

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
(Direktor Univ.- Prof. Thomas Thiele)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema: Interaktion zwischen Thrombozyten und verschiedenen *Streptococcus pneumoniae*
Stämmen

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2025

vorgelegt von
Axel Florian Aschenbrenner
geb. am: 29.08.1996
in: Anklam

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Greinacher
2. Gutachter: Prof. Dr. Peter Bugert
Ort, Raum: Universitätsmedizin Greifswald,
Seminarraum 5.4.11/.10 - J 04.33 /.34, DZ 7, 4. Etage
Tag der Disputation: 06. Oktober 2025

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Thrombozyten	1
1.1.1 Funktion in der Hämostase	1
1.1.1 Rezeptoren mit immunologischem Potential	1
1.1.2 Chemokine und antimikrobielle Moleküle	2
1.1.3 Interaktion von Thrombozyten mit Immunzellen	2
1.1.4 Antimikrobielle Wirkung	3
1.2 Pneumokokken	3
1.2.1 Charakteristik der Pneumokokken	3
1.2.2 Bedeutung von Pneumokokken als Krankheitserreger	3
1.2.3 Virulenzfaktoren der Pneumokokken	3
1.2.4 Serotypen	4
1.3 Interaktion im Grenzfeld	4
1.4 Zielsetzung	5
2 Material und Methoden	6
2.1 Material	6
2.1.1 Chemikalien	6
2.1.2 Biologisches Material	7
2.1.3 Antikörper	7
2.1.4 Geräte	8
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	9
2.1.6 Software	10
2.1.7 Lösungen und Puffer	10
2.2 Methoden	12
2.2.1 Gewinnung einer Thrombozytensuspension nach HIPA-Protokoll	12
2.2.2 Anzucht von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	12
2.2.3 Bestimmung der CFU der verschiedenen Pneumokokkenstämme im Verhältnis zur OD ₆₀₀ .	12
2.2.4 Herstellung von Thrombozyten-Releasaten	13
2.2.5 Herstellung von Thrombozytenlysaten	13
2.2.6 Auftrennung von Thrombozytenlysaten	14

2.2.7 Inkubation von Thrombozyten mit Bakterien und verschiedenen Antikörpern	14
2.2.8 Antikörpermarkierung von CD62P und CD41 zur Messung des CD62P Signals von Thrombozyten	15
2.2.9 Messung der Thrombozytenkonzentration unter Verwendung von CountBright™ absolute counting beads	16
2.2.10 Koloniebestimmung von Pneumokokken nach Inkubation mit Thrombozyten, Lysaten und Releasaten	16
3 Ergebnisse	17
3.1 CD62P Signal von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken-Stämmen	17
3.1.1 Wildtyp Pneumokokken führen zu einem höheren CD62P Signal der Thrombozyten als pneumolysin-defiziente Mutanten	17
3.1.2 Inkubation mit D39, TIGR4 und 19F führt zu einer verminderten Reaktion der Thrombozyten auf TRAP-6	17
3.2 Einfluss von anti-Pneumolysin-Antikörpern und i.v. IgG auf das CD62P Signal von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokkenstämmen	20
3.3 Einfluss von i.v. IgG auf die Konzentration von Thrombozyten	23
3.4 Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen Pneumokokken Stämmen	26
3.4.1 Thrombozyten beeinflussen das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply	26
3.4.2 Der Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von TIGR 4 und TIGR4 Δ ply wird durch i.v. IgG aufgehoben	26
3.4.3 Der Einfluss auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply wird durch hitzebeständige Moleküle mit einer Größe von über 10 kDa ausgelöst	29
4 Diskussion	33
4.1 Einordnung der wichtigen Ergebnisse	33
4.1.1 Haben Pneumokokken einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion?	33
4.1.2 Haben pneumolysinfreie Mutanten einen anderen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion als Wildtyp-Pneumokokken?	33
4.1.3 Haben Thrombozyten einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken? Gibt es stammspezifische Unterschiede oder eine Abhängigkeit von Pneumolysin im Einfluss von Thrombozyten auf das Pneumokokkenwachstum?	34

4.1.4 Haben pneumolysinspezifische Antikörper oder humane Antikörpergemische (i.v. IgG) einen Einfluss auf die Pneumokokken-Thrombozyten Interaktion?	34
4.1.5 Kann eine Substanz aus den Thrombozyten identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken hat?	36
4.2 Anknüpfungspunkte für künftige Forschung	36
4.2.1 Anwendungen von humanem IgG	36
4.2.2 Ausweitung auf weitere Serotypen	36
4.2.3 Zusammenspiel mit anderen Immunzellen	37
4.2.4 Sonstige Anknüpfungspunkte	37
5 Zusammenfassung	38
6 Literaturverzeichnis	39
7 Appendix	47

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Herstellung von Thrombozyten-Releasaten und -Lysaten.	14
Abbildung 2	Abbildung 2 - Differenzierung zwischen Bakterien und Thrombozyten im FC500.	16
Abbildung 3	CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit D39, TIGR4 und ihren Mutanten.	18
Abbildung 4	CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit 6B und 19F.	19
Abbildung 5	CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit D39 und TIGR4.	21
Abbildung 6	CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit 6B und 19F.	22
Abbildung 7	Konzentration von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken Stämmen und i.v. IgG.	23
Abbildung 8	CD62P Expression (MFI) auf Thrombozyten nach Inkubation über 120, 180 und 240 Minuten mit i.v. IgG und verschiedenen Pneumokokken Mutanten.	25
Abbildung 9	Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen <i>S. pneumoniae</i> Stämmen.	27
Abbildung 10	Einfluss von i.v. IgG in Kombination mit Thrombozyten auf das Wachstum verschiedener <i>S. pneumoniae</i> Stämme.	28
Abbildung 11	Einfluss von Releasate und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4.	30
Abbildung 12	Einfluss von Releasate und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4 Δ ply.	31
Abbildung 13	Einfluss von verschieden behandelten Lysaten auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply.	32

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Konzentration von verschiedenen Pneumokokkenstämmen bei einer OD600 von 1.	13
Tabelle 2	Inkubation von Thrombozyten mit verschiedenen S. pneumoniae Stämmen sowie die Kontrolle der Reagibilität auf TRAP-6.	50
Tabelle 3	Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen S. pneumoniae Stämmen oder PBS.	50
Tabelle 4	Inkubation von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen S. pneumoniae Stämmen und verschiedenen Antikörpern sowie der Reagibilität auf TRAP-6.	51
Tabelle 5	Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen S. pneumoniae Stämmen und verschiedenen Antikörpern.	51
Tabelle 6	Vergleich der Konzentration von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken Stämmen ohne und mit i.v. IgG.	51
Tabelle 7	Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen S. pneumoniae Mutanten und i.v. IgG.	52
Tabelle 8	Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen S. pneumoniae Stämmen.	52
Tabelle 9	Einfluss von i.v. IgG in Kombination mit Thrombozyten auf das Wachstum verschiedener S. pneumoniae Stämme.	53
Tabelle 10	Einfluss von Releasate und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply.	53
Tabelle 11	Einfluss gefilterter und verdauter Lysate auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply.	54

