibrinogenbindeprotein A (FbsA), das Thrombozytenaggregation verursacht (Pietrocola et al. 2005).

## **1.6 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist die nähere Untersuchung der pathologischen Thrombozytenaktivierung durch Streptokokken der Gruppe B. Die Effekte von verschiedenen GBS-Stämmen an humanen Thrombozyten, die teils von septischen Patienten und teils von gesunden Trägern isoliert worden sind, sollten verglichen werden. Die Charakterisierung der Unterschiede erfolgte mit Berücksichtigung sowohl der Induktion einer Thrombozytenaggregation sowie der P-Selektinexpression als auch der bakteriellen Fähigkeit, Thromboxan zu synthetisieren und Fibrinogen an ihrer Oberfläche zu binden. Weiterhin wurde die Aktivierung verschiedener Signalwege untersucht, von denen einige zu

einer Aggregation, andere lediglich zu einer thrombozytären Formänderung führen. Insgesamt soll diese Differenzierung des Einflusses verschiedener GBS-Stämme auf humane Thrombozyten Aufschluss darüber geben, ob möglicherweise eine Interaktion zwischen gewissen GBS-Stämmen und Thrombozyten eine wichtige Rolle in dem Verlauf einer GBS induzierten neonatalen Sepsis spielen könnte.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Antikörper und Inhibitoren

#### 1. Antikörper für den Western Blot:

- anti-pPKC ~ 70 kDa rabbit 1:1000 – anti-phospho-PKC $\alpha$ / $\beta$ II (Thr-638), BioLabs, England
- anti-phospho-MARCKS (Ser-152/156) rabbit, Cell Signalling, Beverly, USA
- anti-pp38 ~ 40 kDa mouse 1:1000 (1:500) – anti-diphosphorylated 38 MAP kinase, clone P38-TY (Thr-180/Tyr-182), Sigma, St. Louis, USA
- anti-phospho-PLC $\gamma$ II (Thy-1217) rabbit, Cell Signalling, Beverly, USA
- anti-phospho-CaMKII (Thr-286) rabbit, Cell Signalling, Beverly, USA
- anti-pMLC ~ 18 kDa rabbit 1:1000 – anti-phospho-MLC 2 (Thr-18/Ser-19), Cell Signalling, Beverly, USA
- Anti-CD32/Fc $\gamma$ RIIA Rezeptor, clone IV.3 (Medarex, Princeton, USA) und clone AT10 (Acris, Hiddenhausen, Germany)

#### 2. Antikörper für den Western Blot

- HRP-conjugated Goat-anti-mouse IgG (BioRad, Hercules, USA, 1:3000)
- HRP-conjugated Goat-anti-rabbit IgG (BioRad, Hercules, USA, 1:3000)

#### Antikörper für die Loading Control

- Actin (I-19): sc-1616 (Santa Cruz Biotechnology)

#### Antikörper für die Durchflusszytometrie

- Anti-CD62P, clone 1E3 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)
- FITC-conjugated chicken polyclonal anti-fibrinogen antibody (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Germany) 1:25
- FITC-conjugated chicken unspecific control IgY (WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Germany) 1:25

## Inhibitoren

- KN-93: (2-[N-(2-hydroxyethyl)]-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine) CaM-Kinase-II-Inhibitor (Merck Biosciences, Bad Soden, Germany)
- SB 203580: (4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)1H-imidazole) p38-MAP-Kinase-Inhibitor (Merck Biosciences, Bad Soden, Germany)
- GF 109203X: (2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide) Protein-Kinase-C (PKC)-Inhibitor (Merck Biosciences, Bad Soden, Germany)

## **2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

### Chemikalien:

- 10 % Formaldehyd (Methanol frei) – Polyscience Inc., Warrington, PA/USA
- 2-Mercaptoethanol – Sigma
- Ammoniumpersulfat (APS) - Sigma
- Ampuwa – Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
- Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk - BioRad, Hercules, CA, USA
- Bromphenolblau - Sigma
- Dulbecco`s PBS (Ca<sub>2+</sub>, Mg<sub>2+</sub>, Natriumbicarbonat frei) - Invitrogen Life Technologies, Paisley, Schottland
- Ethanol – J.T.Baker, Deventer/Holland
- Glucose – Sigma
- Glycerin –Merck, Darmstadt
- Glycine (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>2</sub>) – Serva, Heidelberg
- H<sub>2</sub>O (aqua ad iniectabilia)
- Kaleidoscope Prestained Standards (molekularer Größenstandard) – Bio Rad
- Methanol – J.T.Baker, Deventer/Holland
- Prestained Protein Marker, Broad Range – CellSignaling Technology
- Rinderserumalbumin (BSA) – Sigma

- Rotiphorese Gel 30 (Acylamid) – Carl Roth, Karlsruhe
- SDS – Merck, Darmstadt
- TEMED – Sigma
- Thiobarbitursäure – Merck, Darmstadt
- Trichloressigsäure – Merck, Darmstadt
- Trizma-Base – Sigma
- Tween – Sigma

Verbrauchsmaterialien:

- ADP – Sigma
- Blotting-Papier – Hartenstein GB33
- Cello Clean E (enzymatisch-katalytisch proteinspaltende Reinigungslösung)  
– möLab, Langenfeld
- Cellstar PP-Test Tubes 15 ml und 50 ml steril – greiner bio-one
- Columbia-Agar mit 5 % Schafsblut - bioMerieux
- ECL plus Western Blotting Detection System - Biosciences
- ECL Western Blotting Detection Reagents – Biosciences
- FALCONR-FACS-Röhrchen 5 ml – Becton Dickinson
- Fuji Medical X-Ray Film - Fujifilm
- Immobilion-P Transfer Membran, Porengröße 0,45 µm – Millipore
- LB-Medium - Bio 101
- Parafilm „M“ – Pechiney Pastic Packaging, Chicago, USA
- Reagiergefäß 1,5 ml – Sarstedt
- S-Monovetten, 5 und 10 ml, Gerinnungsröllchen mit Citratlösung - Sarstedt
- Tartan 901 (Overheadfolien)
- Test Tubes mikro (Aggregatometerröllchen) – möLab, Langenfeld
- Thrombin – Roche
- Wägeschalen in verschiedenen Größen – Hartenstein

## 2.3 Puffer und Lösungen

### SDS-Stopplösung (SDS-STOP)

Trizma-Base, pH 6,7 200 mM (20 ml 0,5 M Trizma-Base)

Glycerin 15 % (v/v) (7,5 ml Glycerin)

SDS 6 % (w/v) (10 ml 30% SDS)

Bromphenolblau 0,03 % (w/v) (0,015 g Bromphenolblau)

2-Mercaptoethanol 10 % (v/v) (5 ml)

(7,5 ml Aqua dest.)

### 4 Trenngele (10 %)

Ampuwa (15,8 ml)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (10 ml)

3 M Trizma-Base, pH 8,9 (3,76 ml)

10 % SDS (300 µl)

TEMED (15 µl)

10 % APS (300 µl)

### 4 Sammelgele (3 %)

H<sub>2</sub>O (10,88 ml)

30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (1,5 ml)

0,5 M Trizma-Base, pH 6,7 (1,88 ml)

10 % SDS (150 µl)

TEMED (7,5 µl)

10 % APS (300 µl)

### Elektrophoresepuffer

4,8 g Trizma Base

11,6 g Glycine

800 ml Ampuwa

8 ml 10 % SDS

### Transferpuffer

9,1 g Trizma Base

43,5 g Glycine

2400 ml Ampuva

600 ml Methanol

### Waschpuffer/TBS-Tween

100 ml 10fach TBS (tris buffered saline)

900 ml Ampuva

500 µl Tween

### PBS/Glc/BSA (für die Aggregationsversuche und FACS-Versuche)

Dulbecco's PBS ( $\text{Ca}_{2+}$  &  $\text{Mg}_{2+}$  frei)

5,5 mM D-Glucose (0,5 g/500 ml)

0,5 % BSA (0,1 g/20 ml)

### PBS/Glc (für Westernblotstimulation)

Dulbecco's PBS ( $\text{Ca}_{2+}$  &  $\text{Mg}_{2+}$  frei)

5,5 mM D-Glucose (0,5 g/500 ml)

### 6 % milk als Blockmedium

6 g Blotting milk in 100 ml TBS-Tween

### 5 % BSA als Blockmedium

5 g BSA in 100 ml TBS-Tween

### TBA

0,53 % Thiobarbitursäure in Phosphatpuffer, pH 7,4

## **2.4 Geräte, Software**

- Durchflusszytometer FACSCalibur - Becton Dickinson
- Elektrophoresekammern MiniProtean II - BioRad
- Inkubatoren: Certomat H - B. Braun Biotech Internat., Heraeus Instruments B 12
- Wasserbad Julaba TWB 5
- Photometer: Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech
- Transferkammer für Western Blots: Trans-Blot Cell - BioRad
- Hettrich-Zentrifuge Rotixa/K
- Eppendorf Centrifuge 5415C
- Eppendorf Centrifuge 5417R
- Eppendorf Thermomixer Comfort
- Heidolph Duomax 1030
- Transfer Power Pac 200/300 – BioRad
- Entwickler: X-OMAT Processor M35 – Kodak
- Waage BP 1200 – Sartorius
- Röntgenkassette Dr. Goos-Suprema 24\*30 cm
- Abzüge: SterilGARD Hood IBM-400, SterilGARD Class II Typ A/B 3 – the Baker Company, Sanford, Maine
- Aggregatometer PAP-4 – BioData
- NIH-Image

## **2.5 Präparation humaner Thrombozyten**

Die Thrombozyten wurden aus Blutspenden gesunder, erwachsener, nicht-rauchender Spender isoliert. Alle Blutspender waren nach einer Aufklärung zu der Blutentnahme freiwillig bereit und hatten keine die Blutgerinnung beeinflussenden Medikamente eingenommen.

Nach Stauung des Unterarmes mittels einer Manschette und ausreichender Desinfektion erfolgte die Blutentnahme mit 10 ml-S-Monovetten mit Citrat-Lösung der Firma Sarstedt aus einer der Cubitalvenen. Dabei wurden großer

Sog sowie eine schnelle Abnahme vermieden, um die Thrombozyten möglichst nicht durch Scherkräfte zu aktivieren.

Anschließend wurde das Vollblut für 5 Minuten bei 1400 rpm (330 g) in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert und auf diese Weise in drei verschiedene Phasen aufgetrennt. Neben der unteren erythrozytenreichen Phase, einer leukozytenreichen Zwischenphase, dem buffy coat, enthält die obere Phase das plättchenreiche Plasma (PRP), das Plasmabestandteile sowie Thrombozyten aufweist. Das PRP wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Kunststoffgefäß überführt.

Zur Herstellung des plättchenarmen Plasmas (PPP) wurde das PRP 1 min bei 5000 rpm (2700 g) in der Eppendorf-Zentrifuge 5417R zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet wurde vernachlässigt und der Überstand, das PPP, abpipettiert.

Alle Versuchsteile mit Thrombozyten sind entweder bei Raumtemperatur oder bei 37 °C im Wasserbad erfolgt.

## 2.6 B-Streptokokken – Stämme und Kultur

In der folgenden Tabelle aufgelisteten Streptokokken der Gruppe B (GBS) wurden für die Versuche verwendet.

	<b>GBS-Stamm</b>	<b>Serotyp</b>	<b>Kommentar</b>
<b>Septische Stämme</b>			
ATCC <sup>sept</sup>	ATCC 13813	V	Referenzstamm der Familie ATCC
SJ <sup>sept</sup>	SJ 250903	III	Klinisch Sepsis
IL <sup>sept</sup>	IL 250903	V	Neonatale Sepsis, Bauchnabelabstrich
<b>Kolonisierende Stämme</b>			
E 10 <sup>col</sup>	ESPED 10	III	kolonisierend
E 50 <sup>col</sup>	ESPED 50	III	kolonisierend
E 52 <sup>col</sup>	ESPED 52	III	kolonisierend
<b>Meningitisstämme</b>			
E 111 <sup>men</sup>	ESPED 111	III	Meningitis
E 118 <sup>men</sup>	ESPED 118	III	Meningitis
E 130 <sup>men</sup>	ESPED 130	III	Meningitis
<b>Letale Stämme</b>			
E 2 <sup>let</sup>	ESPED 2	III	letaler Krankheitsverlauf
E 150 <sup>let</sup>	ESPED 150	III	letaler Krankheitsverlauf
E 186 <sup>let</sup>	ESPED 186	III	letaler Krankheitsverlauf
<b>Vaginalabstriche</b>			
mHM <sup>vag</sup>	mHM-46	V	Vaginalabstrich
A <sup>vag</sup> /A <sup>col</sup>	A019	n.t.	Vaginalabstrich, symptomlos
A9 <sup>vag</sup>	A 9832		Vaginalabstrich
U <sup>vag</sup> /U <sup>col</sup>	U 155/3		Vaginalabstrich, symptomlos
<b>Ohrabstriche</b>			
GS <sup>Ohr</sup> /GS <sup>col</sup>	GS 130903	n.t.	V.a. neonatale bakterielle Infektion, Ohrabstrich
KA <sup>Ohr</sup>	KA 291203	V	Asymptomatisch, Ohrabstrich



ZJ <sup>Ohr</sup>	ZJ 260504		Klinisch Sepsis, Ohrabstrich
<b>Magensaft</b>			
EK <sup>Gas</sup>	EK 161003		Frühgeborenes 33. + 0. SSW, V.a. neonatale bakterielle Infektion, Magensaft

**Tabelle 2: Verwendete B-Streptokokkenstämme**

Der GBS-Stamm ATCC 13813 ist der Referenzstamm der Familie ATCC. Alle anderen B-Streptokokkenstämme sind aus Abstrichen von Patienten der Kinderklinik und Frauenklinik der Universität Würzburg gewonnen worden und wurden vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie der Universität Würzburg als B-Streptokokken identifiziert. Die Bestimmung des Serotyps des B-Streptokokkenstammes erfolgte durch Prof. Dr. Berner an der Kinderklinik der Universität Freiburg.

Nach einem Ausstrich unter einem speziellen Bakterienabzug ist die GBS-Kultur über Nacht auf einer typischen Blutagarplatte, die 5 % (vol/vol) Schafsblut enthält, bei 37 °C gewachsen. Anschließend wurden die Bakterien im LB-Medium bei 37 °C unter langsamem Schütteln 90 min weiter vermehrt. Nachdem durch photometrische Messungen bei 600 nm die Bakterienmenge bestimmt wurde, wurde das Flüssigmedium bei 1500 g für 10 min zentrifugiert, so dass sich am Boden des Probengefäßes ein Bakterienpellet bildete. Je nach Versuch wurden die B-Streptokokken durch Lösen in PBS/Glc oder PBS/Glc/BSA auf eine Konzentration von 0,5 oder  $1 \cdot 10^{11}$ /ml gebracht.

## **2.7 Aggregationsversuche**

### Aggregationsversuche mit verschiedenen GBS-Stämmen

Mittels eines PAP-4-Aggregatometers von Bio-Data wurde die Plättchenaggregation bei 37 °C im Zeitverlauf gemessen. Für die Versuche wurden jeweils vier Röhrchen mit 300 µl PRP und einem kleinen Rührmagneten vorbereitet. Nach Eichung des Gerätes mit 300 µl PPP wurde der Versuch

gestartet. In alle Röhren wurden der Reihe nach jeweils 15 µl Bakterienlösung ( $1 \cdot 10^{11}$  Bakterien/ml in PBS/Glc/BSA) gegeben, bei den ersten beiden Röhren handelte es sich als Referenz immer um GBS ATCC, während in die anderen beiden der jeweilige Versuchs-GBS-Stamm pipettiert worden ist. Zusätzlich wurden in Röhren 2 und 4 jeweils 3 µl (1,5 µM) ADP hinzugefügt. Der Grad der Thrombozytenaggregation wurde als Prozentänderung der Lichttransmission von PRP im Verhältnis zu PPP gemessen. Jeder Versuch wurde dreimal mit einem anderen Blutspender wiederholt.

#### Aggregationsversuche mit Inhibitoren

Bei diesem Versuch wurde das erste Röhren mit 300 µl PRP gefüllt. In ein zweites Röhren wurden ebenfalls 300 µl PRP pipettiert, die zuvor mit verschiedenen Inhibitoren für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert worden waren. Nach Eichung des Aggregatometers (wie oben bereits beschrieben) wurden in die Versuchsröhren ein kleiner Rührmagnet und jeweils 15 µl GBS ATCC Bakterienlösung ( $0,5 \cdot 10^{11}$  Bakterien/ml in PBS/Glc/BSA) zugegeben. Der Aggregationsverlauf ist vom PAP-4 Aggregatometer aufgezeichnet worden. Jeder Versuch wurde dreimal mit einem anderen Blutspender wiederholt.

