

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1 Physiologie und Morphologie der Thrombozyten	1
I.2 Thrombozyten in der Hämostase	3
I.3 Bedeutung der Thrombozyten in der Inflammation, Infektion und Tumormetastasierung	8
I.3.1 Thrombozyten in der Inflammation und Tumormetastasierung	9
I.3.2 Thrombozyten in der Infektion	11
I.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	16
I.4.1 Entstehung einer infektiösen Endokarditis durch <i>S. aureus</i>	17
I.4.2 Bakterielle Persistenzmechanismen	19
I.5 Extracellular adherence protein (Eap)	21
I.5.1 Molekulare Struktur von Eap	22
I.5.2 Interaktionen von Eap mit den Wirtsstrukturen und mit der Oberfläche von <i>S. aureus</i>	22
I.5.3 Eap als entzündungs- und immunmodulierender Faktor	25
I.5.4 Eap interferiert mit Metastasevorgängen und Wundheilungsmechanismen	27
I.6 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	32
II. Material und Methoden	35
II.1 Geräte	35
II.2 Chemikalien	36
II.2.1 Verwendete Antikörper	36
II.3 Präparation der Thrombozyten	37
II.3.1 Plättchenisolierung durch Zentrifugation	37
II.3.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl/ μ l Blut	38
II.3.3 Separation der Thrombozyten von Plasmaproteinen mit Hilfe der Gelfiltration	38
II.3.4 Herstellung von plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma (PPP))	39
II.4 Aktivierung der Thrombozyten <i>in vitro</i>	39
II.4.1 Eap	39
II.4.2 Thrombin	40
II.4.3 ADP	41
II.4.4 Kollagen	42

II.5 Durchflusszytometrie	42
II.5.1 Optische Technik und Signaldetektion	42
II.5.2 Signalverarbeitung und Signalanalyse	45
II.6 Detektion der Plättchenaktivierung	46
II.6.1 Fibrinogenbindung	46
II.6.1.a Markierung von Fibrinogen, FVIIa, FVIII und FXIII mit Fluoresceinisothiocyanat	47
II.6.2 Aggregometrie	49
II.6.3 Sekretion der α -Granula	50
II.6.4 Expression von CD63	51
II.6.5 Eap-induzierte Freisetzung von Mepacrin aus den Thrombozyten	51
II.6.6 Expression von CD154 (CD40 Ligand, CD40L)	52
II.6.7 Prokoagulanter Zustand	52
II.6.7.a Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von Annexin-V-FITC	53
II.6.7.b Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIIa-FITC	53
II.6.7.c Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FVIII-FITC	54
II.6.7.d Nachweis der prokoagulanten Thrombozytenoberfläche durch Bindung von FXIII-FITC	54
II.6.8 Mikropartikelbildung	54
II.7 Einfluss von Antikoagulanzien auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung	55
II.7.1 Komplexbildner	55
II.7.2 Hirudin	56
II.7.3 Melagatran	56
II.7.4 Heparine	57
II.8 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Thrombozytenaktivierung	58
II.8.1 pCMPS und DTNB	58
II.8.2 Glutathion	59
II.8.3 Gliotoxin	60
II.8.4 Phenylarsinoxid	60
II.8.5 Bacitracin	61
II.9 Statistische Auswertung aller experimentellen Daten	61

III. Ergebnisse	62
III.1 Untersuchungen zum Einfluss von Eap auf Thrombozyten	62
III.1.1 Eap-induzierte Fibrinogenbindung an humane Thrombozyten	62
III.1.2 Vergleich der Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten induziert durch Eap, Thrombin, ADP und Kollagen	64
III.1.3 Aggregometrie	67
III.1.4 Eap-induzierte Sekretion der α -Granula aus humanen Thrombozyten ..	69
III.1.5 Eap induzierte Sekretion der „dense bodies“ aus humanen Thrombozyten	69
III.1.6 Eap-induzierte Freisetzung von Mepacrin aus humanen Thrombozyten	70
III.1.7 Eap-induzierte Expression von CD40 Ligand auf der Oberfläche humarer Thrombozyten	71
III.1.8 Eap-induzierte prokoagulante Aktivität humaner Thrombozyten	72
III.1.9 Mikropartikelbildung	73
III.2 Einfluss von Antikoagulanzien auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	74
III.3 Einfluss von thiolreaktiven Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humarer Thrombozyten	77
III.3.1 Einfluss von DTNB und pCMPS auf die Eap-induzierte Aktivierung humarer Thrombozyten	77
III.3.1.a Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	77
III.3.1.b Einfluss von DTNB auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten	78
III.3.1.c Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	79
III.3.1.d Einfluss von pCMPS auf die Eap-induzierte Bindung von anti-CD62P-FITC an humane Thrombozyten	80
III.3.2 Einfluss von GSH auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	81
III.3.3 Einfluss von Gliotoxin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	82
III.3.4 Einfluss von PAO auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	83
III.3.5 Einfluss von Bacitracin auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten	84

III.4 Vergleich der Agonist-induzierten Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.....	85
III.4.1 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten der Ratte	88
III.4.2 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an equine Thrombozyten.....	89
III.4.3 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an bovine Thrombozyten.....	91
III.4.4 Agonist-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an Thrombozyten des Hundes.....	92
IV. Diskussion.....	94
IV.1 Einfluss von Eap auf humane Thrombozyten.....	94
IV.1.1 Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen an humane Thrombozyten.....	94
IV.1.2 Sekretion der α -Granula induziert durch Eap.....	97
IV.1.3 Sekretion der „dense bodies“ induziert durch Eap.....	99
IV.1.4 Eap-induzierte Expression von CD40L auf der Oberfläche humarer Thrombozyten	101
IV.1.5 Eap induziert eine prokoagulante Oberfläche auf humanen Thrombozyten.....	102
IV.1.6 Einfluss verschiedener Antikoagulanzien auf die Eap-induzierte Bindung von Fibrinogen-FITC an humane Thrombozyten.....	105
IV.1.7 Einfluss thiolreaktiver Substanzen auf die Eap-induzierte Aktivierung humarer Thrombozyten.....	108
IV.2 Vergleich der Agonist-induzierten Aktivierung von Thrombozyten des Menschen und anderer Säuger.....	115
V. Ausblick.....	121
VI. Zusammenfassung.....	123
VII. Summary.....	127
VIII. Abkürzungsverzeichnis	131
IX. Literaturverzeichnis.....	136

X. Anhang.....	155
X.1 Publikationen.....	155
X.1.1 Veröffentlichte Abstracts.....	155
X.1.2 Manuskript in Bearbeitung.....	155
X.2 Danksagung.....	156
X.3 Erklärung.....	157