Formelverzeichnis

Formel 1	Berechnung des benötigten Volumens der Bakteriensuspension (V(Bak)).	15
----------	--	----

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Funktion in der Hämostase

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellen. Nach ihrer Bildung aus Megakaryozyten zirkulieren sie für 5-7 Tage durch das Blutsystem (1). Die bekannteste Aufgabe der Thrombozyten ist die Hämostase. Hierbei sind sie verantwortlich für die erste Reaktion auf Verletzungen des Gefäßsystems. Dabei werden Defekte durch ein Zusammenspiel der plasmatischen Gerinnung, der Vernetzung der Thrombozyten untereinander und der Bindung an die extrazelluläre Matrix verschlossen (1–4). Eine bedeutende Rolle spielen die verschiedenen Oberflächenproteine und Rezeptoren der Thrombozyten. So ist die Bindung an die extrazelluläre Matrix durch Kollagen über die Glykoproteine (GP) VI und GP Ia/IIa oder durch den von-Willebrand-Faktor über einen Komplex von GP Ib/V/IX möglich (1,2,4). Nach Aktivierung von GP IIb/IIIa erfolgt die Vernetzung von Thrombozyten untereinander durch Fibrinogen zur Bildung eines stabilen Thrombus (1,3).

Neben dieser klassischen Funktion der Thrombozyten rückt ihre Bedeutung für Entzündungsreaktionen, neurodegenerative Erkrankungen und auch bei Infektionsprozessen immer mehr in den Fokus. Dabei spielen sowohl Oberflächenproteine als auch Moleküle, die aus Granula der Thrombozyten freigesetzt werden, eine wichtige Rolle als Mediatoren und Botenstoffe (1,4–7).

1.1.1 Rezeptoren mit immunologischem Potential

Insbesondere die Bedeutung von Thrombozyten als Zellen des Immunsystems ist Teil der aktuellen wissenschaftlichen Betrachtung, da die Thrombozyten beim Eindringen von Pathogenen in die Blutbahn in direktem Kontakt mit diesen stehen (6,8,9).

Bei der Untersuchung ihrer Interaktion mit Krankheitserregern wurden auf der Oberfläche von Thrombozyten verschiedene Rezeptoren nachgewiesen, welchen eine Funktion im Immunsystem zugeordnet wird.

So besitzen Thrombozyten alle neun Toll-like Rezeptoren (TLR), von denen jedoch nicht für alle eine Funktionalität gezeigt werden konnte (1,6). TLRs sind in der Lage, typische virale oder bakterielle Moleküle zu erkennen und zu binden. Insbesondere für die TLR 2 und 4 wurde eine Aktivierung von Thrombozyten nach Pathogenkontakt beschrieben. Beispielsweise zeigten Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Streptokokken der Gruppe B oder Zytomegalie-Viren eine Aktivierung, welche auf Bindungen an den TLR 2 zurückzuführen war

(10,11). Für den TLR 4 wurden ähnliche Effekte nach Inkubation mit Lipopolysacchariden aus *Escherichia coli* und dem Nichtstrukturprotein 1 aus Dengue-Viren beobachtet (12,13).

Zudem finden sich auf der Oberfläche von Thrombozyten C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie der DC-SIGN und CLEC-2. Auch diese binden bakterielle und virale Proteine, wie solche des Humanen-Immundefizienz-Virus-1 (14).

Außerdem präsentieren Thrombozyten Rezeptoren für den Fc Teil von Immunglobulin G (IgG). So ist die Aktivierung durch viele Krankheitserreger, wie beispielsweise *Escherichia coli* oder das Influenza-Virus H1N1 möglich (15–18).

Nicht zuletzt scheinen auch andere Rezeptoren der Thrombozyten, welche keine primäre immunologische Funktion haben, direkt oder indirekt mit Pathogenen zu interagieren und dadurch zu einer Aktivierung zu führen. Als Beispiele sind Bindungen des Staphylokokken Superantigen-like Protein 5 an GP Iba und GP VI oder die Aktivierung von Thrombozyten durch fibrinogengebundene Bakterien über GP IIb/IIIa zu nennen (8,17,19).

1.1.2 Chemokine und antimikrobielle Moleküle

Die Aktivierung der Thrombozyten über die verschiedenen Rezeptoren führt zu mehreren Reaktionen innerhalb der Zellen. Dabei kommt es zur Fusion von Granula mit der Zellmembran und zur Ausschüttung beziehungsweise Präsentation der beinhalteten Substanzen und Oberflächenproteine (1,6).

Neben Molekülen wie ADP, die eine Potenzierung der Aktivierung der Thrombozyten zur Folge haben, beinhalten die Granula beziehungsweise das Zytoplasma der Thrombozyten auch verschiedene antimikrobielle Substanzen. Sowohl die Ausschüttung von humanem α 1-Defensin als auch von humanem β 1-Defensin (hBD-1) durch Thrombozyten wurde beschrieben. Diese Defensine zeigten einen wachstumshemmenden Effekt auf *Staphylococcus aureus* sowie *Escherichia coli* (6,20–22).

Zudem werden durch die Thrombozyten verschiedene Chemokine sezerniert, die weitere Immunzellen anlocken und diese aktivieren. Zu diesen Chemokinen zählen beispielsweise der Plättchenfaktor 4, CXCL7, CCL5, TNF- α , sCD40L oder Interleukin 1 β (9,11,22,23).

1.1.3 Interaktion von Thrombozyten mit Immunzellen

Schließlich interagieren Thrombozyten bei Infektionen mit verschiedenen Immunzellen zum Beispiel über P-Selektin (CD62P), den CD40 Liganden oder das neutrophilen-aktivierendes Peptid 2 (7,9,24–26).

1.1.4 Antimikrobielle Wirkung

In vitro wurde in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt, dass Thrombozyten durch diese genannten Mechanismen in der Lage sind, Pathogene wie *Staphylococcus aureus* oder *Escherichia coli* zu eliminieren (20,27,28). Zudem findet jenseits der direkten Eliminierung eine effiziente Bindung von Pathogenen durch Thrombozyten statt, wodurch ihre Verbreitung verhindert wird und somit eine Verhinderung der Verbreitung statt (29).