## **2.8 Durchflusszytometrie**

### P-Selektin-Expression

Für die Analyse der P-Selektin-Expression wurde PRP mit den verschiedenen GBS- Stämmen stimuliert und anschließend bei 2700 g für 2 min zentrifugiert. Das entstandene PRP-Pellet wurde zunächst in PBS/Glc/BSA resuspendiert. Anschließend wurde es mit CD62P-Antikörpern in der Konzentration von 10 µg/ml für 20 min bei Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Thrombozytensuspensionen mit PBS/Glc/BSA verdünnt und mittels Durchflusszytometrie analysiert (vgl. Siau et al. 2006)

### Fibrinogenbindung

Bei diesem Versuch wurden Proben mit 50 µl PRP mit FITC-konjugiertem Anti-Fibrinogen-Antikörper oder mit FITC-konjugiertem unspezifischen Kontroll IgY für 10 min bei Raumtemperatur präinkubiert. Danach wurden  $1,25 \cdot 10^8$  GBS zugegeben und wieder für 1 min inkubiert. Die Reaktion wurde unter Zugabe von 5 µl 10 % Formaldehyd (1 % Formaldehydkonzentration) gestoppt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde jede Probe in 450 µl PBS/Glc/BSA gelöst und danach die Durchflusszytometrieanalyse vorgenommen. Auch diese Versuchsvariante wurde dreimal mit einem anderen Blutspender wiederholt (vgl. Siauw et al. 2006).

### **2.9 Thromboxansynthese**

Die Thromboxansynthese wurde bereits wie von Ledergerber und Hartmann beschrieben gemessen (Ledergerber und Hartmann 1995). Zunächst wurden die Thrombozyten mit verschiedenen GBS-Stämmen bei 37 °C stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 0,5 ml Proben der Zellsuspension isoliert, dann wurde durch Zugabe von 0,4 ml kalter, 20 % Trichloressigsäure (gelöst in 0,6 M HCl) die Reaktion gestoppt. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C für 10 min bei 4400 g zentrifugiert. Um die Malondialdehydkonzentration zu bestimmen, wurden 0,5 ml des Überstandes zu 0,5 ml TBA gefüllt. Nachdem die Proben bei 70 °C für 30 min erhitzt worden und dann bei Raumtemperatur für weitere 30 min gekühlt worden sind, wurden sie in einem Spectrofluorimeter ( $\lambda$ -Exzitation 533 nm,  $\lambda$ -Emission 550 nm) gemessen. Malondialdehyddiethylacetal (1,1,3,3-Tetraethoxypropan) wurde benutzt, um eine Kalibrationskurve für das Reaktionsprodukt von Malondialdehyd mit TBA zu erstellen (vgl. Siauw et al. 2006).

### **2.10 Western Blot**

Für die Western-Blot-Proben wurden die jeweiligen Streptokokkenstämme wie in 2.7 beschrieben in der Konzentration von  $0,5 \cdot 10^{11}$  Bakterien/ml in PBS/Glc vorbereitet. Dann wurden zu 700 µl PRP jeweils 35 µl der Bakterienlösung

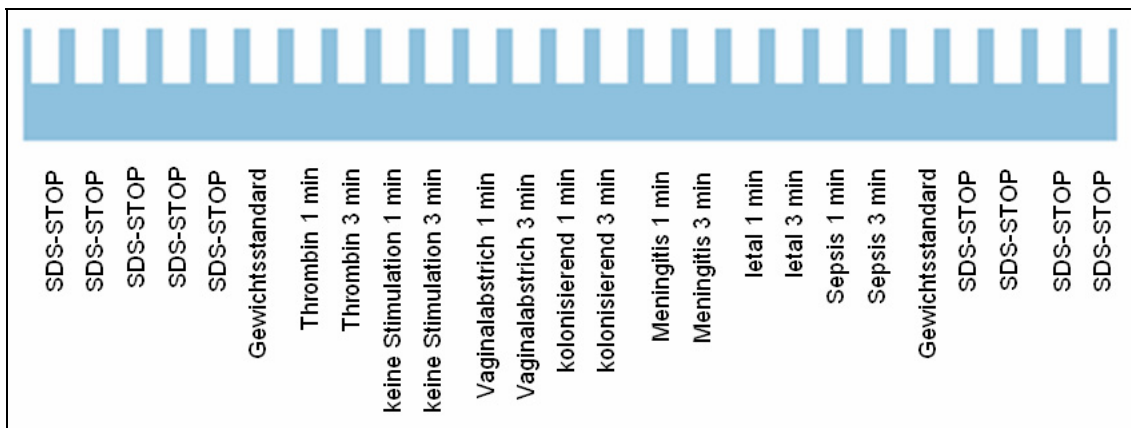
zugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitlängen der Inkubation bei RT wurden 300 µl abgetrennt und bei 8000 g 10 s zentrifugiert, so dass sich am Boden des Probengefäßes ein Pellet bildete. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 900 µl PBS/Glc gewaschen. Danach wurde das Pellet in 300 µl SDS-Lösung gemischt und sofort für 5 min bei 95 °C erhitzt. Zur Kontrolle wurden auch Proben ohne Bakterien gewonnen, das Procedere war wie bereits beschrieben bis auf die Zugabe der Bakterienlösung. Genauso wurden unter der gleichen Vorgehensweise auch Proben zum Vergleich mit 0,1 U/ml Thrombin statt Bakterienlösung stimuliert. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Bei den Versuchen erfolgte jede Stimulation und jede SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese viermal mit den Thrombozyten unterschiedlicher Blutspender.

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden 10 % Trenngele angefertigt, da dort Proteine in der gesuchten Größe zwischen 18 und 70kD aufgetrennt werden können. Als Sammelgel wurde ein 3 % Gel verwendet. Die Durchführung richtet sich nach der Methode nach Laemmli (Laemmli 1970, Schwarz et al. 1999).

Für das 10 % Gel wurden Ampuwa, 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid, 3 M Trizma-Base (pH 8,9), 10 % SDS und TEMED vermischt und anschließend unter einem Abzug APS zur Gelpolymerisation zugefügt. Sofort wurde das flüssige Gel vorsichtig zwischen die kurz zuvor mit 70 % Ethanol gereinigten Glasplatten der Gelkammer gegossen. Um eine glatte Geloberfläche ohne Luftblasen zu bekommen, ist eine kleine Menge 70 % Ethanol darüber verteilt worden. Nach der Gelpolymerisation wurde der Ethanol entfernt und das flüssige Gelgemisch eines 3 % Geles darüber gegossen, bei dem wie beim 10 % Gel APS zum Schluss erst zugefügt worden ist. Sofort danach wurde ein Platzhalter für 25 Taschen in das noch flüssige Sammelgel gesteckt. Sobald das Sammelgel ausgehärtet war, wurden die Gele mit den Glasplatten in die

Elektrophoresekammer eingespannt und mit ausreichend Elektrophoresepuffer bedeckt. Als nächster Schritt wurden die Platzhalter für die Taschen vorsichtig entfernt, damit im Folgenden die Proben aufgetragen werden konnten. Die Proben, SDS-Stoplösung und der molekulare Gewichtsstandard wurden hierzu für 5 min bei 95 °C in einem Eppendorf-Thermomixer erhitzt und anschließend wie folgt aufgetragen.



**Abbildung 4: Beispielhafte Ladeweise der Gele**

In jede Tasche wurde jeweils 20 µl von der Probenlösung aufgetragen. Mit einer konstanten Spannung von 80 Volt wurden die Proben auf gleiche Höhe durch das Sammelgel bis an die Grenze zum Trenngel gebracht. Anschließend wurde die Spannung auf 140 Volt erhöht, so dass sich die Proben nach Molekulargewicht auftrennten. Nachdem die Gele aus der Kammer genommen wurden, sind mit Hilfe einer Rasierklinge das Laufgel vom Sammelgel getrennt und die Randbereiche mit dem SDS-STOP abgeschnitten worden. Nun konnte das Gel auf eine gleich große Membran gelegt, beides zusammen mit Blottingpapier und Schaumstoff umhüllt und in die Haltevorrichtung der Transferkammer gepresst werden. Dabei war es wichtig, dass dies unter Luftausschluss geschah. Ebenso war es notwendig, die Membran aufgrund der negativen Beladung der Proteine mit SDS auf der Seite des positiven Pols der Kammer zu platzieren. Die Transferkammer wurde bis oben mit 4 °C kaltem Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer nach Towbin (Towbin et al. 1979) lief im Kühlraum bei 4 °C bei einer konstanten Stromstärke von 1 Ampere über eine

Stunde ab. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Overheadfolien unter Berücksichtigung des molekularen Gewichtsmarkers auf beiden Seiten bei etwa 25 kD und 55 kD zerschnitten und dann mindestens 30 min in 6 % Milch geschwenkt. Darauf folgend wurden die entsprechenden Antikörper, zum Beispiel pPKC, pp38 und pMLC, in der Konzentration von 1:1000 in 6 % Milch auf den entsprechenden Abschnitt gegeben und alles über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden überschüssige Antikörper dreimal etwa 10 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen 45 Minuten mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in der Konzentration 1:3000 in 6 % Milch inkubiert. Nach fünf Waschschrritten mit Waschpuffer von jeweils 5 min wurden die Blots für 1 Minute mit 4 ml ECL-Lösung inkubiert. Nun sind die Banden chemilumineszierend und können so mit Hilfe eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden. Zum Entwickeln wurden die Membranen unter Vermeidung von Luftblasen zwischen zwei Overheadfolien und anschließend in eine Röntgenkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme für wenige Minuten bis Sekunden auf die Membranen gelegt und danach in einer Entwicklermaschine entwickelt. Nach Beschriftung wurden die Filme eingescannt und mit dem Programm NIH Image analysiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 „Pilot“-Versuch

Als „Pilot-Versuch“ wurden Versuche mit wenigen GBS-Stämmen zusammen mit Celine Siauw und Anna Kobsar durchgeführt, die bereits in Thrombosis and Haemostasis veröffentlicht worden sind (Siauw et al. 2006). Im Wesentlichen sind die septischen Stämme ATCC, SJ<sup>sept</sup> und IL<sup>sept</sup> mit den kolonisierenden Stämmen A<sup>col</sup>, GS<sup>col</sup> und U<sup>col</sup> in Bezug auf ihre Auswirkung auf die primäre Hämostase verglichen worden.

##### 3.1.1 Aggregationsverhalten

Bei allen in 3.1 genannten GBS-Stämmen wurde in Aggregatometerversuchen die Fähigkeit überprüft, bei Thrombozyten eine Aggregation zu induzieren. Hierbei diente der GBS-Stamm ATCC 13813 als Referenzstamm. Alle GBS-Stämme verursachten eine thrombozytäre Formänderung. Jedoch nur die GBS-Stämme ATCC, SJ<sup>sept</sup> und IL<sup>sept</sup>, die von septischen Patienten isoliert worden sind, bewirkten eine Thrombozytenaggregation. Im Gegensatz dazu haben sogar nach 30 min Koinkubation die GBS-Stämme A<sup>col</sup>, GS<sup>col</sup> und U<sup>col</sup>, die aus Abstrichen bei gesunden Neugeborenen oder gesunden Schwangeren gewonnen wurden, keine Thrombozytenaggregation induziert.

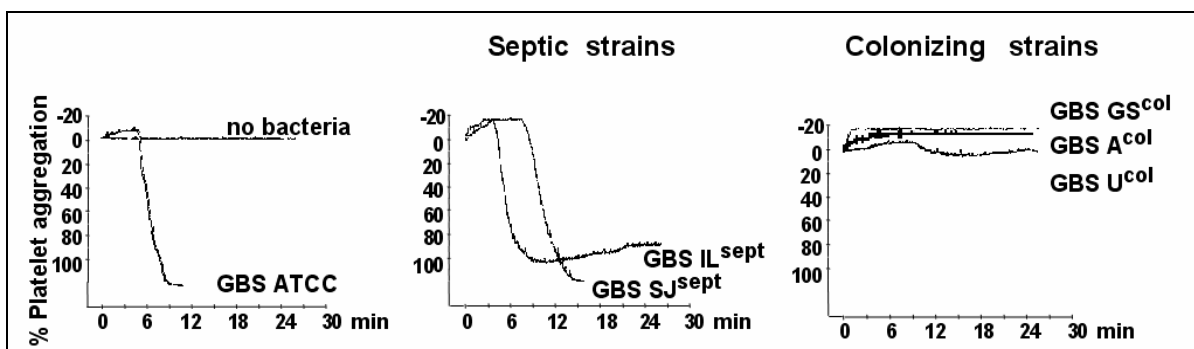


Abbildung 5: Thrombozytenaggregation durch GBS-Stämme (Siauw et al. 2006)

### 3.1.2 P-Selektin-Expression

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Grad der P-Selektin-Expression (CD62P-Expression) während der Inkubation mit verschiedenen GBS-Stämmen gemessen. Dabei zeigte sich, dass zum Zeitpunkt einer 50%igen Aggregation die septischen Stämme die P-Selektinexpression auf der thrombozytären Oberfläche um das 4,6-fache erhöhten. Dagegen hatten die kolonisierenden Stämme in 15 min Koinkubation keine Auswirkung auf die P-Selektin-Expression.

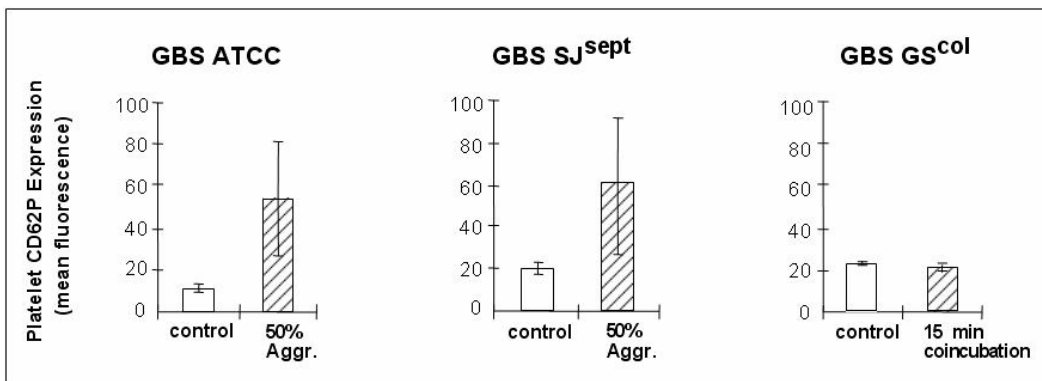


Abbildung 6: Thrombozytäre CD62P-Expression durch verschiedene GBS-Stämme (Siau et al. 2006)

### 3.1.3 Thromboxan-A<sub>2</sub>-Synthese

Auch bei der Induktion der Thromboxansynthese in den Thrombozyten zeigten die septischen und kolonisierenden Stämme Unterschiede. Während die septischen Stämme die Basalsyntheserate von Thromboxan auf das 2,3- bis 3,7-fache erhöhten, induzierten die kolonisierenden Stämme keine Thromboxansynthese.

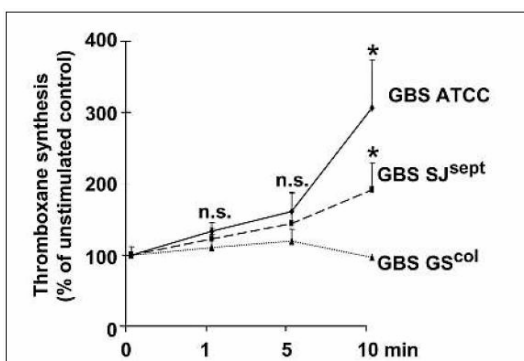


Abbildung 7: Thromboxansynthese durch verschiedene GBS-Stämme (Siau et al. 2006)



### 3.1.4 Fibrinogenbindung

Um die Fähigkeit der verschiedenen GBS-Stämme, Fibrinogen zu binden, aufzuzeigen, wurde PRP mit GBS für 1 min inkubiert und die Fibrinogenbindung mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dabei zeigten die septischen Stämme Fibrinogenbindung an ihrer Oberfläche, die für ATCC um das 1,4-fache und für SJ<sup>sept</sup> um das 1,1-fache höher als die unspezifische Bindung war. Keine Fibrinogenbindung konnte dagegen für die kolonisierenden Stämme gezeigt werden.

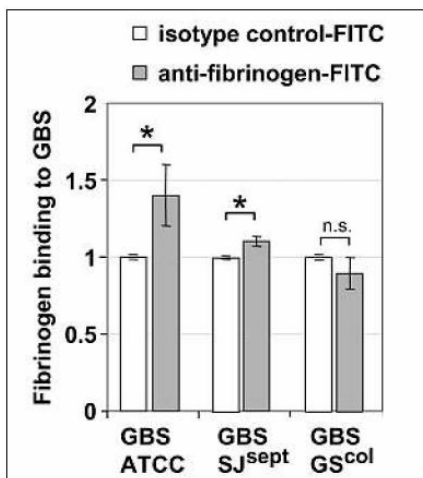


Abbildung 8: Fibrinogenbindung verschiedener GBS-Stämme (Siau et al. 2006)

### 3.1.5 Aktivierung unterschiedlicher Signalwege

Als Signalweg im Thrombozyten wurde der Fc $\gamma$ RIIA-Rezeptorsignalweg untersucht. Dabei wurde das Level der PLC $\gamma$ 2-Phosphorylation im Thrombozyten gemessen, nachdem das PRP mit GBS inkubiert worden war. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass sowohl septische als auch kolonisierende Stämme PLC $\gamma$ 2 aktivieren. Als ein Ergebnis der PLC $\gamma$ 2-Aktivierung und nachfolgender Calciummobilisation, wurden CAMK II und MLC auch nach Koinkubation mit septischen oder kolonisierenden GBS-Stämmen phosphoryliert. Preinkubation des PRPs mit einem Antikörper gegen den FCRIIA-Rezeptor verhinderte den Effekt von GBS auf diese drei Enzyme. Präinkubation mit dem CaMK II-Inhibitor KN-93 reduzierte die MLC-

Phosphorylierung um 50%. Jedoch beeinträchtigte dieses nicht die Thrombozytenaggregation.