1.2 Pneumokokken

1.2.1 Charakteristik der Pneumokokken

Streptococcus pneumoniae ist ein grampositives, fakultativ anaerobes und fakultativ pathogenes Bakterium (30,31). Insbesondere Kinder zeigen eine Besiedlung mit Pneumokokken (30). Seit der Erstbeschreibung durch Louis Pasteur 1881 wurden inzwischen mehr als 97 Serotypen entdeckt, welche sich durch individuelle Kapselstrukturen auszeichnen (32–34).

1.2.2 Bedeutung von Pneumokokken als Krankheitserreger

Zu den typischen Erkrankungen, welche durch Pneumokokken ausgelöst werden, zählen die Otitis media, die bakterielle Meningitis, die Pneumokokken Sepsis sowie die Pneumokokken Pneumonie (30,31,33–35). Unter den Krankheitserregern der ambulant erworbenen Pneumonie und der ambulant erworbenen Meningitis stehen Pneumokokken weltweit an einer der vorderen Stellen und sind dabei jährlich für mehrere hunderttausend Infektionen verantwortlich (31,36–38). Sepsis, Pneumonie und Meningitis durch Pneumokokken werden zusammen als invasive Pneumokokken Erkrankungen (IPE) gezählt (39,40).

1.2.3 Virulenzfaktoren der Pneumokokken

Pneumokokken besitzen eine Vielzahl an Virulenzfaktoren, wie beispielsweise die Polysaccharidkapsel oder intrazelluläre und sekretierte Proteine wie Pneumolysin (Ply) oder IgA-Proteasen (30,32–35,41).

Die Kapselstruktur stellt einen Schutzmechanismus gegen die Immunmechanismen des menschlichen Körpers dar, wie zum Beispiel die Phagozytose durch Immunzellen oder Markierung durch Antikörper (33–35,42).

Pneumolysin ist ein 53 kDA großes Protein, welches in allen Pneumokokkenstämmen vorkommt und durch Polymerisierung zur Bildung von Poren führt (35). Aufgrund des ubiquitären Vorkommens sowie der Bedeutung für die Infektiosität könnte Ply ein wichtiges

Ziel in der Entwicklung zukünftiger Strategien gegen Pneumokokkeninfektionen darstellen (41).

1.2.4 Serotypen

Für eine erhöhte Mortalität bei Infektionen ist auch der Serotyp der Pneumokokken relevant (34,37). In dieser Arbeit wurden zur Detektion serotypspezifischer Aspekte der Fokus auf Stämme der Serotypen 2 (D39), 4 (TIGR4) 6B und 19F gesetzt.

Der Stamm D39 wird bereits seit 80 Jahren in der Forschung um Pneumokokken verwendet, so unter Anderem zum Nachweis, dass Merkmale von Bakterien durch DNA auf andere Bakterien übertragen werden können (43). Der Stamm TIGR4 wurde in Norwegen bei einer systemischen Infektion gewonnen und wird in vielen Untersuchungen als Vergleichswert für einen invasiven Pneumokokkenstamm genutzt (44). Isolate der Serotypen 6B und 19F werden insbesondere bei Proben aus Kindern mit invasiven Pneumokokkeninfektionen nachgewiesen, während Isolate von Serotyp 4 eher bei Infektionen von Erwachsenen auftraten (45).

Zudem unterscheiden sich die typischerweise ausgelösten Infektionen. Während der Serotyp 2 im Mausmodell zu einer Sepsis führte, zeigten Mäuse, welche mit Serotyp 4 infiziert wurden, eher Zeichen einer Pneumonie oder einer Meningitis (46). In Studien zu klinischen Isolaten aus erkrankten Kindern zeigten sich die Serotypen 6B und 19F vorrangig bei Kindern mit Meningitis oder Pneumonie (39).

Die Stämme 6B und 19F besiedeln zudem sehr häufig den Nasen-Rachen-Raum ohne dass eine Infektion folgt (47–49). Resultiert aus der mikrobiellen Kolonisierung jedoch eine Infektion mit diesen Stämmen, ist ein eher fulminanterer Krankheitsverlauf die Folge (50). Insbesondere eine Infektion mit dem Stamm 19F führt häufiger zu pulmonalem Organversagen und septischem Schock (37,51). Die Serotypen 2 und 4 führen im Verhältnis zur Besiedelung häufiger zu einer Infektion (47–49). Jedoch zeigte sich gleichzeitig bei Infektionen mit Serotyp 4 ein weniger fulminanter Verlauf (50). Im Infektionsmodell in der Maus führte eine Infektion mit Serotyp 4 schneller zum Tod, während eine Infektion mit Serotyp 6B zu einer langen Bakteriämie ohne Letalität führte (44).

1.3 Interaktion im Grenzfeld

Bereits seit 1975 ist bekannt, dass Pneumokokken die Blutgerinnung beeinflussen können (52). Beispielsweise bilden Thrombozyten in Gegenwart von Fibrin und Thrombospondin-1 Thromben, die Pneumokokken einschließen (53).

Zudem führt Pneumolysin als bekanntes porenbildendes Toxin auch bei Thrombozyten zu einer Perforation der Zellmembran, was zu einer Freisetzung der antimikrobiellen Substanzen, wie der Defensine, der alpha-Granula und des Zytoplasmas führt (54). Pneumokokken müssen jedoch noch weitere Mechanismen haben um Thrombozyten zu aktivieren, da auch Pneumolysin-freie Mutanten Thrombozyten aktivieren (55).

Die Thrombozytenaggregation durch Pneumokokken wird durch verschiedene Mechanismen ausgelöst. Sie findet unabhängig von der Kapsel statt und ist zum Teil vermittelt über den FcγRIIIa, insbesondere aber über den TLR 2. Nach einem intrazellulären Signalweg führt dies zur Konformitätsänderung von GP IIb/IIIa und Bindung von Fibrinogen sowie der Ausschüttung von Adenosindiphosphat (ADP), welches die Aggregation durch Aktivierung weiterer Thrombozyten in der Umgebung verstärkt (55).

Neben in vitro Untersuchungen dieser Interaktionen gibt es auch klinische Daten zum Einfluss von Thrombozytopenie und Thrombozytämie auf die Folgen von typischen durch Pneumokokken ausgelösten Erkrankungen, wie der ambulant erworbenen Pneumonie. In Zusammenschau wurde sowohl für eine erhöhte Anzahl als auch eine erniedrigte Anzahl von Thrombozyten eine erhöhte Mortalität bei schweren Pneumokokkeninfektionen gezeigt. Dabei führt eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten insbesondere zu einer erhöhten Rate von kardiovaskulären Komplikationen (56,57).