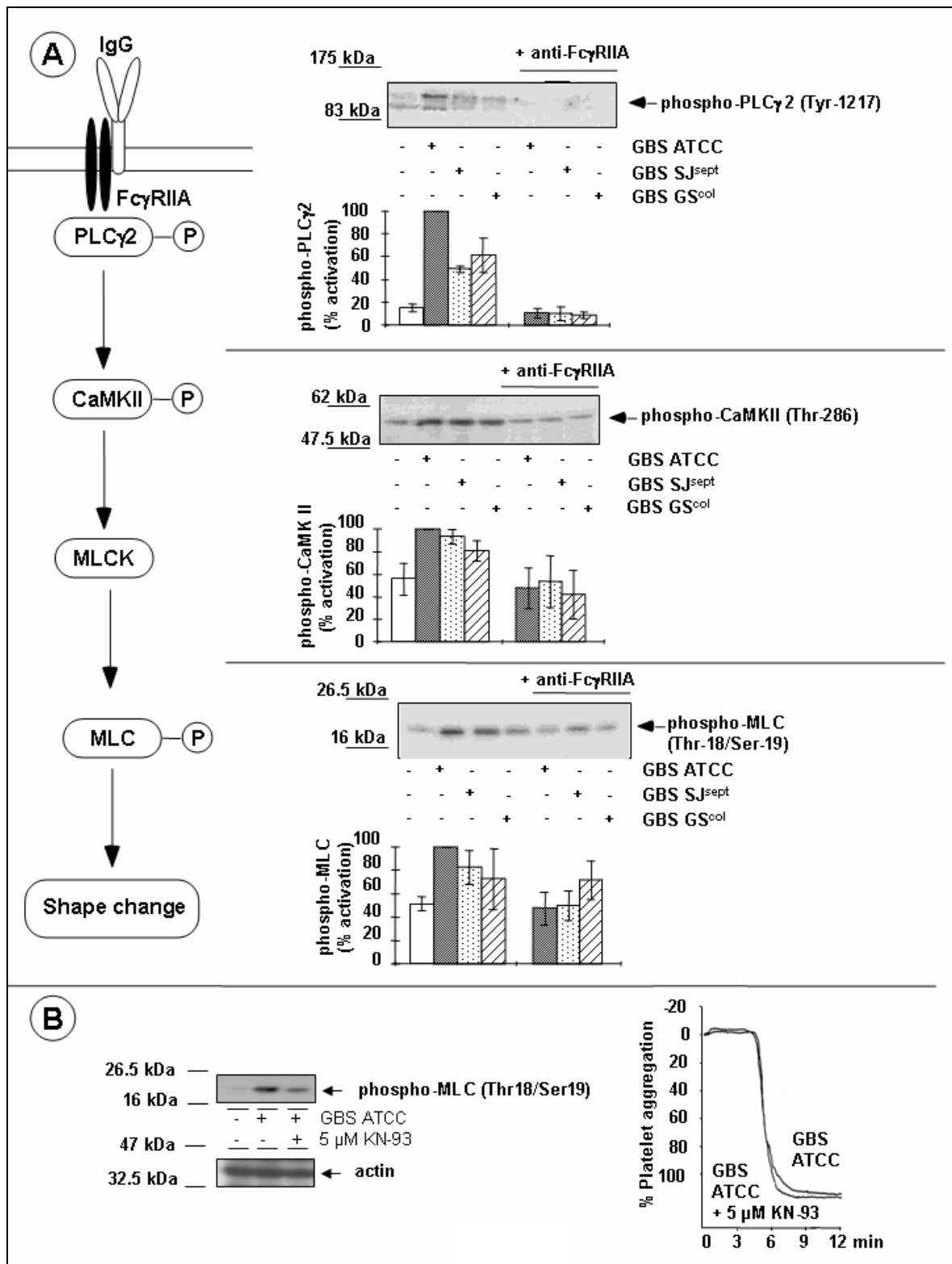


Abbildung 9: GBS induzierte Aktivierung des Fc $\gamma$ RIIA-regulierten Signalweges in humanen Thrombozyten (Siauw et al. 2006)

Weiterhin sind auch andere Signalwege untersucht worden. Um die PKC-Aktivierung zu ermitteln, wurde die Phosphorylierung von MARCKS in Thrombozyten analysiert, nachdem diese mit verschiedenen GBS-Stämmen inkubiert worden waren. Nur die septischen GBS-Stämme, die auch Aggregation induzieren, erhöhten die MARCKS-Phosphorylierung um das Dreifache. Dabei war die Aktivierung unabhängig vom FcγRIIA. Im Gegensatz dazu induzierten die kolonisierenden GBS-Stämme keine signifikante MARCKS-Phosphorylierung. Ein spezifischer PKC-Inhibitor GF 109203X reduzierte die PKC-Phosphorylierung um 60 %. In der Aggregatometrie wurde die Thrombozytenaggregation um 15 % reduziert und der Beginn der Aggregation um 5 min verzögert. Auch p38 MAP Kinase wurde um das Zweifache stärker von den septischen GBS-Stämmen als von den kolonisierenden GBS-Stämmen aktiviert. Das Blockieren des FcγRIIA-Rezeptors verhinderte nur teilweise p38 MAP Kinaseaktivierung. Das Einsetzen eines spezifischen Inhibitors SB 203580 reduzierte die p38 MAP Kinaseaktivität um 40 %. In der Aggregatometrie zeigte sich eine um 30 % reduzierte Thrombozytenaggregation, auch der Beginn der Aggregation war etwas verzögert (vgl. Siau et al. 2006).

## 3.2 Aggregationsversuche mit verschiedenen GBS-Stämmen

### 3.2.1 Septische Stämme

Die Stimulation mit dem septischen GBS-Stamm ATCC<sup>sept</sup> löste bei Thrombozyten nach 57 Versuchen im Mittel folgende Aggregationskurve aus:

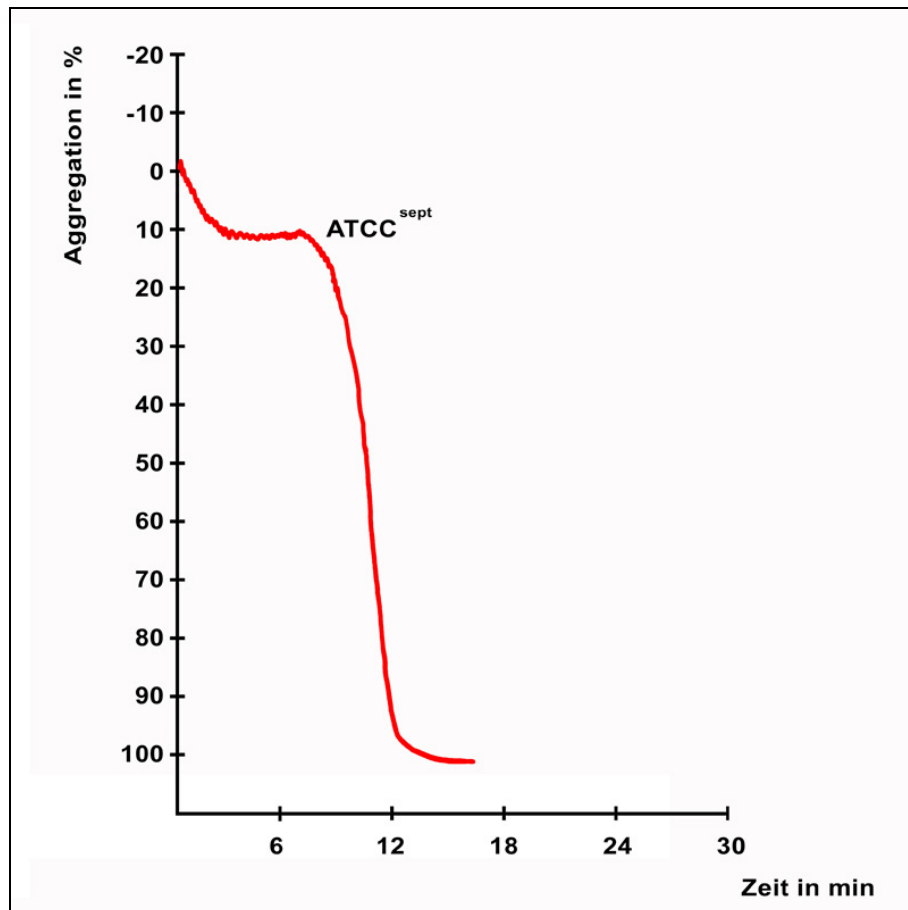


Abbildung 10: Aggregationsverlauf des septischen Stammes ATCC<sup>sept</sup>

Nach 2 min konnte durchschnittlich eine 7 % Aggregation beobachtet werden, nach 5 min waren es im Mittel 13 %, nach 10 min 46 %, nach 15 min 70 % und nach 30 min rund 90 %.

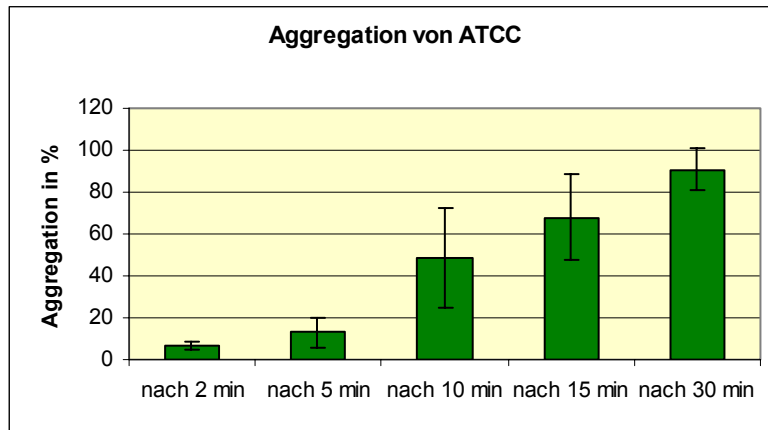


Abbildung 11: Aggregation in % (+/- Standardfehler (SEM)) von ATCC<sup>sept</sup>

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
ATCC <sup>Sept</sup>	7,49	2,73	13,42	7,10	46,74	23,35	70,37	20,22	89,51	11,16

Tabelle 3: Aggregation in % und SEM von ATCC<sup>sept</sup>

### 3.2.2 Kolonisierende Stämme

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit den kolonisierenden GBS-Stämmen E 10<sup>col</sup>, E 50<sup>col</sup> und E 52<sup>col</sup> konnten nach jeweils 3 Versuchen folgende Aggregationskurven aufgezeichnet werden:

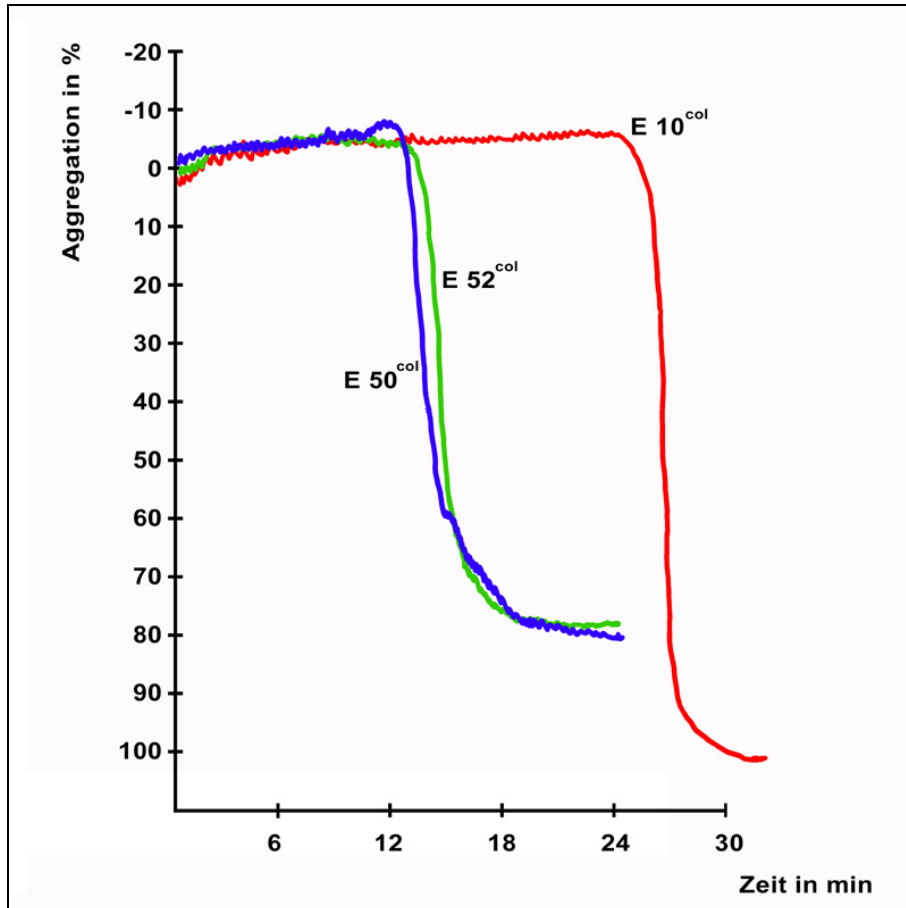
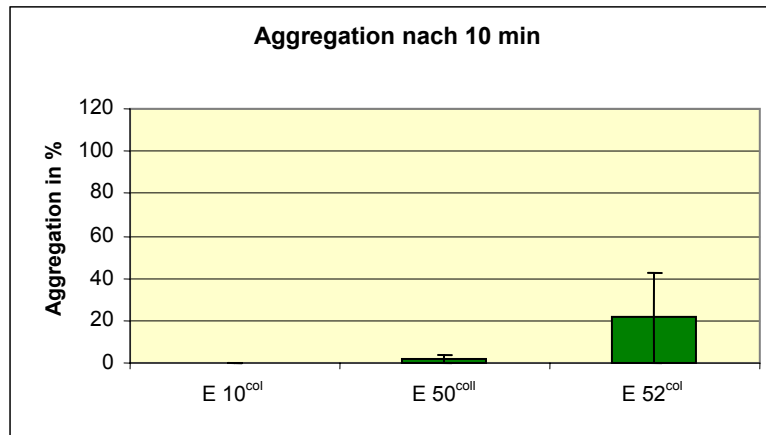


Abbildung 12: Aggregationsverlauf der kolonisierenden Stämme E 10<sup>col</sup>, E 50<sup>col</sup> und E 52<sup>col</sup>

Bei allen drei kolonisierenden Stämmen erfolgte bei 10 min kaum eine Aggregation; bei E 10<sup>col</sup> waren es 0 %, bei E 50<sup>col</sup> 2 % und bei E 52<sup>col</sup> 21,33 %.