1.4 Zielsetzung

Mit dieser Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Haben Pneumokokken einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion?
2. Haben pneumolysinfreie Mutanten einen anderen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion als Wildtyp-Pneumokokken?
3. Haben Thrombozyten einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken?
4. Gibt es stammspezifische Unterschiede oder eine Abhängigkeit von Pneumolysin im Einfluss von Thrombozyten auf das Pneumokokkenwachstum?
5. Haben pneumolysinspezifische Antikörper oder humane Antikörpermischungen (i.v. IgG) einen Einfluss auf die Pneumokokken-Thrombozyten Interaktion?
6. Kann eine Substanz aus den Thrombozyten identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken hat?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

ACD-A	Fresenius Kabi Bad Homburg, Deutschland
Apyrase	Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, USA
BSA	SERVA Electrophoresis Heidelberg, Deutschland
Calziumchlorid (CaCl ₂)	Merck Darmstadt, Deutschland
CountBright™ absolute counting beads	Life Technologies Corporation Eugene, Oregon, USA
Glucose	B Braun Melsungen, Deutschland
Hefeextrakt	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Hirudin	Canyon Pharmaceuticals London, Vereinigtes Königreich
HORM® collagen type I	Takeda Pharmaceutical Tokyo, Japan
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck Darmstadt, Deutschland
PBS w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Pan Biotech Aidenbach, Deutschland

PBS	Pan Biotech Aidenbach, Deutschland
PFA	Morphisto Evolutionsforschung u. Anwendung Offenbach, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Linde Dublin, Irland
Todd-Hewitt Bouillon	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
TRAP-6	Haemochrom Diagnostica Essen, Deutschland

2.1.2 Biologisches Material

Blut von gesunden Spendern	Transfusionsmedizin Greifswald Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> D39 Δ ply	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4 Δ ply	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 6B	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 19F	Arbeitsgruppe Hammerschmidt Greifswald, Deutschland

2.1.3 Antikörper

Monoklonale Maus anti-Pneumolysin Antikörper (ab71810)	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich
---	--

Mouse anti-human CD41-FITC	Beckman Coulter Brea, Californien, USA
Mouse anti-human CD62-PE-Cy5	BD Biosciences Franklin Lakes, New Jersey, USA
Polyklonale Kaninchen anti-Pneumolysin Antikörper	Davids Biotechnologie Regensburg, Deutschland
Privigen® (humane IgG Lösung)	CSL Behring Marburg, Deutschland

2.1.4 Geräte

Brutschrank BD53	Binder Tuttlingen, Deutschland
Brutschrank HERACELL VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer Cytomics FC500	Beckman Coulter Brea, Californien, USA
Measurement-Software: CXP Cytometer	VWR International Darmstadt, Deutschland
Incubating Mini Shaker	BRAND Wertheim, Deutschland
Mikroliterpipette Transferpette® S	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Spektrometer BioSpectrometer basic	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Sterilbank SAFE 2020	Heraeus Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge Pico	VWR International Darmstadt, Deutschland
Tischzentrifuge Micro Star 17R	Panasonic Corporation Kadoma, Japan
Ultratiefkühlgerät VIP ECO	Beckman Coulter Brea, Californien, USA
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-XP	Scientific Industries Bohemia, New York, USA
Ultracentrifuge	
Vortexmischer Vortex Genie 2	

Waage Sartorius Entris	Sartorius Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Rotana 460 RF	Andreas Hettich Tuttlingen, Deutschland
Zellzählgerät Sysmex pocH-100i	Sysmex Norderstedt, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

ACD-A Röhrchen	BD Biosciences Franklin Lakes, New Jersey, USA
Amicon Ultra 2 ml Ultracell Filter	Merck Millipore Billerica, Massachusetts, USA
Blutagarplatten Coulumbia agar with sheep blood plus	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Eppendorf Safe-Lock Tubes	Eppendorf Hamburg, Deutschland
FACS Tubes	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Falcon, 50 ml	BD Biosciences Franklin Lakes, New Jersey, USA
Pipettenspitzen für Transferpette® S	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo® Einmal.Küvetten, PS	Carl Roth Karlsruhe, Deutschland
Wattetupfer Cotton Tipped Applicators	Henry Schein Inc. Melville, New York, USA
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
Zellkultur Microplatten 96 Well, PS U-Boden	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland

2.1.6 Software

GraphPad Prism 8

GraphPad Software

San Diego, California, USA

Microsoft Office

Microsoft Corporation

Redmond, Washington State, USA

2.1.7 Lösungen und Puffer

Bikarbonatpuffer:

- 16 g NaCl
- 0.4 g KCl
- 2g NaHCO₃
- 0.1 g NaH₂PO₄
- ad 100 ml Aqua destillata
- wöchentlich frisch ansetzen und bei 4°C lagern

MgCl₂-Lösung:

- 2.17 g MgCl₂ x 6 H₂O ad 50 ml Aqua destillata
- bei 4°C aufbewahren

CaCl₂-Lösung:

- 0.74 g CaCl₂ x 2 H₂O ad 50 ml Aqua destillata
- bei 4°C aufbewahren

BSA 20%:

- 20 g BSA ad 100 ml Aqua destillata
- aliquotieren und bei – 20°C lagern

Grundwaschlösung:

- 80 ml Aqua destillata
- 5 ml Bikarbonatpuffer
- 1.75 ml BSA 20%
- 1 ml Glucose 10%
- ad 100 ml Aqua destillata
- frisch ansetzen

Waschpuffer (HIPAS-WL):

- 20 ml Grundwaschlösung
- 50 µl Apyrase (500 U/ml)
- 20 µl Hirudin (1000 U/ml)
- Mit 0,1 M HCL auf pH 6,3 einstellen, frisch ansetzen

Suspensionslösung (HIPA-SL):

- 50 ml Grundwaschlösung
- 0.5 ml MgCl₂-Lösung
- 1 ml CaCl₂-Lösung
- mit 1 M und 0.1 M HCl auf pH 7.2 einstellen, frisch ansetzen

THY Medium

- 36,4 g Todd-Hewitt Bouillon
- 5 g Hefeextrakt
- Ad 1000 ml Aqua destillata

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung einer Thrombozytensuspension nach HIPA-Protokoll (58)