**Abbildung 13: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der kolonisierenden Stämme E 10<sup>col</sup>, E 50<sup>col</sup> und E 52<sup>col</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
E 10 <sup>col</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	66,67	33,33
E 50 <sup>col</sup>	1,33	1,33	1,33	1,33	2,00	2,00	77,33	12,99	83,67	8,99
E 52 <sup>col</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	21,33	21,33	60,00	5,77	77,00	3,79

**Tabelle 4: Aggregation in % und SEM der kolonisierenden Stämme E 10<sup>col</sup>, E 50<sup>col</sup> und E 52<sup>col</sup>**

### 3.2.3 Meningitisstämme

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit den GBS-Stämmen E 111<sup>men</sup>, E 118<sup>men</sup> und E 130<sup>men</sup>, die eine Meningitis hervorrufen können, konnten nach jeweils 3 Versuchen folgende Aggregationskurven aufgezeichnet werden:

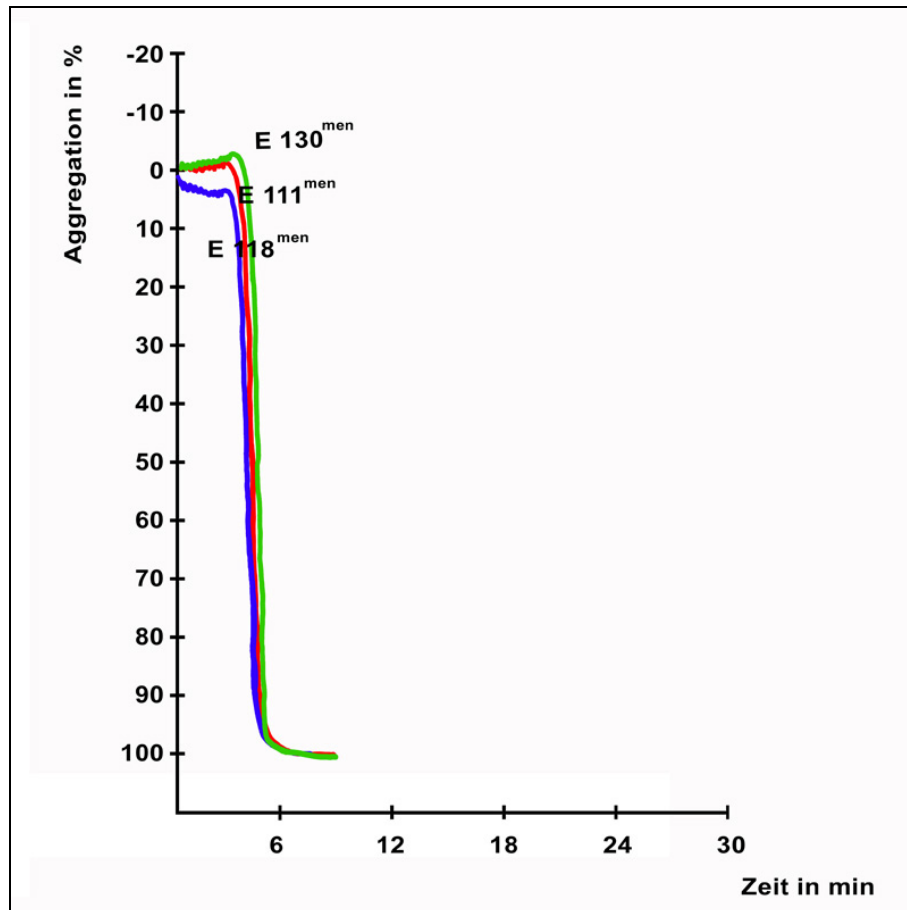
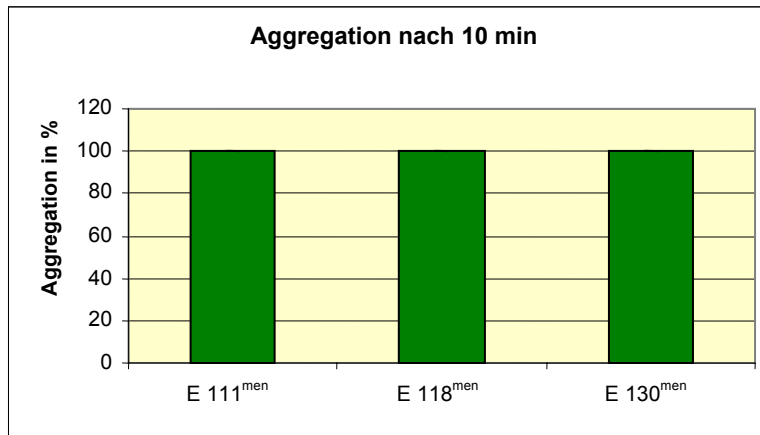


Abbildung 14: Aggregationsverlauf der Meningitisstämme E 111<sup>men</sup>, E 118<sup>men</sup> und E 130<sup>men</sup>

Nach 10 min zeigte sich bei allen Meningitisstämmen eine 100 % Aggregation.





**Abbildung 15: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Meningitisstämme E 111<sup>men</sup>, E 118<sup>men</sup> und E 130<sup>men</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
E 111 <sup>men</sup>	5,33	5,33	38,67	31,01	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
E 118 <sup>men</sup>	9,67	7,75	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
E 130 <sup>men</sup>	2,00	2,00	80,00	11,55	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

**Tabelle 5: Aggregation in % und SEM der Meningitisstämme E 111<sup>men</sup>, E 118<sup>men</sup> und E 130<sup>men</sup>**

### 3.2.4 Letale Stämme

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit den GBS-Stämmen E 2<sup>let</sup>, E 150<sup>let</sup> und E 186<sup>let</sup>, die einen letalen Krankheitsverlauf verursacht haben, konnten nach jeweils 3 Versuchen folgende Aggregationskurven aufgezeichnet werden:

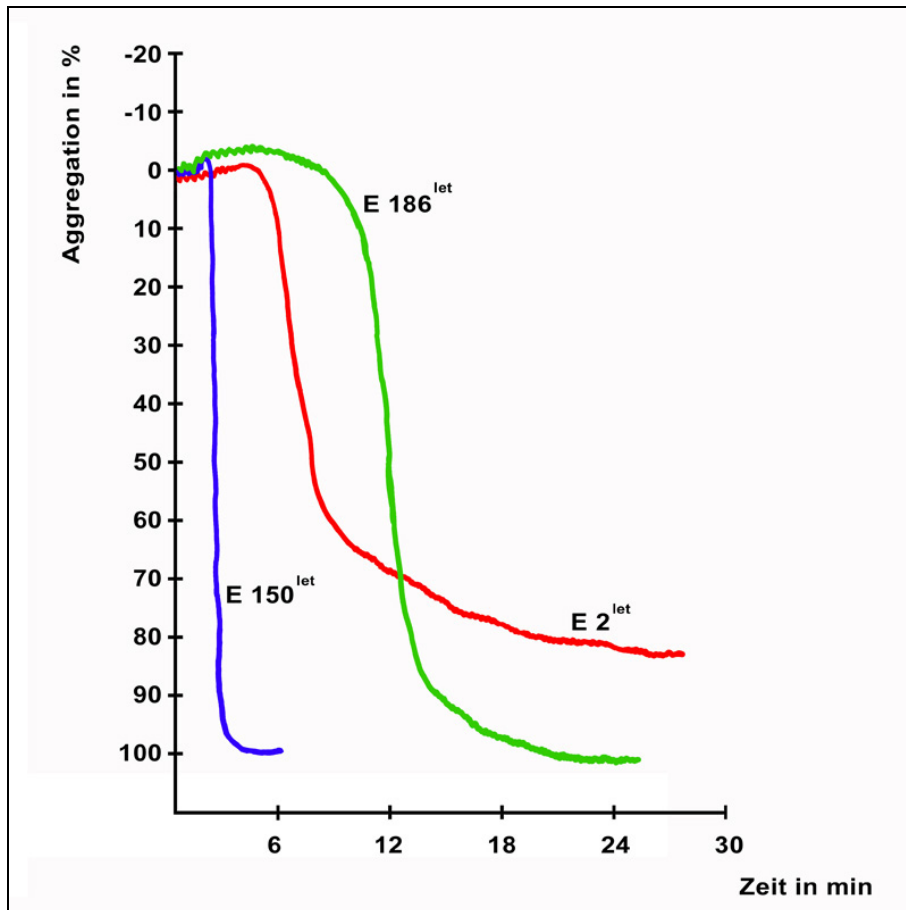
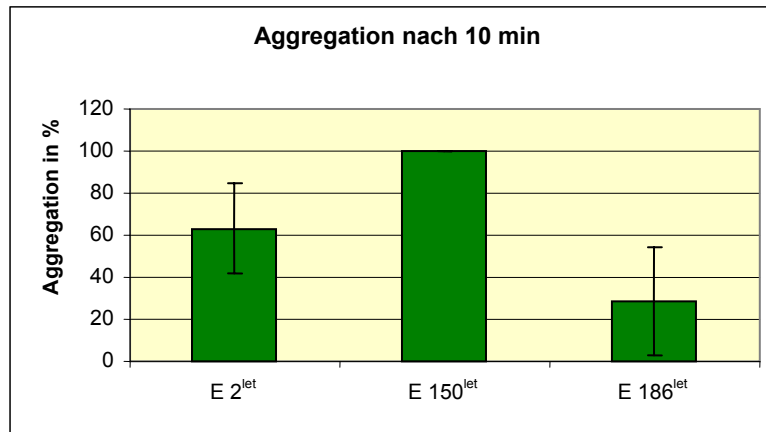


Abbildung 16: Aggregationsverlauf der letalen Stämme E 2<sup>let</sup>, E 150<sup>let</sup> und E 186<sup>let</sup>

Nach 10 min zeigte sich bei E 2<sup>let</sup> eine 63,33 %, bei E 150<sup>let</sup> eine 100 % und bei E 186<sup>let</sup> eine 28,33 % Aggregation.



**Abbildung 17: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der letalen Stämme E 2<sup>let</sup>, E 150<sup>let</sup> und E 186<sup>let</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
E 2 <sup>let</sup>	1,67	0,88	43,00	28,83	63,33	21,36	65,33	21,49	70,00	22,48
E 150 <sup>let</sup>	60,67	29,90	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
E 186 <sup>let</sup>	0,00	0,00	1,33	1,33	28,33	25,87	98,00	2,00	100,00	0,00

**Tabelle 6: Aggregation in % und SEM der letalen Stämme E 2<sup>let</sup>, E 150<sup>let</sup> und E 186<sup>let</sup>**

### 3.2.5 GBS aus Vaginalabstrichen

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit den GBS-Stämmen  $mHM^{vag}$  und  $A9^{vag}$ , die aus Vaginalabstrichen gewonnen wurden, konnten nach jeweils 3 Versuchen folgende Aggregationskurven aufgezeichnet werden:

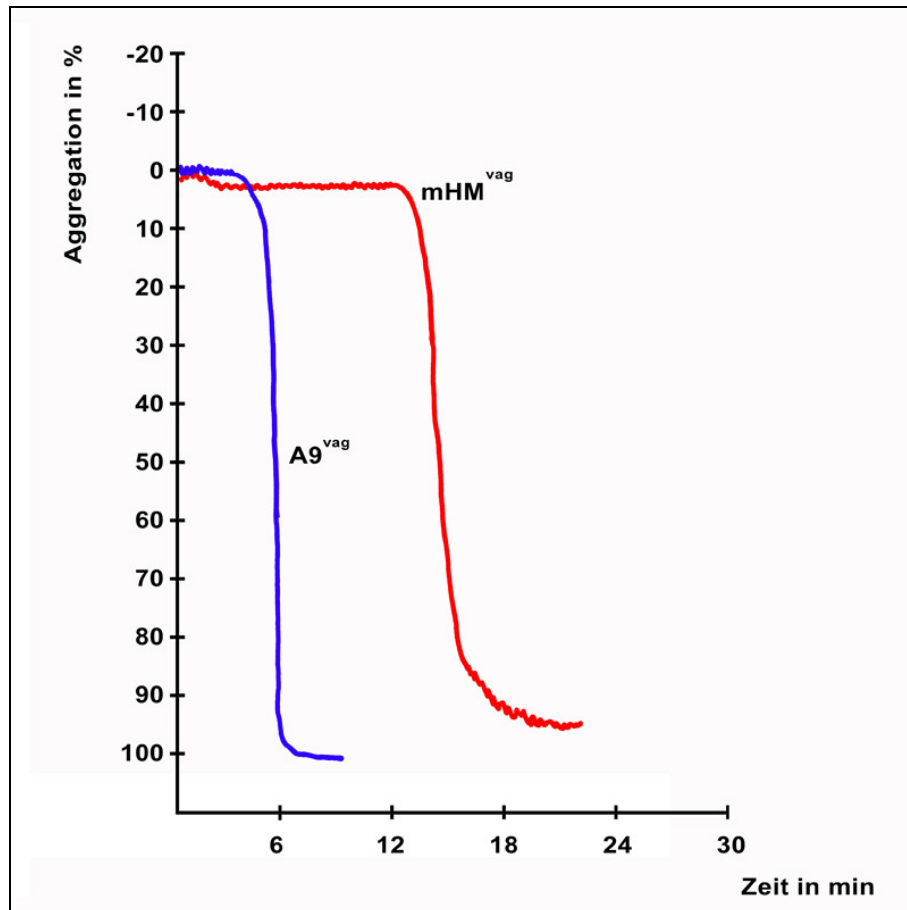
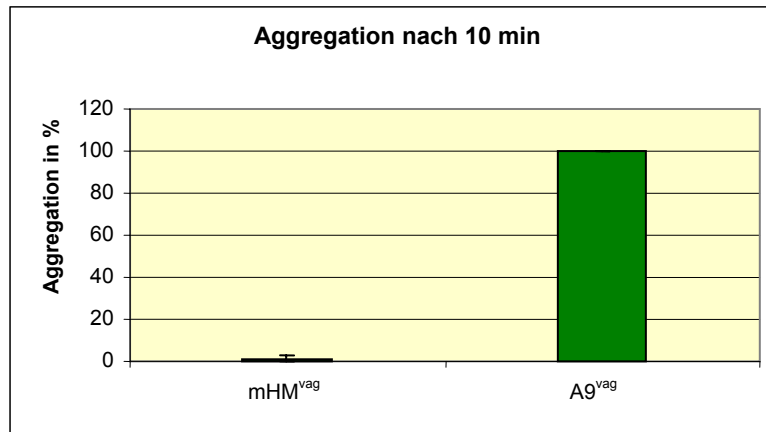


Abbildung 18: Aggregationsverlauf der Stämme aus Vaginalabstrichen  $mHM^{vag}$  und  $A9^{vag}$

Nach 10 min waren es bei  $mHM^{vag}$  1,33 % und  $A9^{vag}$  100 % Aggregation.



**Abbildung 19: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Stämme aus Vaginalabstrichen mHM<sup>vag</sup> und A9<sup>vag</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
mHM <sup>vag</sup>	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	1,33	60,00	30,55	99,00	1,00
A9 <sup>vag</sup>	0,00	0,00	40,67	30,12	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

**Tabelle 7: Aggregation in % und SEM der Stämme aus Vaginalabstrichen mHM<sup>vag</sup> und A9<sup>vag</sup>**

### 3.2.6 GBS aus Ohrabstrichen

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit den GBS-Stämmen KA<sup>Ohr</sup> und ZJ<sup>Ohr</sup>, die aus Ohrabstrichen gewonnen wurden, konnten nach jeweils 3 Versuchen folgende Aggregationskurven aufgezeichnet werden:

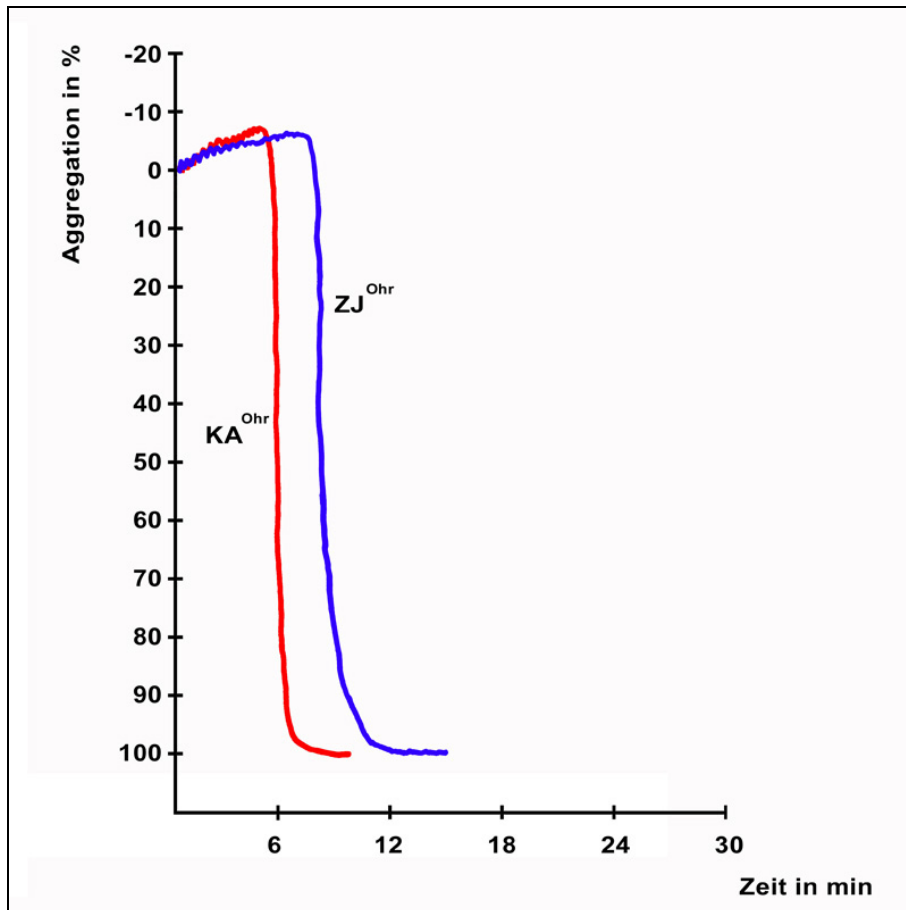
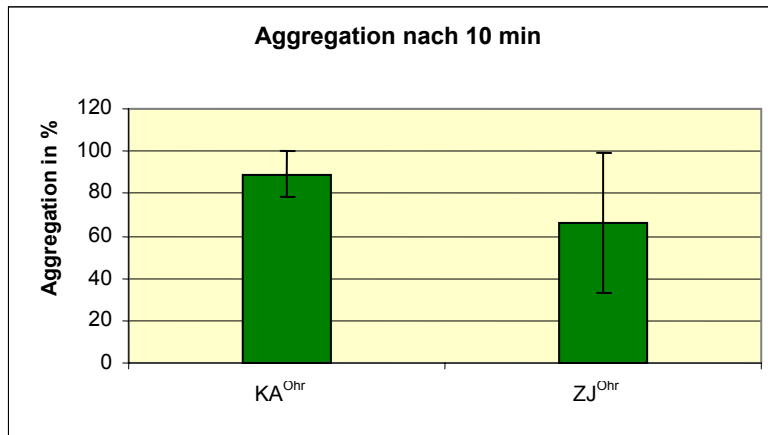


Abbildung 20: Aggregationsverlauf der Stämme aus Ohrabstrichen KA<sup>Ohr</sup> und ZJ<sup>Ohr</sup>

Nach 10 min zeigte sich bei KA<sup>Ohr</sup> eine 89 % und bei und ZJ<sup>Ohr</sup> eine 66 % Aggregation.



**Abbildung 21: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Stämme aus Ohrabstrichen KA<sup>Ohr</sup> und ZJ<sup>Ohr</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
KA <sup>Ohr</sup>	0,00	0,00	6,67	6,67	89,00	11,00	89,67	10,33	89,67	10,33
ZJ <sup>Ohr</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	66,00	33,01	100,00	0,00	100,00	0,00

**Tabelle 8: Aggregation in % und SEM der Stämme aus Ohrabstrichen KA<sup>Ohr</sup> und ZJ<sup>Ohr</sup>**

### 3.2.7 GBS aus Magensaft

Bei der Stimulation von Thrombozyten mit dem GBS-Stamm  $EK^{Gas}$ , der aus Magensaft gewonnen wurde, konnte nach 3 Versuchen folgende Aggregationskurve aufgezeichnet werden:

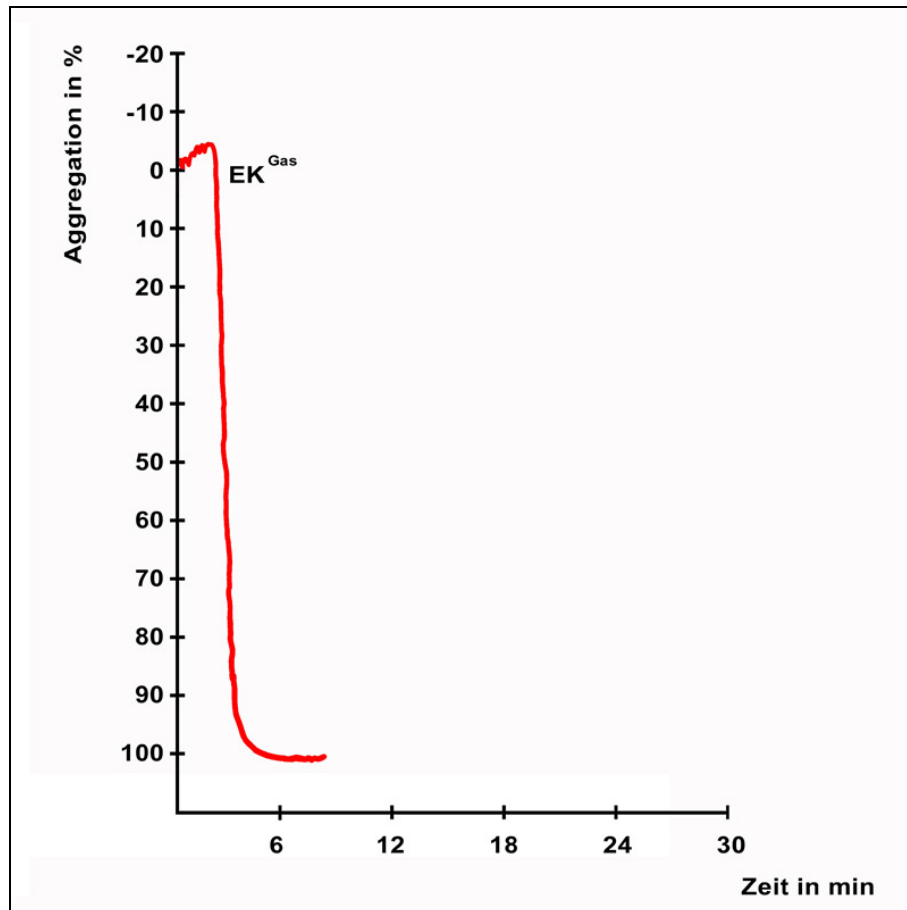
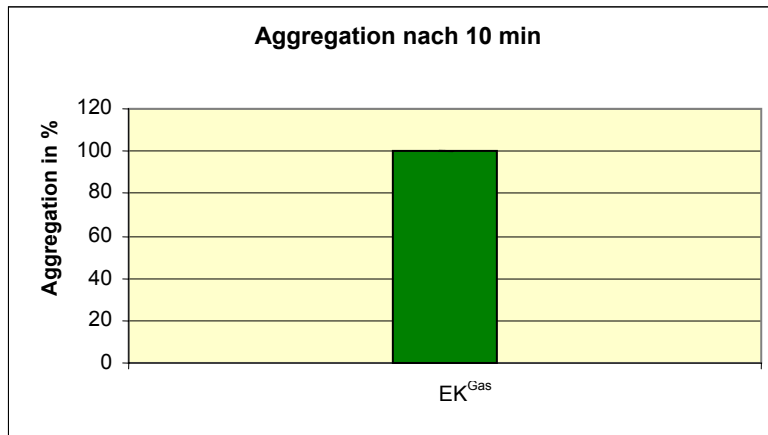


Abbildung 22: Aggregationsverlauf des aus Magensaft isolierten Stammes  $EK^{Gas}$

Nach 10 min zeigte sich eine Aggregation von 100 %.





**Abbildung 23: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) des aus Magensaft isolierten Stammes EK<sup>Gas</sup>**

Stamm	Agg. in % nach 2 min	SEM	Agg. in % nach 5 min	SEM	Agg. in % nach 10 min	SEM	Agg. in % nach 15 min	SEM	Agg. in % nach 30 min	SEM
EK <sup>Gas</sup>	1,67	1,67	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00

**Tabelle 9: Aggregation in % und SEM des aus Magensaft isolierten Stammes EK<sup>Gas</sup>**

### 3.3 Aktivierung unterschiedlicher Signalwege

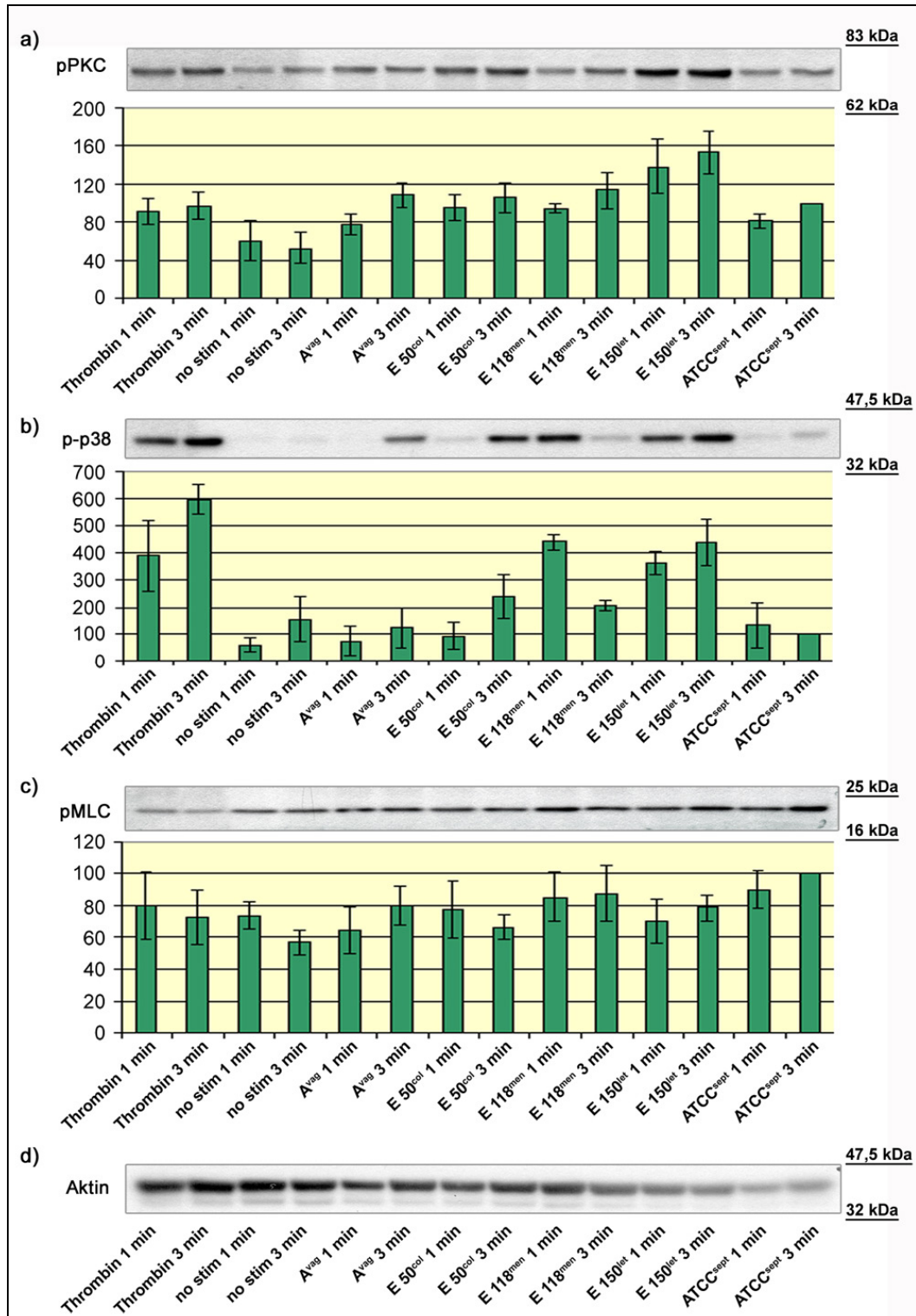


Abbildung 24: a) Aktivierung des PKC-Signalweges, b) Aktivierung des p38-Signalweges, c) Aktivierung des MLC-Signalweges und d) Aktin als Loading Control

	p bei pPKC	p bei p38	p bei MLC
Thr	0,178	0,871	0,726
no stim	0,068	0,006	0,835
A <sup>vag</sup>	0,491	0,021	0,786
E 50 <sup>col</sup>	0,216	0,022	0,765
E 118 <sup>men</sup>	0,173	0,256	0,492
ATCC <sup>sept</sup>	0,098	0,097	0,326

**Tabelle 10: T-Test der 1-Minutenwerte im Vergleich zu E 150<sup>men</sup> 1 min (p gibt hierbei das Signifikanzniveau des Unterschieds an)**

Bei diesem Versuch wurden die Ergebnisse der Signalwege der Western Blot-Analyse im Pilotversuch an weiteren GBS-Stämmen überprüft. Hinsichtlich der PKC-Aktivierung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den kolonisierenden und septischen Stämmen. Ebenso war dies bei der Phosphorylierung von MLC. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der p38-Phosphorylierung ein signifikanter Unterschied zwischen den septischen und kolonisierenden GBS-Stämmen.

### 3.4 Thrombozytenaggregation durch GBS unter Zusatz von ADP

Bei den verschiedenen Aggregationsversuchen wurden die Thrombozyten zusätzlich zu GBS mit 1,5  $\mu$ M ADP aktiviert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivierung durch GBS allein oder durch GBS und 1,5  $\mu$ M ADP.

Stamm	ohne ADP	SEM	mit ADP	SEM	p
ATCC <sup>Sept</sup>	46,74	23,35	52,39	4,78	0,43
E 10 <sup>col</sup>	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00
E 50 <sup>col</sup>	2,00	2,00	36,67	23,33	0,21
E 52 <sup>col</sup>	21,33	21,33	27,33	27,33	0,87
E 111 <sup>men</sup>	100,00	0,00	93,33	4,81	0,48
E 118 <sup>men</sup>	100,00	0,00	100,00	0,00	1,00
E 130 <sup>men</sup>	100,00	0,00	100,00	0,00	1,00
E 2 <sup>let</sup>	63,33	21,36	67,67	17,27	0,88
E 150 <sup>let</sup>	100,00	0,00	100,00	0,00	1,00
E 186 <sup>let</sup>	28,33	25,87	34,67	32,69	0,89
mHM <sup>vag</sup>	1,33	1,33	31,33	26,49	0,32
A9 <sup>vag</sup>	100,00	0,00	62,33	31,39	0,30
KA <sup>Ohr</sup>	89,00	11,00	93,33	6,67	0,75
ZJ <sup>Ohr</sup>	66,00	33,01	68,00	20,03	0,96
EK <sup>Gas</sup>	100,00	0,00	90,00	10,00	0,37

**Tabelle 11: Aggregation in % nach 10 min ohne und mit Zusatz von ADP, SEM und p als Signifikanz für den Unterschied**

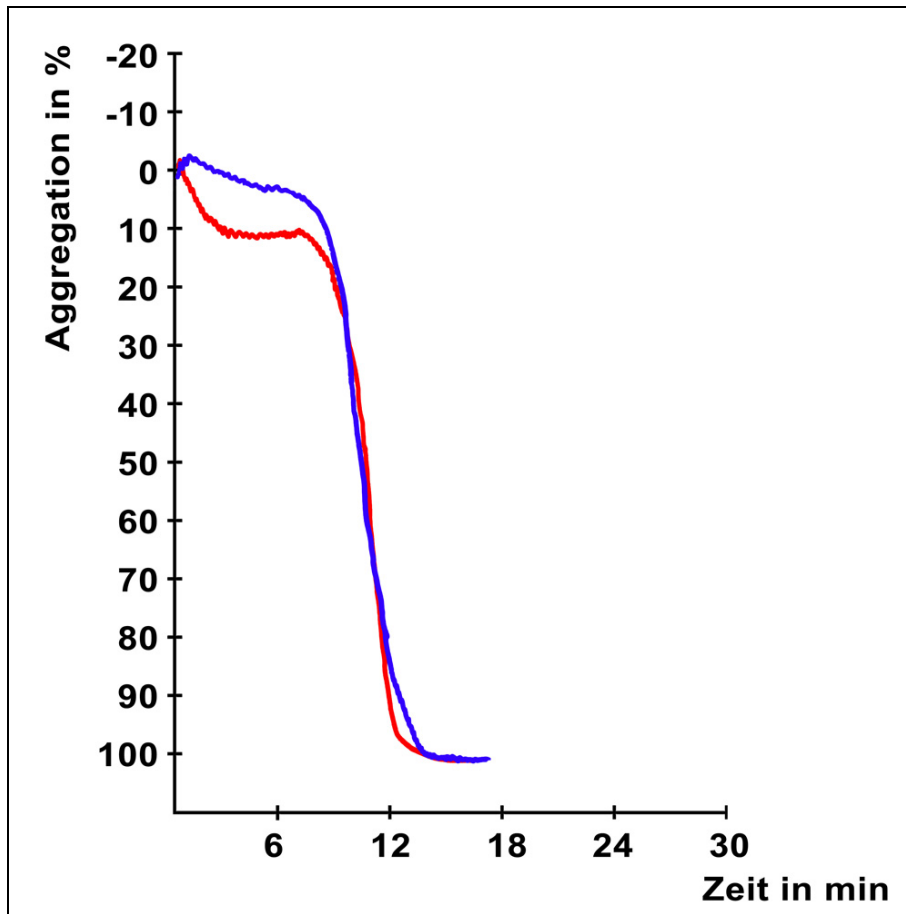


Abbildung 25: Aggregationsverlauf für ATCC<sup>sep</sup> ohne ADP (rote Kurve) und mit ADP (blaue Kurve)