Als Ausgangsmaterial wurde 10 ml ACD-A-Vollblut (1:6,25) von gesunden Personen gewonnen, die die Voraussetzungen der Blutspende in Deutschland erfüllten und eine schriftliche, informierte Einwilligung gegeben haben. Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald genehmigt (BB 044/18). Das Blut wurde für 15 Minuten (min) im 45 ° Winkel bei Raumtemperatur abgestellt. Durch Zentrifugieren (120 g, 20 min, RT, ohne Bremse und minimale Beschleunigung) wurde plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen und in eine neues Zentrifugenröhrchen überführt. Pro 1 ml PRP wurden 111 µl ACD-A Lösung (10% final) und 5 µl Apyrase (2,5 U final) hinzugegeben. Das PRP wurde erneut zentrifugiert (650 g, 7 min, RT, ohne Bremse, minimale Beschleunigung) und das resultierende Pellet in 5 ml HIPA-WL resuspendiert. Nach Inkubation (15 min, 37 °C) wurde erneut zentrifugiert (650 g, 7 min, RT, ohne Bremse, minimale Beschleunigung) und nach Verwerfen des Überstands in 1 ml HIPA-SL resuspendiert. Mit Hilfe des Zellzählgeräts Sysmex pochH-100i wurde die Suspension auf 300.000 Thrombozyten/µl eingestellt und 45 min bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae wurde aus einer -80 °C Glycerinkultur auf eine Blutagarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank für 10 h inkubiert. Anschließend wurden einige Kulturen mit der Metallöse auf eine neue Platte transferiert und erneut bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank ÜN inkubiert. Von dieser Platte wurden die Flüssigkulturen in 40 ml THY-Medium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen angeimpft und auf eine Optische Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 0,06-0,08 eingestellt. Die Kultur wurde im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,4 erreicht wurde (exponentielle Phase). Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (3.900 RPM, 10 min, RT) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (3.900 RPM, 10 min, RT). Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 4 ml PBS resuspendiert und die OD₆₀₀ einer 1:10 Verdünnung gemessen.

2.2.3 Bestimmung der CFU der verschiedenen Pneumokokkenstämme im Verhältnis zur OD₆₀₀.

Die Pneumokokkensuspension wurde mit PBS auf eine OD₆₀₀ von 1 verdünnt. Von dieser Lösung wurde mit PBS im Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:10 eine Verdünnungsreihe

angelegt. Jeweils 100 µl der Verdünnungen 10^{-2} bis 10^{-4} wurden auf Blutagarplatten ausplattiert und ÜN bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die koloniebildenden Einheiten (CFU) wurden am folgenden Tag ausgezählt und als CFU/ml erfasst. Pro Stamm wurden 3 Versuche durchgeführt und der Mittelwert gebildet (Tabelle 1). Der Mittelwert diente als Berechnungsgrundlage für die Pneumokokkenkonzentration für die folgenden Experimente (2.2.7).

Tabelle 1 - Konzentration von verschiedenen Pneumokokkenstämmen bei einer OD₆₀₀ von 1. Bestimmung durch Mittelwertbildung bei n=3 pro Stamm.

Stamm	D39	TIGR4	6B	19F	D39Δply	TIGR4Δply
CFU/ml (OD ₆₀₀ =1)	2,51 x 10 ⁸	1,87 x 10 ⁸	2,57 x 10 ⁸	2,26 x 10 ⁸	3,74 x 10 ⁸	1,96 x 10 ⁸

2.2.4 Herstellung von Thrombozyten-Releasaten (Abbildung 1)

80 µl der Thrombozytensuspension wurden mit 10 µl TRAP-6 (20 µM final) und 10 µl Kollagen (5 µg/ml final) versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 300 - 400 RPM und 37 °C im Incubating Mini Shaker inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert (650 g, 7 min, RT) und der Überstand erneut zentrifugiert (13.000 RPM, 5 min, RT). Der resultierende Überstand enthielt das zellfreie Releasat der aktivierten Thrombozyten und wurde für die folgenden Experimente (2.2.10) verwendet.

2.2.5 Herstellung von Thrombozytenlysaten (Abbildung 1)

Zur Herstellung von Thrombozytenlysaten wurde die Thrombozytensuspension durch viermaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff lysiert. Anschließend wurden nicht lysierte Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation (650 g, 7 min, RT) entfernt.

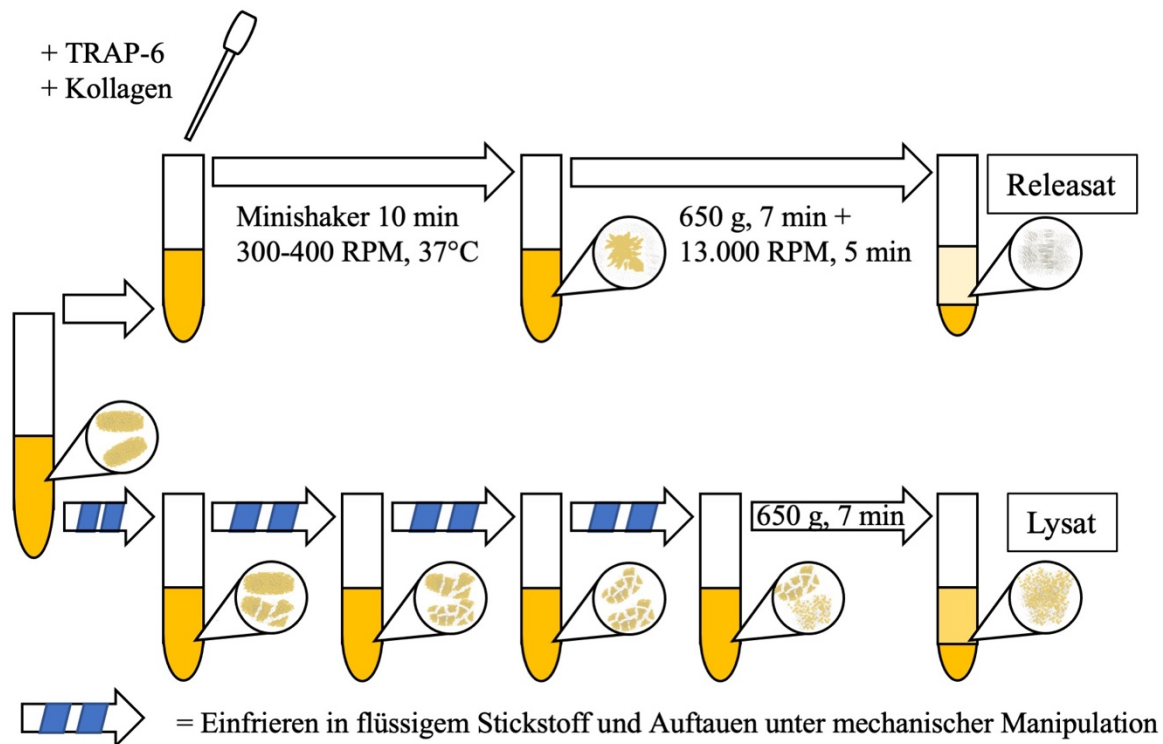


Abbildung 1 - Herstellung von Thrombozyten-Releasaten und -Lysaten. Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte.

2.2.6 Auftrennung von Thrombozytenlysaten

Aus dem Lysat wurden durch Ultrazentrifugation (100.000 g, 60 min, 4 °C) alle nicht zytosolischen Bestandteile abzentrifugiert. Ein Teil des Lysates wurde unter der Verwendung von 10 kDa Amicon Ultra 2ml Ultracell Filter in der Zentrifuge (13.000 RPM, 10 min, 4°C) in Fraktionen größer und kleiner 10 kDa aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mit HIPA-SL auf das Ursprungsvolumen aufgefüllt. Die Fraktion >10kDa wurde mittels 30 kDa und 100 kDa Amicon Ultra 2ml Ultracell Filter weiter unterteilt. Ein weiterer Teil des Lysates wurde hitzeinaktiviert (95 °C, 5 min) und anschließend zentrifugiert (13.000 RPM, 10 min, 4°C), um Proteinanteile zu denaturieren. Zusätzlich wurde ein Teil des Lysats im Verhältnis 1:5 mit Proteinase K Lösung (200µg/ml final) versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 20 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert. Eine Kontrollprobe wird mit PBS statt mit Proteinase K inkubiert. Die verschiedenen Proben wurden für die folgenden Experimente (2.2.10) verwendet.

2.2.7 Inkubation von Thrombozyten mit Bakterien und verschiedenen Antikörpern

In der gewaschene Bakteriensuspension (2.2.2) wurde mithilfe des Spektrometers die OD₆₀₀ bestimmt. Mittels der ermittelten Konzentration in Bezug zur OD₆₀₀ (2.2.3 – Tabelle 1) wurde das benötigte Volumen der Suspension berechnet (Formel 1).

Formel 1- Berechnung des benötigten Volumens der Bakteriensuspension ($V(\text{Bak})$). Pro Probe wurden 30 μl der Thrombozytensuspension (2.2.1) oder der Lysate beziehungsweise Releasate (2.2.4, 2.2.5 und 2.2.6) mit einer eingestellten Zellzahl von 300.000 pro μl eingesetzt. Für die einzelnen Stämme wurde die Konzentration an CFU/ml bestimmt (2.2.3). Es wurde ein Verhältnis von 1:5 zwischen Bakterien und Thrombozyten gewählt.

$$V(\text{Bak})[\text{ml}] = \frac{n(\text{Proben}) \times \left(30 \mu\text{l Thrombozytensuspension} \times \frac{300.000 \mu\text{l}^{-1}}{5} \right)}{OD_{600}(\text{gemessen}) \times c(OD_{600} = 1) \left[\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right]}$$

Anschließend wurden alle Proben mit PBS auf das endgültige Volumen (10 μl pro Probe) verdünnt. Dabei wurden zu Teilen der Suspension im Verhältnis 1:10 IgG Lösung (Privigen, 10 mg/ml final), 1:12 Anti-Pneumolysin antibody [PLY-4] (ab71810) (75 $\mu\text{g/ml}$ final) oder 1:5,7 polyklonalen Kanninchen AK gegen Pneumolysin (100 $\mu\text{g/ml}$ final) zugesetzt. Anschließend wurden die Suspensionen für 30 min bei 4°C inkubiert.

In eine 96-Well-Platte wurden jeweils 10 μl dieser Bakteriensuspensionen und 30 μl PBS, HIPA-SL, Thrombozytensuspension, Thrombozytenlysat oder Thrombozytenreleasat transferiert und mit PBS auf 100 μl aufgefüllt. Die PBS Kontrollen wurden direkt entnommen und in einer Verdünnungsreihe in Verdünnungsschritten von 1:10 mit PBS auf 10⁻⁴ verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 100 μl auf eine Blutagarplatte mithilfe von Glasbeads ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde auch die 96-Well-Platte bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und für die Experimente 2.2.8, 2.2.9. und 2.2.10 verwendet.

2.2.8 Antikörpermarkierung von CD62P und CD41 zur Messung des CD62P Signals von Thrombozyten

Nach 2, 3 und 4 Stunden wurden zweimal 50 μl der Proben aus der 96-Well-Platte (2.2.7) entnommen. Diese wurden mit je 6 μl CD62P PE-Cy5 AK und 6 μl CD41-FITC AK versetzt. Eine der Proben wurde zusätzlich mit 6,8 μl TRAP-6 (20 μM), die andere mit 6,8 μl PBS versetzt. Anschließend wurden die Proben für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 10 min mit 1% PFA fixiert. Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (650 g, 7 min, RT, Beschleunigung und Bremse 1) und mit 500 μl PBS resuspendiert. Die CD62P Expression der CD41-positiven Thrombozyten wurde im Durchflusszytometer Cytomics FC500 gemessen (Abbildung 2).

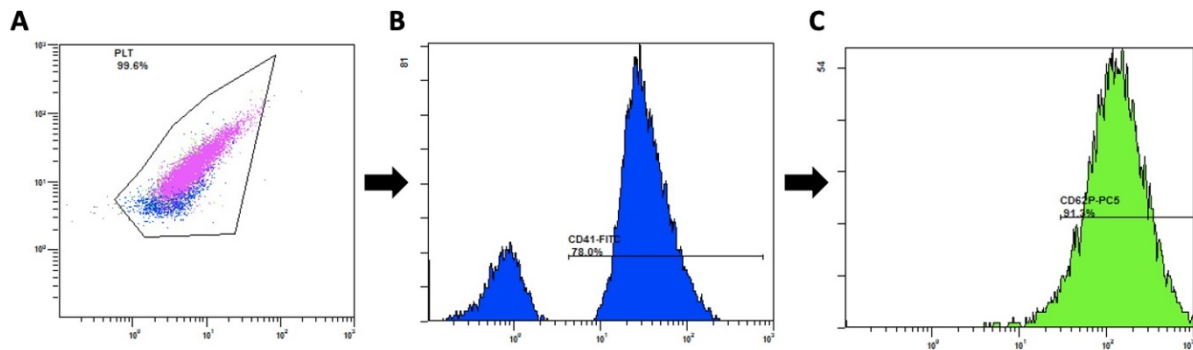


Abbildung 2 - Differenzierung zwischen Bakterien und Thrombozyten im FC500. A – Auswahl der Thrombozyten- und Pneumokokkenpopulation anhand von forward- und sidewardscatter. B – Ausschluss der Pneumokokkenpopulation durch positives Gating der CD41-FITC markierten Thrombozyten. C – Messung der CD62P Expression der Thrombozytenpopulation.