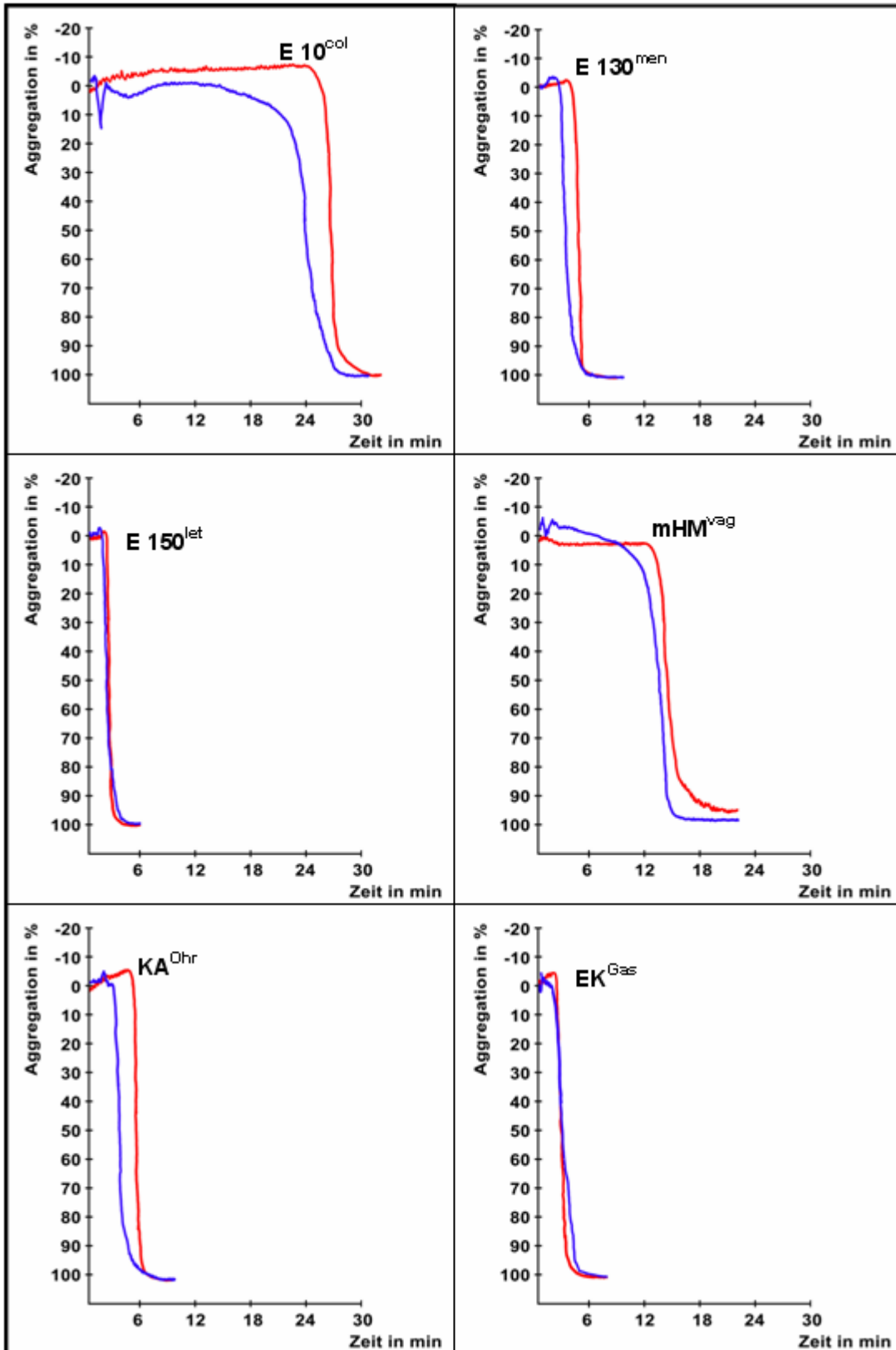


Abbildung 26: Aggregationsverlauf der verschiedenen GBS-Stämme mit ADP (blaue Kurve) und ohne ADP (rote Kurve)

## 4 Diskussion

### 4.1 Aggregation durch Bakterien

Es gibt eine Vielzahl von Mechanismen, die durch die Wechselwirkung zwischen den unterschiedlichsten Bakterien und humanen Thrombozyten zu einer Aggregation führen. So kann *S. aureus* durch verschiedene Oberflächenproteine eine Aggregation induzieren, indem unter anderem eine Fibrinogenbrücke zu GPIIb/IIIa oder eine IgG-Brücke zu Fc $\gamma$ R1a geschlagen wird (O'Brien et al. 2002, Fitzgerald et al. 2006). Ebenfalls über den thrombozytären GP IIb-IIIa-Rezeptor bewirken *B. burgdorferi* und *C. perfringens* eine Thrombozytenaggregation (Alugupalli et al. 2003, Bryant et al. 2000). Neben diesen genannten Bakterien sind auch Streptokokken in der Lage, Thrombozyten zu aktivieren und eine Aggregation auszulösen (Herzberg et al. 1983, Kurpiewski et al. 1983, Wood und Gray 1986). Wie *S. aureus* kann *S. sanguis* über eine IgG-Interaktion mit dem thrombozytären Fc $\gamma$ R1a-Rezeptor eine Aggregation induzieren (Sullam et al. 1988, Ford et al. 1997). Dagegen besitzt *S. gordonii* Oberflächenproteine, mit deren Hilfe Thrombozyten über thrombozytäres GP Ib aktiviert werden können (Bensing et al. 2004, Takahashi et al. 2004). Antikörper vermitteln die Aggregation bei *S. pyogenes* und bei Pneumokokken (Beachey und Stollerman 1971, Zimmerman und Spiegelberg 1975). Von GBS ist bekannt, dass sie Aggregation und Serotoninabgabe auslösen können. Diese Effekte konnten durch IgG-, IgM- und IgA-Antikörper gegen die N-Acetylneuraminsäure-Determinante von GBS Typ III inhibiert werden (Wood und Gray 1986). Bei den Versuchen für diese Arbeit lösten GBS unterschiedlicher Serotypen eine Aggregation aus. Bei den meisten B-Streptokokken war der Serotyp III vertreten, aber auch nicht typisierbare B-Streptokokken und B-Streptokokken des Serotyps V induzierten eine Aggregation. Dabei war die Eigenschaft Serotyp III keine Voraussetzung für eine Aggregation; vielmehr konnten einige GBS-Stämme dieses Serotyps keine Aggregation auslösen.

## 4.2 Aggregationsverhalten durch verschiedene GBS-Stämme

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es im Aggregationsverhalten der verschiedenen GBS-Stämme deutliche Unterschiede gibt. Während im Pilotversuch alle GBS-Stämme eine thrombozytäre Formänderung verursachten, lösten nur die GBS-Stämme, die von septischen Patienten isoliert worden waren, eine Aggregation aus (vgl. Siau et al. 2006). Genauso zeigten Versuche mit weiteren GBS-Stämmen diese Unterschiede. Die kolonisierenden Stämme bewirkten hier zunächst auch keine Aggregation. Später trat eine deutlich verzögerte Aggregation auf, die offensichtlich bereits durch die Scherkraft im Aggregatometer ausgelöst wurde. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass allein Scherkraft über einen Teil des Fibrinogenrezeptors in Anwesenheit von vWF eine Thrombozytenaggregation auslösen kann (O'Brien 1990). Wie bereits im Pilotversuch löste der Referenzstamm ATCC<sup>sept</sup> eine Aggregation aus. Auch die GBS-Stämme, die von Meningitiskranken isoliert worden waren oder beim Menschen einen letalen Verlauf nahmen, zeigten verglichen mit den septischen Stämmen eine recht schnelle Aggregation. Bei den GBS-Stämmen, die aus Vaginalabstrichen gezüchtet worden waren, verhielt sich der Stamm A9<sup>vag</sup> wie ein septischer Stamm, während der GBS-Stamm mHM<sup>vag</sup> einem kolonisierenden GBS-Stamm ähnelt. Diese Differenz lässt sich durch die fehlende klinische Information erklären, lediglich der Ort der Abstrichentnahme ist bekannt. Beide GBS-Stämme, die aus Ohrabstrichen gewonnen wurden, zeigten eine Aggregation wie ein septischer GBS-Stamm. Dies ist auch bei ZJ<sup>Ohr</sup> der Fall, wohingegen KA<sup>Ohr</sup> aus der Reihe fällt, da hier die klinische Untersuchung asymptomatisch ist. Dieser Widerspruch lässt sich dadurch erklären, dass möglicherweise der Abstrich relativ schnell nach der Infektion abgenommen worden ist und so zum Zeitpunkt der Abnahme noch keine klinischen Zeichen einer Infektion sichtbar waren. Der GBS-Stamm, der aus Magensaft isoliert worden ist, zeigte die Aggregation eines Meningitisstammes: Hierzu passt die klinische Information mit dem Verdacht auf eine neonatale bakterielle Infektion.



### 4.3 CD62P-Expression, Thromboxansynthese und Fibrinogenbindung

Hinsichtlich der Induktion der P-Selektin-Expression und der Thromboxansynthese sowie der Fibrinogenbindung zeigten sich weitere Unterschiede zwischen septischen und kolonisierenden Stämmen. P-Selektin ist ein Adhäsionsrezeptor, der nach Aktivierung der Thrombozyten aus den  $\alpha$ -Granula in die thrombozytäre Zellmembran eingebaut wird (Polgar et al. 2005). Kürzlich konnte in einer Veröffentlichung gezeigt werden, dass es ein klares Defizit an P-Selektin-Expression auf Thrombozyten bei Frühgeborenen gibt und diese thrombozytäre Dysfunktion in Hinblick auf Infektionen eine Rolle spielen mag (Wasiluk et al. 2008). In Zusammenarbeit mit C. Siau und A. Kobsar konnte in dieser Arbeit deutlich gemacht werden, dass die septischen GBS-Stämme eine erhöhte P-Selektin-Expression zur Folge hatten, während die kolonisierenden Stämme an der P-Selektin-Expression nichts veränderten (vgl. Siau et al. 2006). Bekannt ist, dass Frühgeburtlichkeit ein Risikofaktor für eine early-onset-Infektion mit GBS ist (Hakansson und Kallen 2006). So könnte der Zusammenhang der mangelnden P-Selektin-Expression bei Thrombozyten von Frühgeborenen und der in dieser Arbeit beobachteten gesteigerten P-Selektin-Expression auf Thrombozyten Erwachsener durch septische GBS-Stämme den Risikofaktor Frühgeburtlichkeit teilweise erklären (Wasiluk et al. 2008). Interessant wäre es sicherlich, die in der Arbeit angewandten Versuche an Thrombozyten Frühgeborener zu wiederholen.

Thromboxan  $A_2$ , das im Thrombozyten durch die Zyklooxygenase 1 (COX-1) und durch die Thromboxansynthese gebildet wird, stimuliert nach Freisetzung über Interaktion mit dem Thromboxanrezeptor die Sekretion von Granulainhaltsstoffen (Gawaz 1999). Die Versuche dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich die kolonisierenden und septischen Stämme bei der Induktion der Thromboxansynthese unterschieden. Die septischen Stämme erhöhten die Basalsyntheserate, während die kolonisierenden Stämme dies nicht taten. Auf diese Weise erhöhen die septischen Stämme sekundär die Aggregation (vgl. Siau et al. 2006).

Eine weitere Studie konnte FbsA auf GBS als wichtigen Virulenzfaktor in der Pathogenese der Sepsis und septischen Arthritis präsentieren (Jonsson et al. 2005). Zusätzlich demonstrierten Pietrocola et al. eine entscheidende Rolle für FbsA in der GBS-induzierten Thrombozytenaggregation (Pietrocola et al. 2005). Eine neuere Studie hat gezeigt, dass GBS-Stämme, die mehr FbsA tragen, viel Fibrinogen binden können und oft mit der neonatalen Meningitis assoziiert sind. Außerdem wird vermutet, dass die unterschiedliche Virulenz der GBS-Stämme durch die genetisch festgelegte Expression des Fibrinogenbindepoteinrezeptors teilweise erklärt werden kann (Rosenau et al. 2007). In dieser Arbeit konnte mittels Durchflusszytometrieanalyse der Fibrinogenbindung an GBS-Stämme gezeigt werden, dass nur septische Stämme im Stande waren, Fibrinogen auf ihrer Oberfläche zu binden, wohingegen die kolonisierenden Stämme dies nicht konnten (vgl. Siau et al. 2006).

#### **4.4 Aktivierung unterschiedlicher Signalwege**

Im Pilotversuch zeigte die Western-Blot-Analyse von GBS-stimulierten Thrombozyten, dass alle GBS-Stämme PLC $\gamma$ II, CaMKII, und Fc $\gamma$ RIIA-abhängige MLC-Phosphorylierung aktivierten (vgl. Siau et al. 2006). Hierbei handelt es um einen Signalweg, der für eine thrombozytäre Formänderung, aber nicht für eine Aggregation verantwortlich ist (Anderson und Anderson 1990, Gratacap et al. 1998, Daniel 1983, Stull et al. 1993). Deshalb beeinflusste die Hemmung von CaMKII durch einen Inhibitor die GBS-induzierte Thrombozytenaggregation nicht. Dies weist darauf hin, dass die PLC/CaMKII/MLCK-Signalkaskade nicht der Hauptsignalweg ist, der von GBS gebraucht wird, um Thrombozytenaggregation zu induzieren. So bedingte die GBS-induzierte Aktivierung von Fc $\gamma$ RIIA nur den anfänglichen Schritt in der Bakterien-induzierten Thrombozytenaktivierung, die Formänderung, aber nicht die volle Thrombozytenaggregation durch GBS (vgl. Siau et al. 2006). Auch die Versuche mit vielen unterschiedlichen GBS-Stämmen haben dies bestätigt. Es zeigte sich in der Western Blot-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den kolonisierenden und septischen Stämmen hinsichtlich der Phosphorylierung von MLC.

Die PKC ist an der thrombozytären Formänderung (Dandona et al. 1996) und an der Granulasekretion (Murphy und Westwick 1992) beteiligt. Weiterhin nimmt sie Einfluss bei der Regulierung der kalziuminduzierten Thrombozytenaggregation (Tabuchi et al. 2003). MARCKS, ein PKC-Hauptsubstrat in verschiedenen Zelltypen, wird auch in Thrombozyten exprimiert und wird nach der Stimulation der Thrombozyten durch Agonisten phosphoryliert (Elzagallaai et al. 2001). Deshalb wurde im Pilotversuch die Phosphorylierung von MARCKS verwendet, um das Niveau der Aktivierung der thrombozytären PKC einzuschätzen. Es zeigte sich, dass nur Stämme, die Aggregation induzieren, das Level der MARCKS-Phosphorylierung in Thrombozyten erhöhen, während die kolonisierenden GBS-Stämme das Niveau der grundlegenden MARCKS-Phosphorylierung nicht änderten. Jedoch ist die Aktivierung von PKC nicht ein exklusiver Signalweg für GBS, um Thrombozytenaggregation zu veranlassen, weil ein PKC-Hemmstoff nur geringfügig die Thrombozytenaggregation durch GBS reduzierte (vgl. Siau et al. 2006). Die Western-Blot-Analyse der Aktivierung von PKC zeigte allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen kolonisierenden und septischen Stämmen. Diese Differenz zwischen der MARCKS und PKC-Aktivierung könnte durch eine Voraktivierung von PKC bedingt sein. Untersucht wurden im Western Blot die konventionellen Isoformen der PKC  $\alpha$  und  $\beta$ II, die durch Adhäsion an Kollagen oder durch Agonisten wie Thrombin, ADP oder Tromboxan A<sub>2</sub> über intrazellulärem Calciumanstieg und DAG aktiviert werden können (Harper und Poole 2007).

An weiteren Signalwegen in Thrombozyten sind die MAP-Kinasen beteiligt. Blutplättchen enthalten alle drei bekannten Gruppen der MAP-Kinasen. Das sind die P42/44-MAP-Kinasen (ERK 2/1), p38 MAPK und die c-Jun-Aminoterminal Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase JNK/SAPK (McNicol und Jackson 2003, Kramer et al. 1995, Bugaud et al. 1999). Am wenigsten ist wohl über die Funktion von JNK/SAPK bei der Thrombozytenaktivierung bekannt. Experimente zeigten, dass Thrombin und Scherkräfte JNK/SAPK in Thrombozyten aktivieren, während die Fibrinogenbindung an den

Fibrinogenrezeptor JNK/SAPK-Aktivität verringert (Bugaud et al. 1999). Werden Thrombozyten durch physiologische Agonisten aktiviert, so erfolgt die Phosphorylierung von p42-MAP-Kinase sowie von p38-MAPK (Schwarz et al. 2000). Weiterhin ist p38 MAPK auch an der Interaktion zwischen Thrombozyten und Low density proteins (LDL) beteiligt, die gemeinsam Schlüsselemente bei der Entstehung atherothrombotischer Komplikationen sind (Korporaal et al. 2004). LDL induzieren p38-MAPK-Aktivierung und nachfolgend die Abgabe von Arachidonsäure, einer Vorstufe der Thromboxansynthese. Deshalb wird vermutet, dass die Aktivierung der p38-MAPK durch LDL ein erster Schritt in der Thrombozytensensibilisierung sein könnte (Akkerman 2008). Weiterhin ist p38-MAPK ein Schlüsselement im FcγRIIA-unabhängigen Signalweg nach Aktivierung durch vWF. Es ist an der Stimulation von Phospholipase A<sub>2</sub> und Arachidonsäureabgabe beteiligt (Canobbio et al. 2004). Die experimentellen Daten des Pilotversuches zeigen, dass alle der geprüften GBS-Stämme bedeutsam p38-MAP-Kinase in Thrombozyten aktivierten (vgl. Siau et al. 2006). Weiterhin gab es eine positive Korrelation zwischen dem Ausmaß von p38-MAP-Kinase-Aktivierung und der Fähigkeit von Bakterien, Thrombozytenaggregation zu veranlassen. Die Hemmung der Aktivität der p38-MAP-Kinase lief auf die Verminderung der GBS-induzierten Thrombozytenaggregation hinaus. Die Aktivierung von p38-MAP-Kinase passierte nicht nur über den FcγRIIA-Signalweg, sondern auch über IgG-unabhängige Signalwege. Ebenfalls konnte bei den Versuchen mit mehreren GBS-Stämmen ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,025$ ) hinsichtlich der p38-Phosphorylierung zwischen septischen und kolonisierenden Stämmen gezeigt werden. Bereits am Beispiel des Toxins von *Bacillus anthracis* konnte gezeigt werden, dass p38 MAPK in der Pathogenese der Infektion mit Bakterien eine Rolle spielt. Versuchsmäuse, die mit diesem Gift behandelt wurden, zeigten vermehrt Blutungen. Passend dazu konnte eine Inhibition von p38 MAPK an menschlichen Thrombozyten in vitro beobachtet werden (Kau et al. 2005).