2.2.9 Messung der Thrombozytenkonzentration unter Verwendung von CountBright™ absolute counting beads

Die Proben wurden wie beschrieben (2.2.7) mit den verschiedenen Pneumokokkenstämmen und i.v. IgG inkubiert. Nach 2, 3 und 4 Stunden wurden 50 µl der Proben entnommen und mit 5,5 µl CD41-FITC AK versetzt und für 15 Minuten inkubiert (RT, dunkel). Anschließend wurden 55,5 µl PFA (0,5% final) zugesetzt und die Proben für 10 Minuten im Dunkeln fixiert. Alsdann erfolgte ein Zentrifugationsschritt (650 g, 7 min, RT, Beschleunigung und Bremse 1) und die Resuspension des Pellets in 450 µl PBS. Die CountBright™ absolute counting beads wurden nach Anleitung des Herstellers für 5 Minuten auf dem Vortex resuspendiert. Sodann wurden 50 µl der Suspension (10,4 Beats/µl final) zu den gefärbten Zellen gegeben. Zuletzt werden die Proben im Durchflusszytometer Cytomics FC500 gemessen.

2.2.10 Koloniebestimmung von Pneumokokken nach Inkubation mit Thrombozyten, Lysaten und Releasaten

Nach 2, 3 und 4 Stunden Inkubation der Pneumokokken mit Thrombozyten wurden die verschiedenen Proben mehrfach im Verhältnis 1:10 mit PBS verdünnt. Es wurden jeweils 100 µl der Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} unter Nutzung von Glasbeads auf Blutagarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die CFU wurden am folgenden Tag gezählt.

3 Ergebnisse

Um die Übersichtlichkeit des Ergebnisteils zu gewährleisten, sind die Tabellen mit Mittel- und p-Werten im Appendix der Arbeit zu finden.

3.1 CD62P Signal von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken-Stämmen

3.1.1 Wildtyp Pneumokokken führen zu einem höheren CD62P Signal der Thrombozyten als pneumolysin-defiziente Mutanten

Nach Inkubation mit den WT Stämmen zeigten die aufgereinigten Thrombozyten ein signifikant höheres CD62P-Signal im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit PBS (Kontrolle). Dieser Effekt konnte nach allen untersuchten Inkubationszeiten beobachtet werden (Abbildung 3 und 4; Tabelle 2 und 3).

Die Inkubation mit Δply Mutanten induzierte nach 120 und 180 Minuten Inkubation eine höhere CD62P Expression (Abbildung 2; Tabelle 3). Nach 240 Minuten zeigte sich kein Unterschied zur Kontrolle.

Über alle Zeitpunkte zeigten die Thrombozyten nach Inkubation mit den WT Stämmen ein höheres CD62P Signal als nach der Inkubation mit Δply Mutanten. Dieser Unterschied war bei TIGR4 besonders stark ausgeprägt (Abbildung 3; Tabelle 2 und 3).

3.1.2 Inkubation mit D39, TIGR4 und 19F führt zu einer verminderten Reaktion der Thrombozyten auf TRAP-6

Nach längerer Inkubation von Thrombozyten mit den meisten WT Stämme zeigte sich keine zusätzliche CD62P Expression nach Zugabe von TRAP-6. Nach Inkubation mit den Δply Mutanten und mit dem Stamm 6B war zu jedem Zeitpunkt ein messbarer Anstieg der CD62P Expression durch Stimulation mit TRAP-6 zu erkennen (Abbildung 2 und 3, Tabelle 2).