Ein physiologischer Agonist für eine Thrombozytenaggregation ist ADP. Für ADP sind am Thrombozyten drei verschiedene Rezeptoren bekannt (Daniel et

al. 1998, Gachet 2005). Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor scheint keine Aggregation selbst zu vermitteln (Takano et al. 1999), aber er ist an Kollagen und Scherkraft-induzierter Aggregation beteiligt (Toth-Zsomboki et al. 2003; Hechler et al. 2003). Der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation einer Aggregation (Hechler et al. 1998). Neben der Initiation einer Aggregation durch den P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor ist der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor für eine Amplifikation der Aggregation verantwortlich (Gachet 2005). In den Versuchen für diese Arbeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p > 0,21$ ) zwischen der alleinigen Aggregation durch B-Streptokokken und der Aggregation durch B-Streptokokken unter einem Zusatz einer geringen Menge ADP. Hierbei war die Konzentration des ADPs so niedrig gewählt, dass hieraus allein kein Effekt hätte beobachtet werden können. Es zeigte sich, dass diese Menge ADP keinen Einfluss oder additiven Effekt auf die Aggregation durch B-Streptokokken bewirkte.

## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten unter der Zusammenarbeit mit Celine Siau und Anna Kobsar folgende Ergebnisse gezeigt werden (vgl. Siau et al. 2006):

- GBS-Stämme veranlassen die thrombozytäre Formänderung; jedoch führen nur von septischen Patienten isolierte Stämme zur Thrombozytenaggregation sowie zur P-Selektinexpression.
- Septische GBS-Stämme binden Fibrinogen auf ihrer Oberfläche und induzieren die thrombozytäre Thromboxansynthese und Granulasekretion, während kolonisierende GBS-Stämme dies nicht können.
- p38-MAPK wurde bevorzugt durch aus septischen Patienten isolierte GBS-Stämme aktiviert, ebenfalls scheint PKC durch diese aktiviert zu werden. Alle GBS-Stämme aktivierten PLC $\gamma$ 2, CaMKII und MLC-Phosphorylierung über Fc $\gamma$ RIIA abhängige Signalwege.
- Es gibt weder einen Unterschied noch einen additiven Effekt zwischen der Aggregation induziert durch GBS und der Aggregation durch GBS und einer geringen Menge ADP.

Diese Kenntnisse der molekularen Mechanismen von GBS-induzierten Signalwegen in menschlichen Thrombozyten werden zu einem besseren Verständnis von Bakterieneffekten auf die Thrombozytenaktivierung beitragen und können deshalb neue molekulare Ziele für die pharmakologische Behandlung von GBS sein.

## 6 Literaturverzeichnis

Akkerman, J.W. (2008) From low-density lipoprotein to platelet activation. *Int J Biochem Cell Biol* 40(11), 2374-2378.

Alugupalli, K.R., Michelson, A.D., Joris, I., Schwan, T.G., Hoidalva-Dilke, K., Hynes, R.O. and Leong, J.M. (2003) Spirochete-platelet attachment and thrombocytopenia in murine relapsing fever borreliosis. *Blood* 102(8), 2843-2850.

Anderson, G.P. and Anderson, C.L. (1990) Signal transduction by the platelet Fc receptor. *Blood* 76(6), 1165-1172.

Andrews, R.K. and Fox, J.E. (1990) Platelet receptors in hemostasis. *Curr Opin Cell Biol* 2(5), 894-901.

Apgar, B.S., Greenberg, G. and Yen, G. (2005) Prevention of group B streptococcal disease in the newborn. *Am Fam Physician* 71(5), 903-910.

Arvand, M., Bhakdi, S., Dahlback, B. and Preissner, K.T. (1990) Staphylococcus aureus alpha-toxin attack on human platelets promotes assembly of the prothrombinase complex. *J Biol Chem* 265(24), 14377-14381.

Bamberger, D.M. and Boyd, S.E. (2005) Management of Staphylococcus aureus infections. *Am Fam Physician* 72(12), 2474-2481.

Bang, N.U.a.D.B.W. (1999) Normal Platelet Function and Antiplatelet Drugs. *ACC CURRENT JOURNAL REVIEW* January/February 1999, 13-16.

Beachey, E.H. and Stollerman, G.H. (1971) Toxic effects of streptococcal M protein on platelets and polymorphonuclear leukocytes in human blood. *J Exp Med* 134(2), 351-365.

Begonja, A.J., Geiger, J., Rukoyatkina, N., Rauchfuss, S., Gambaryan, S. and Walter, U. (2007) Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A2 and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase. *Blood* 109(2), 616-618.

Benitz, W.E., Gould, J.B. and Druzin, M.L. (1999) Risk factors for early-onset group B streptococcal sepsis: estimation of odds ratios by critical literature review. *Pediatrics* 103(6), e77.

Bennett, J.S. and Kolodziej, M.A. (1992) Disorders of platelet function. *Dis Mon* 38(8), 577-631.

Bensing, B.A., Lopez, J.A. and Sullam, P.M. (2004) The *Streptococcus gordonii* surface proteins GspB and Hsa mediate binding to sialylated carbohydrate epitopes on the platelet membrane glycoprotein Ibalpha. *Infect Immun* 72(11), 6528-6537.

Bensing, B.A., Rubens, C.E. and Sullam, P.M. (2001) Genetic loci of *Streptococcus mitis* that mediate binding to human platelets. *Infect Immun* 69(3), 1373-1380.

Berner, R. (2003) Infektionen durch Gruppe-B-Streptokokken in der Neonatalperiode. *Monatsschr Kinderheilkd* 151, 373–383

Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klapettek, K., Mueller-Eckhardt, C. and Roka, L. (1988) Staphylococcal alpha toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* 168(2), 527-542.

Bisharat, N., Crook, D.W., Leigh, J., Harding, R.M., Ward, P.N., Coffey, T.J., Maiden, M.C., Peto, T. and Jones, N. (2004) Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J Clin Microbiol* 42(5), 2161-2167.



Blaser, M.J. and Atherton, J.C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 113(3), 321-333.

Bryant, A.E., Chen, R.Y., Nagata, Y., Wang, Y., Lee, C.H., Finegold, S., Guth, P.H. and Stevens, D.L. (2000) Clostridial gas gangrene. II. Phospholipase C-induced activation of platelet gpIIb/IIIa mediates vascular occlusion and myonecrosis in *Clostridium perfringens* gas gangrene. *J Infect Dis* 182(3), 808-815.

Bugaud, F., Nadal-Wollbold, F., Levy-Toledano, S., Rosa, J.P. and Bryckaert, M. (1999) Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets. *Blood* 94(11), 3800-3805.

Canobbio, I., Reineri, S., Sinigaglia, F., Balduini, C. and Torti, M. (2004) A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor. *Thromb Haemost* 91(1), 102-110.

Cleary, P. and Cheng, Q. (2006) Medically Important Beta-Hemolytic Streptococci. *Prokaryotes* 4(CHAPTER 1.2.3), 108–148.

Coykendall, A.L. (1989) Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2(3), 315-328.

Cunningham, M.W. (2000) Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* 13(3), 470-511.

Dandona, P., Thusu, K., Khurana, U., Love, J., Aljada, A. and Mousa, S. (1996) Calcium, calmodulin and protein kinase C dependence of platelet shape change. *Thromb Res* 81(2), 163-175.

Daniel, J.L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J.B. and Kunapuli, S.P. (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 273(4), 2024-2029.

Daniel, J.L., Molish, I.R., Rigmaiden, M. and Stewart, G. (1984) Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response. *J Biol Chem* 259(15), 9826-9831.

Dyke, S. C. (1924) The blood platelets and their place in medicine. *The Lancet*, Oct. 4, 714-716.

Edwards, M.S. and Baker, C.J. (2005) Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis* 41(6), 839-847.

Efstratiou, A. (2000) Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother* 45 Suppl, 3-12.

Elzagallaai, A., Rose, S.D., Brandan, N.C. and Trifaro, J.M. (2001) Myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation is involved in thrombin-induced serotonin release from platelets. *Br J Haematol* 112(3), 593-602.

Emilia, G., Longo, G., Luppi, M., Gandini, G., Morselli, M., Ferrara, L., Amarri, S., Cagossi, K. and Torelli, G. (2001) *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 97(3), 812-814.

Erickson, P.R. and Herzberg, M.C. (1993) The *Streptococcus sanguis* platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain. *J Biol Chem* 268(3), 1646-1649.

Facklam, R. (2002) What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15(4), 613-630.

Fitzgerald, J.R., Foster, T.J. and Cox, D. (2006) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat Rev Microbiol* 4(6), 445-457.

Flores-Diaz, M. and Alape-Giron, A. (2003) Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon* 42(8), 979-986.

Ford, I., Douglas, C.W., Cox, D., Rees, D.G., Heath, J. and Preston, F.E. (1997) The role of immunoglobulin G and fibrinogen in platelet aggregation by *Streptococcus sanguis*. *Br J Haematol* 97(4), 737-746.

Ford, I., Douglas, C.W., Heath, J., Rees, C. and Preston, F.E. (1996) Evidence for the involvement of complement proteins in platelet aggregation by *Streptococcus sanguis* NCTC 7863. *Br J Haematol* 94(4), 729-739.

Foster, C.J., Prosser, D.M., Agans, J.M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J.E., Zhang, F.L., Gustafson, E., Monsma, F.J., Jr., Wiekowski, M.T., Abbondanzo, S.J., Cook, D.N., Bayne, M.L., Lira, S.A. and Chintala, M.S. (2001) Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 107(12), 1591-1598.

Freer, J.H., Arbuthnott, J.P. and Bernheimer, A.W. (1968) Interaction of staphylococcal alpha-toxin with artificial and natural membranes. *J Bacteriol* 95(3), 1153-1168.

Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D. and Wagner, D.D. (2000) P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med* 191(8), 1413-1422.

Frenette, P.S., Moyna, C., Hartwell, D.W., Lowe, J.B., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1998) Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood* 91(4), 1318-1324.

Fung, C.Y., Cendana, C., Farndale, R.W. and Mahaut-Smith, M.P. (2007) Primary and secondary agonists can use P2X(1) receptors as a major pathway to increase intracellular Ca(2+) in the human platelet. *J Thromb Haemost* 5(5), 910-917.

Gachet, C. (2005) The platelet P2 receptors as molecular targets for old and new antiplatelet drugs. *Pharmacol Ther* 108(2), 180-192.

Garcia-Suarez Mdel, M., Vazquez, F. and Mendez, F.J. (2006) *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: An update. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(8), 512-517.

Gasbarrini, A., Franceschi, F., Tartaglione, R., Landolfi, R., Pola, P. and Gasbarrini, G. (1998) Regression of autoimmune thrombocytopenia after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet* 352(9131), 878.

Gawaz, M. (1999) *Das Blutplättchen*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Girgitzova, B., Minkov, N. and Zozikov, B. (1991) *Streptococcus agalactiae* as a urinary tract pathogen in males and non-pregnant females. *Int Urol Nephrol* 23(4), 365-369.

Gong, K., Wen, D.Y., Ouyang, T., Rao, A.T. and Herzberg, M.C. (1995) Platelet receptors for the *Streptococcus sanguis* adhesin and aggregation-associated antigens are distinguished by anti-idiotypical monoclonal antibodies. *Infect Immun* 63(9), 3628-3633.

Gratacap, M.P., Payrastre, B., Viala, C., Mauco, G., Plantavid, M. and Chap, H. (1998) Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent stimulation of phospholipase C-gamma2 is an early key event in Fc-gammaRIIA-mediated activation of human platelets. *J Biol Chem* 273(38), 24314-24321.

Hakansson, S. and Kallen, K. (2006) Impact and risk factors for early-onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. *BJOG* 113(12), 1452-1458.

Harper, M.T. and Poole, A.W. (2007) Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5), 1005-1008.

Hartleib, J., Kohler, N., Dickinson, R.B., Chhatwal, G.S., Sixma, J.J., Hartford, O.M., Foster, T.J., Peters, G., Kehrel, B.E. and Herrmann, M. (2000) Protein A is the von Willebrand factor binding protein on *Staphylococcus aureus*. *Blood* 96(6), 2149-2156.

Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R. and Gachet, C. (2003) A role of the fast ATP-gated P2X1 cation channel in thrombosis of small arteries in vivo. *J Exp Med* 198(4), 661-667.

Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (1998) The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation. *Blood* 92(1), 152-159.

Herzberg, M.C., Brintzenhofe, K.L. and Clawson, C.C. (1983) Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 39(3), 1457-1469.

Hof, H. und Dörries, R. (2005) *Medizinische Mikrobiologie*. 3., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D. and Conley, P.B. (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409(6817), 202-207.

Holmsen, H. (1989) Physiological functions of platelets. *Ann Med* 21(1), 23-30.

Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K. and Walter, U. (1994) Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* 225(1), 21-27.

Jin, J., Daniel, J.L. and Kunapuli, S.P. (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem* 273(4), 2030-2034.

Jonsson, I.M., Pietrocola, G., Speziale, P., Verdrengh, M. and Tarkowski, A. (2005) Role of fibrinogen-binding adhesin expression in septic arthritis and septicemia caused by *Streptococcus agalactiae*. *J Infect Dis* 192(8), 1456-1464.

Kansas, G.S. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88(9), 3259-3287.

Kau, J.H., Sun, D.S., Tsai, W.J., Shyu, H.F., Huang, H.H., Lin, H.C. and Chang, H.H. (2005) Antiplatelet activities of anthrax lethal toxin are associated with suppressed p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in the platelets. *J Infect Dis* 192(8), 1465-1474.

Kauffenstein, G., Bergmeier, W., Eckly, A., Ohlmann, P., Leon, C., Cazenave, J.P., Nieswandt, B. and Gachet, C. (2001) The P2Y<sub>12</sub> receptor induces platelet aggregation through weak activation of the  $\alpha$ (IIb) $\beta$ (3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *FEBS Lett* 505(2), 281-290.

Kerrigan, S.W., Douglas, I., Wray, A., Heath, J., Byrne, M.F., Fitzgerald, D. and Cox, D. (2002) A role for glycoprotein Ib in *Streptococcus sanguis*-induced platelet aggregation. *Blood* 100(2), 509-516.

Korporaal, S.J., Relou, I.A., van Eck, M., Strasser, V., Bezemer, M., Gorter, G., van Berkel, T.J., Nimpf, J., Akkerman, J.W. and Lenting, P.J. (2004) Binding of low density lipoprotein to platelet apolipoprotein E receptor 2' results in phosphorylation of p38MAPK. *J Biol Chem* 279(50), 52526-52534.

Kramer, R.M., Roberts, E.F., Striffler, B.A. and Johnstone, E.M. (1995) Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets. *J Biol Chem* 270(46), 27395-27398.

Kurpiewski, G.E., Forrester, L.J., Campbell, B.J. and Barrett, J.T. (1983) Platelet aggregation by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 39(2), 704-708.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685.

Larson, M.K., Chen, H., Kahn, M.L., Taylor, A.M., Fabre, J.E., Mortensen, R.M., Conley, P.B. and Parise, L.V. (2003) Identification of P2Y<sub>12</sub>-dependent and -independent mechanisms of glycoprotein VI-mediated Rap1 activation in platelets. *Blood* 101(4), 1409-1415.

Ledergerber, D. and Hartmann, R.W. (1995) Development of a screening assay for the in vitro evaluation of thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitors. *J Enzyme Inhib* 9(4), 253-261.

Levi, M., Keller, T.T., van Gorp, E. and ten Cate, H. (2003) Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res* 60(1), 26-39.

Ley, K. (2003) The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med* 9(6), 263-268.

Luck, S., Torny, M., d'Agapeyeff, K., Pitt, A., Heath, P., Breathnach, A. and Russell, A.B. (2003) Estimated early-onset group B streptococcal neonatal disease. *Lancet* 361(9373), 1953-1954.

Macaulay, I.C., Carr, P., Gusnanto, A., Ouwehand, W.H., Fitzgerald, D. and Watkins, N.A. (2005) Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest* 115(12), 3370-3377.

Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Rayburn, H., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1993) Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* 74(3), 541-554.

Mazharian, A., Roger, S., Berrou, E., Adam, F., Kauskot, A., Nurden, P., Jandrot-Perrus, M. and Bryckaert, M. (2007) Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca<sup>2+</sup> mobilization. *J Biol Chem* 282(8), 5478-5487.

McEver, R.P., Beckstead, J.H., Moore, K.L., Marshall-Carlson, L. and Bainton, D.F. (1989) GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* 84(1), 92-99.

McNicol, A. and Jackson, E.C. (2003) Inhibition of the MEK/ERK pathway has no effect on agonist-induced aggregation of human platelets. *Biochem Pharmacol* 65(8), 1243-1250.

Moore, A. (1984) Platelet number and platelet function: their importance in hemostasis. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20(3), 441-442.

Murphy, C.T. and Westwick, J. (1992) Selective inhibition of protein kinase C. Effect on platelet-activating-factor-induced platelet functional responses. *Biochem J* 283 ( Pt 1), 159-164.



Ni, H. and Freedman, J. (2003) Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus Apher Sci* 28(3), 257-264.

O'Brien, J.R. (1990) Shear-induced platelet aggregation. *Lancet* 335(8691), 711-713.

O'Brien, L., Kerrigan, S.W., Kaw, G., Hogan, M., Penades, J., Litt, D., Fitzgerald, D.J., Foster, T.J. and Cox, D. (2002) Multiple mechanisms for the activation of human platelet aggregation by *Staphylococcus aureus*: roles for the clumping factors ClfA and ClfB, the serine-aspartate repeat protein SdrE and protein A. *Mol Microbiol* 44(4), 1033-1044.

Oethinger, M. (2004) *Kurzlehrbuch Mikrobiologie und Immunologie*. 11. Auflage, München, Urban und Fischer, Elsevier GmbH.

Ofose, F.A. (2002) The blood platelet as a model for regulating blood coagulation on cell surfaces and its consequences. *Biochemistry (Mosc)* 67(1), 47-55.

Ohlmann, P., Laugwitz, K.L., Nurnberg, B., Spicher, K., Schultz, G., Cazenave, J.P. and Gachet, C. (1995) The human platelet ADP receptor activates Gi2 proteins. *Biochem J* 312 ( Pt 3), 775-779.

Palma, M., Shannon, O., Quezada, H.C., Berg, A. and Flock, J.I. (2001) Extracellular fibrinogen-binding protein, Efb, from *Staphylococcus aureus* blocks platelet aggregation due to its binding to the alpha-chain. *J Biol Chem* 276(34), 31691-31697.

Pampolina, C. and McNicol, A. (2005) *Streptococcus sanguis*-induced platelet activation involves two waves of tyrosine phosphorylation mediated by FcγRIIA and αIIbβ3. *Thromb Haemost* 93(5), 932-939.

Pietrocola, G., Schubert, A., Visai, L., Torti, M., Fitzgerald, J.R., Foster, T.J., Reinscheid, D.J. and Speziale, P. (2005) FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. *Blood* 105(3), 1052-1059.

Polgar, J., Matuskova, J. and Wagner, D.D. (2005) The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 3(8), 1590-1596.

Prinz, C., Schwendy, S. and Volland, P. (2006) *H pylori* and gastric cancer: shifting the global burden. *World J Gastroenterol* 12(34), 5458-5464.

Puopolo, K.M., Madoff, L.C. and Eichenwald, E.C. (2005) Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics* 115(5), 1240-1246.

Rasmussen, M., Eden, A. and Bjorck, L. (2000) ScIA, a novel collagen-like surface protein of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 68(11), 6370-6377.

Rhee, S.G. and Bae, Y.S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272(24), 15045-15048.

Ribatti, D. and Crivellato, E. (2007) Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res* 31(10), 1339-1341.

Romo, G.M., Dong, J.F., Schade, A.J., Gardiner, E.E., Kansas, G.S., Li, C.Q., McIntire, L.V., Berndt, M.C. and Lopez, J.A. (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med* 190(6), 803-814.

Rosenau, A., Martins, K., Amor, S., Gannier, F., Lanotte, P., van der Mee-Marquet, N., Mereghetti, L. and Quentin, R. (2007) Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. *Infect Immun* 75(3), 1310-1317.

Ruggeri, Z.M. and Mendolicchio, G.L. (2007) Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res* 100(12), 1673-1685.

Savi, P., Pflieger, A.M. and Herbert, J.M. (1996) cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 7(2), 249-252.

Schmugge, M., Rand, M.L. and Freedman, J. (2003) Platelets and von Willebrand factor. *Transfus Apher Sci* 28(3), 269-277.

Schrag, S., Gorwitz, R., Fultz-Butts, K. and Schuchat, A. (2002) Prevention of perinatal group B streptococcal disease. Revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep* 51(RR-11), 1-22.

Schwarz, U.R., Geiger, J., Walter, U. and Eigenthaler, M. (1999) Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 82(3), 1145-1152.

Schwarz, U.R., Kobsar, A.L., Koksche, M., Walter, U. and Eigenthaler, M. (2000) Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol* 60(9), 1399-1407.

Siauw, C., Kobsar, A., Dornieden, C., Beyrich, C., Schinke, B., Schubert-Unkmeir, A., Abele-Horn, M., Speer, C.P. and Eigenthaler, M. (2006) Group B streptococcus isolates from septic patients and healthy carriers differentially activate platelet signaling cascades. *Thromb Haemost* 95(5), 836-849.

Siboo, I.R., Cheung, A.L., Bayer, A.S. and Sullam, P.M. (2001) Clumping factor A mediates binding of *Staphylococcus aureus* to human platelets. *Infect Immun* 69(5), 3120-3127.

Speer, C.P. und Gahr, M. (2005) Pädiatrie. 2., vollständig neubearbeitete Auflage, Heidelberg, Springer Medizin Verlag.

Stanek, G. and Strle, F. (2003) Lyme borreliosis. *Lancet* 362(9396), 1639-1647.

Stull, J.T., Tansey, M.G., Tang, D.C., Word, R.A. and Kamm, K.E. (1993) Phosphorylation of myosin light chain kinase: a cellular mechanism for Ca<sup>2+</sup> desensitization. *Mol Cell Biochem* 127-128, 229-237.

Sullam, P.M., Bayer, A.S., Foss, W.M. and Cheung, A.L. (1996) Diminished platelet binding in vitro by *Staphylococcus aureus* is associated with reduced virulence in a rabbit model of infective endocarditis. *Infect Immun* 64(12), 4915-4921.

Sullam, P.M., Jarvis, G.A. and Valone, F.H. (1988) Role of immunoglobulin G in platelet aggregation by viridans group streptococci. *Infect Immun* 56(11), 2907-2911.

Tabuchi, A., Yoshioka, A., Higashi, T., Shirakawa, R., Nishioka, H., Kita, T. and Horiuchi, H. (2003) Direct demonstration of involvement of protein kinase Calpha in the Ca<sup>2+</sup>-induced platelet aggregation. *J Biol Chem* 278(29), 26374-26379.

Takahashi, Y., Takashima, E., Shimazu, K., Yagishita, H., Aoba, T. and Konishi, K. (2006) Contribution of sialic acid-binding adhesin to pathogenesis of experimental endocarditis caused by *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun* 74(1), 740-743.

Takahashi, Y., Yajima, A., Cisar, J.O. and Konishi, K. (2004) Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. *Infect Immun* 72(7), 3876-3882.

Takamatsu, D., Bensing, B.A., Prakobphol, A., Fisher, S.J. and Sullam, P.M. (2006) Binding of the streptococcal surface glycoproteins GspB and Hsa to human salivary proteins. *Infect Immun* 74(3), 1933-1940.

Takano, S., Kimura, J., Matsuoka, I. and Ono, T. (1999) No requirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* 372(3), 305-309.

Tang, Y.Q., Yeaman, M.R. and Selsted, M.E. (2002) Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 70(12), 6524-6533.

Taylor, J.K., Hall, R.W. and Dupre, A.R. (2002) The incidence of group B streptococcus in the vaginal tracts of pregnant women in central Alabama. *Clin Lab Sci* 15(1), 16-17.

Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Cornelissen, H., De Vos, R., Vermeylen, J. and Hoylaerts, M.F. (2003) P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation. *J Biol Chem* 278(47), 46661-46667.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9), 4350-4354.

Troup, S.B. and Luscher, E.F. (1962) Hemostasis and platelet metabolism. *Am J Med* 33, 161-165.

Troxler, M., Dickinson, K. and Homer-Vanniasinkam, S. (2007) Platelet function and antiplatelet therapy. *Br J Surg* 94(6), 674-682.

Vial, C., Pitt, S.J., Roberts, J., Rolf, M.G., Mahaut-Smith, M.P. and Evans, R.J. (2003) Lack of evidence for functional ADP-activated human P2X1 receptors supports a role for ATP during hemostasis and thrombosis. *Blood* 102(10), 3646-3651.

Wasiluk, A., Matur, M., Szczepanski, M., Kemon, H., Baran, E. and Kemon-Chetnik, I. (2008) The effect of gestational age on platelet surface expression of CD62P in preterm newborns. *Platelets* 19(3), 236-238.

Williams, M.J., Du, X., Loftus, J.C. and Ginsberg, M.H. (1995) Platelet adhesion receptors. *Semin Cell Biol* 6(5), 305-314.

Wood, E.G. and Gray, B.M. (1986) Type-specific antibody prevents platelet aggregation induced by group B streptococci type III. *J Lab Clin Med* 107(4), 322-326.

Wu, K.K. (1996) Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J Intern Med* 239(1), 17-34.

Yeaman, M.R. and Bayer, A.S. (1999) Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat* 2(2), 116-126.

Zimmerman, T.S. and Spiegelberg, H.L. (1975) Pneumococcus-induced serotonin release from human platelets. Identification of the participating plasma/serum factor as immunoglobulin. *J Clin Invest* 56(4), 828-834.

## 7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: a) Klinisches Bild einer GBS-Infektion und b) prozentualer Anteil von GBS an der early-onset Sepsis (Berner 2003).....	1
Abbildung 2: Thrombozytenaktivierung durch ADP und ATP (Gachet 2005) .....	6
Abbildung 3: Ausgewählte Signalwege im Thrombozyten (nach Siau et al. 2006) .....	8
Abbildung 4: Beispielhafte Ladeweise der Gele .....	28
Abbildung 5: Thrombozytenaggregation durch GBS-Stämme (Siau et al. 2006) .....	30
Abbildung 6: Thrombozytäre CD62P-Expression durch verschiedene GBS-Stämme (Siau et al. 2006) .....	31
Abbildung 7: Thromboxansynthese durch verschiedene GBS-Stämme (Siau et al. 2006) .....	31
Abbildung 8: Fibrinogenbindung verschiedener GBS-Stämme (Siau et al. 2006) .....	32
Abbildung 9: GBS induzierte Aktivierung des FCyRIIA-regulierten Signalweges in humanen Thrombozyten (Siau et al. 2006).....	33
Abbildung 10: Aggregationsverlauf des septischen Stammes ATCC <sup>sept</sup> .....	35
Abbildung 11: Aggregation in % (+/- Standardfehler (SEM)) von ATCC <sup>sept</sup> .....	36
Abbildung 12: Aggregationsverlauf der kolonisierenden Stämme E 10 <sup>col</sup> , E 50 <sup>col</sup> und E 52 <sup>col</sup> .....	37
Abbildung 13: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der kolonisierenden Stämme E 10col, E 50col und E 52col .....	38
Abbildung 14: Aggregationsverlauf der Meningitisstämme E 111 <sup>men</sup> , E 118 <sup>men</sup> und E 130 <sup>men</sup> .....	39
Abbildung 15: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Meningitisstämme E 111 <sup>men</sup> , E 118 <sup>men</sup> und E 130 <sup>men</sup> .....	40
Abbildung 16: Aggregationsverlauf der letalen Stämme E 2 <sup>let</sup> , E 150 <sup>let</sup> und E 186 <sup>let</sup> .....	41

Abbildung 17: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der letalen Stämme E 2 <sup>let</sup> , E 150 <sup>let</sup> und E 186 <sup>let</sup> .....	42
Abbildung 18: Aggregationsverlauf der Stämme aus Vaginalabstrichen mHM <sup>vag</sup> und A9 <sup>vag</sup> .....	43
Abbildung 19: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Stämme aus Vaginalabstrichen mHM <sup>vag</sup> und A9 <sup>vag</sup> .....	44
Abbildung 20: Aggregationsverlauf der Stämme aus Ohrabstrichen KA <sup>Ohr</sup> und ZJ <sup>Ohr</sup> .....	45
Abbildung 21: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) der Stämme aus Ohrabstrichen KA <sup>Ohr</sup> und ZJ <sup>Ohr</sup> .....	46
Abbildung 22: Aggregationsverlauf des aus Magensaft isolierten Stammes EK <sup>Gas</sup> .....	47
Abbildung 23: Aggregation in % nach 10 min Inkubation (+/- SEM) des aus Magensaft isolierten Stammes EK <sup>Gas</sup> .....	48
Abbildung 24: a) Aktivierung des PKC-Signalweges, b) Aktivierung des p38-Signalweges, c) Aktivierung des MLC-Signalweges und d) Aktin als Loading Control.....	49
Abbildung 25: Aggregationsverlauf für ATCC <sup>sep</sup> ohne ADP (rote Kurve) und mit ADP (blaue Kurve).....	52
Abbildung 26: Aggregationsverlauf der verschiedenen GBS-Stämme mit ADP (blaue Kurve) und ohne ADP (rote Kurve) .....	53



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Streptokokken nach ihrem Hämolyseverhalten (Oethinger 2004, Facklam 2002).....	11
Tabelle 2: Verwendete B-Streptokokkenstämme .....	24
Tabelle 3: Aggregation in % und SEM von ATCC <sup>sept</sup> .....	36
Tabelle 4: Aggregation in % und SEM der kolonisierenden Stämme E 10 <sup>col</sup> , E 50 <sup>col</sup> und E 52 <sup>col</sup> .....	38
Tabelle 5: Aggregation in % und SEM der Meningitisstämme E 111 <sup>men</sup> , E 118 <sup>men</sup> und E 130 <sup>men</sup> .....	40
Tabelle 6: Aggregation in % und SEM der letalen Stämme E 2 <sup>let</sup> , E 150 <sup>let</sup> und E 186 <sup>let</sup> .....	42
Tabelle 7: Aggregation in % und SEM der Stämme aus Vaginalabstrichen mHM <sup>vag</sup> und A9 <sup>vag</sup> .....	44
Tabelle 8: Aggregation in % und SEM der Stämme aus Ohrabstrichen KA <sup>Ohr</sup> und ZJ <sup>Ohr</sup> .....	46
Tabelle 9: Aggregation in % und SEM des aus Magensaft isolierten Stammes EK <sup>Gas</sup> .....	48
Tabelle 10: T-Test der 1-Minutenwerte im Vergleich zu E 150 <sup>men</sup> 1 min (p gibt hierbei das Signifikanzniveau des Unterschieds an).....	50
Tabelle 11: Aggregation in % nach 10 min ohne und mit Zusatz von ADP, SEM und p als Signifikanz für den Unterschied.....	51

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank ist an Herrn Prof. Dr. med. Martin Eigenthaler gerichtet, der das Thema dieser Arbeit gestellt und mir immer im notwendigen Umfang fördernd zur Seite gestanden hat. Ebenfalls ein großes Dankeschön gilt Dr. Anna Kobsar für die kompetente und hilfreiche Zusammenarbeit und die Betreuung der Tätigkeiten im Labor. Allen übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Pathobiochemie der Universität Würzburg danke ich gleichermaßen für die jederzeitige freundliche Hilfe.

Bei Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferats.

Auch meinen Freunden, die stets ein offenes Ohr für mich hatten, danke ich herzlich. Schließlich bleibt noch meinen Eltern zu danken, die mir durch ihre fortwährende Unterstützung das Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

## Lebenslauf

### Angaben zur Person:

Name: Catharina Sophie Dornieden  
Geburtstag und -ort: 03.10.1982 in Göttingen  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung:

1989-1993 Liobaschule, Grundschule in Vechta  
1993-2002 Liebfrauenschule Vechta, staatlich anerkanntes  
Gymnasium für Mädchen, Abschluss der allgemeinen  
Hochschulreife  
1999 Viermonatiger Besuch der Notre Dame Academy in Toledo,  
Ohio, USA

### Berufsausbildung:

10/2002-05/2009 Humanmedizinstudium an der Universität Würzburg  
09/2004 Physikum  
02/2008-01/2009 Praktisches Jahr  
1. Terial in der Gynäkologie und Geburtshilfe am  
Universitätsklinikum Würzburg  
2. Terial in der Inneren Medizin am Universitätsklinikum  
Würzburg  
3. Terial in der Chiurgie am Leopoldina-Krankenhaus in  
Schweinfurt  
19. Mai 2009 2. Ärztliche Prüfung  
02.06.2009 Approbation als Ärztin  
seit 01.07.2009 Assistenzärztin in der Universitäts-Frauenklinik Würzburg

### Studienbegleitende Tätigkeiten:

#### Famulaturen

02/2005-03/2005 Allgemein-/Unfall- und Viszeralchirurgie am Marienhospital  
in Vechta  
08/2005-09/2005 Laboratoriumsmedizin am Institut für klinische Biochemie  
und Pathobiochemie der Universität Würzburg  
08/2006-09/2006 Innere Medizin in einer Facharztpraxis in Duderstadt  
03/2007-04/2007 Kinder- und Jugendmedizin am Marienhospital Vechta

Seit 2005 verschiedene Vorpraktika und Famulatur im Institut für klinische Biochemie  
und Pathobiochemie, seit August 2008 Doktorarbeit im Institut für klinische Biochemie  
und Pathobiochemie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. med. Martin Eigenthaler

Würzburg, August 2009