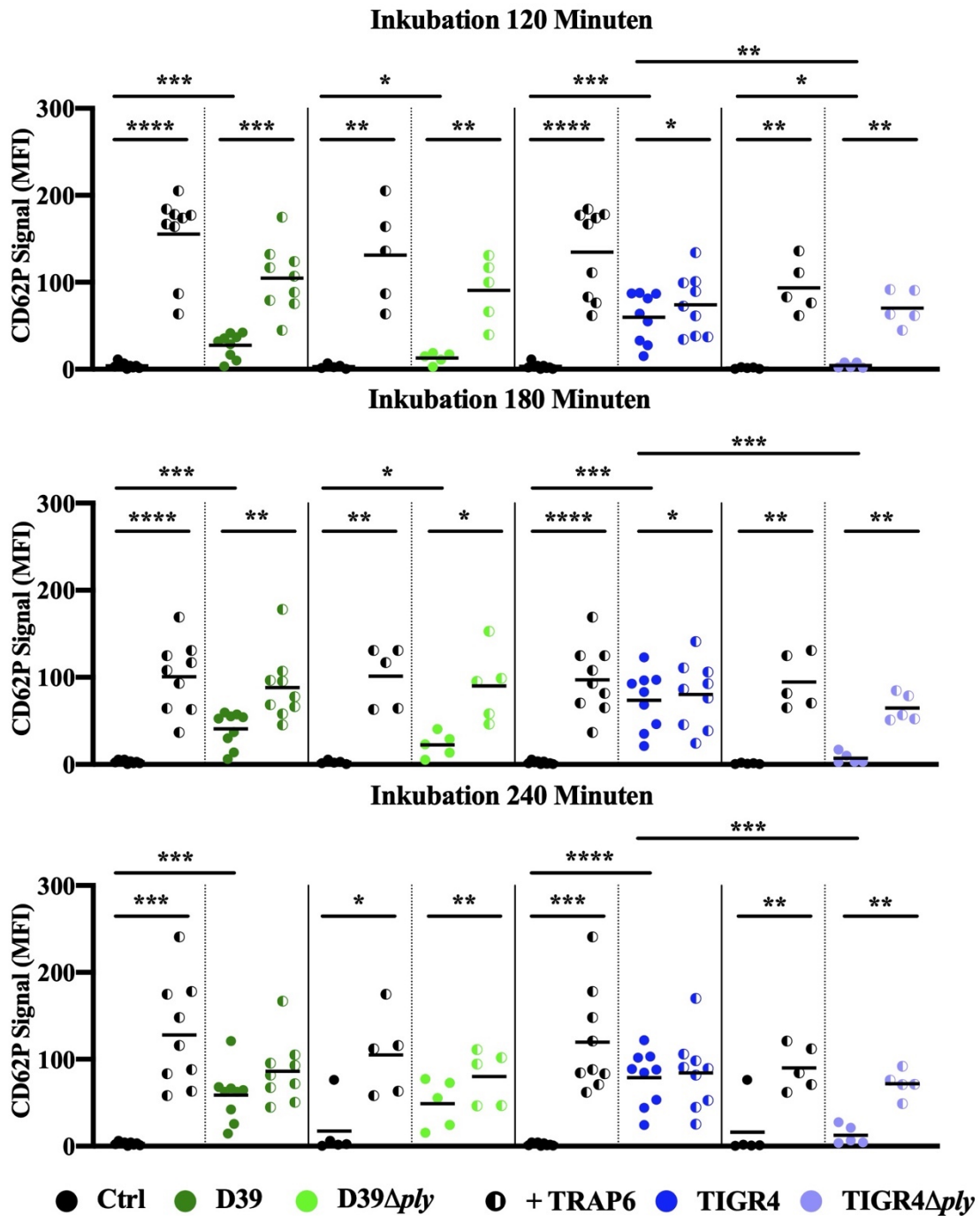


Abbildung 3 - CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit D39, TIGR4 und ihren Mutanten. Direkter Vergleich mit der Kontrolle der Reagibilität auf TRAP-6 (halbes Symbol) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$; Ctrl = Inkubation mit PBS).

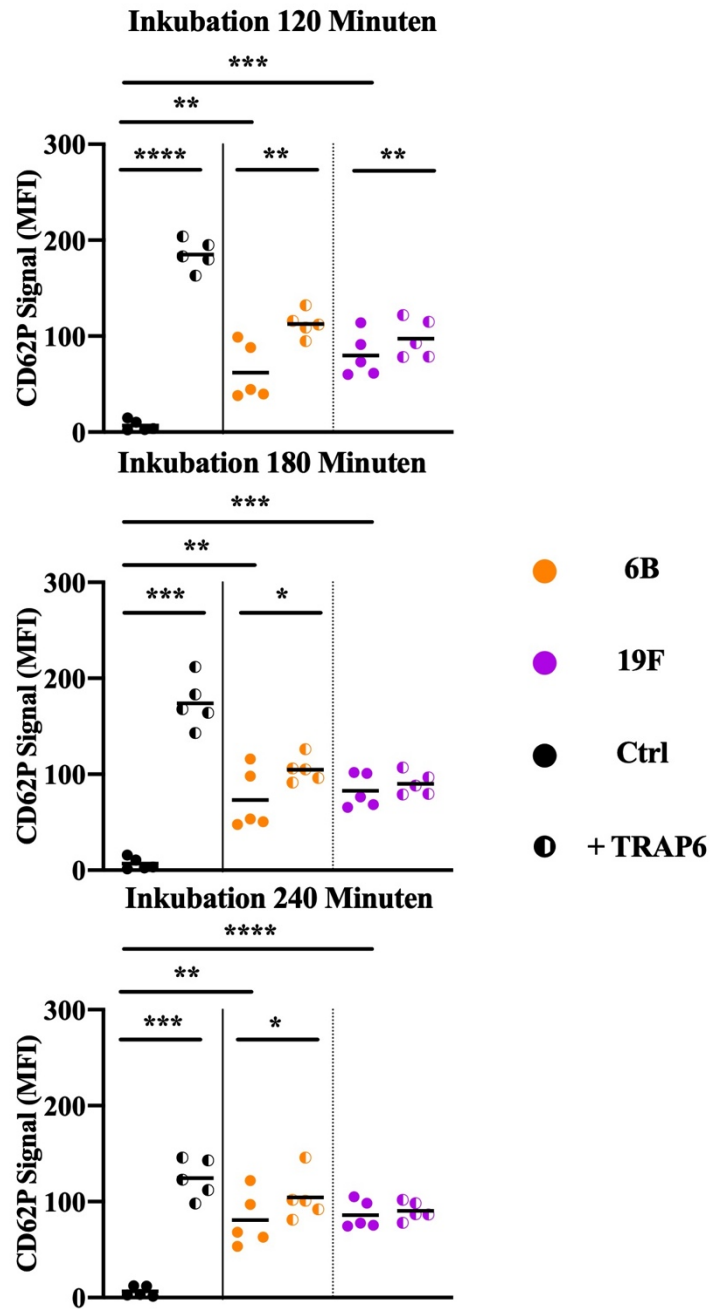


Abbildung 4 - CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit 6B und 19F. Direkter Vergleich mit der Kontrolle der Reagibilität auf TRAP-6 (halbes Symbol) ($p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$; Ctrl = Inkubation mit PBS).*

3.2 Einfluss von anti-Pneumolysin-Antikörpern und i.v. IgG auf das CD62P Signal von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokkenstämmen

Für diese Experimente wurden die verschiedenen Pneumokokkenstämmen vor der Inkubation mit Thrombozyten mit Antikörpern (AK) versetzt.

Nach Behandlung mit monoklonalen Maus Anti-Ply AK führte die Inkubation der Thrombozyten mit den WT-Stämmen zu einer reduzierten CD62P Expression der Thrombozyten (Tabelle 4 und 5). Gleichzeitig blieben die Thrombozyten sensitiv für TRAP-6 (Abbildung 5 und 6; Tabelle 4 und 5).

Nach Behandlung mit den polyklonalen Kaninchen Anti-Ply AK führten die WT-Stämme bei den Thrombozyten ebenso zu einer signifikant geringere CD62P Expression (Tabelle 4 und 5). Jedoch zeigten die Thrombozyten bei drei von vier Stämmen nach dieser Inkubation keine Reaktion mehr auf TRAP-6. Lediglich nach der Inkubation mit D39 und polyklonalen Kaninchen Anti-Ply AK zeigte sich nach Stimulation mit TRAP-6 eine Zunahme der CD62P Expression (Abbildung 5 und 6; Tabelle 4).

Nach der Behandlung mit humanem IgG präsentierte sich ein heterogeneres Bild. Während die Inkubation mit TIGR4 nach der Behandlung eine signifikant niedrigere CD62P Expression zeigte, war dies bei den Stämmen 6B und D39 nicht der Fall. Für die Inkubation mit 19F zeigte sich nur nach den kürzeren Inkubationszeiten eine Reduktion der CD62P Expression (Tabelle 4 und 5). Eine signifikante Reaktion auf folgende TRAP-6-Stimulation war bei Verwendung von humanem IgG aber bei allen Stämmen möglich (Abbildung 5 und 6; Tabelle 4).

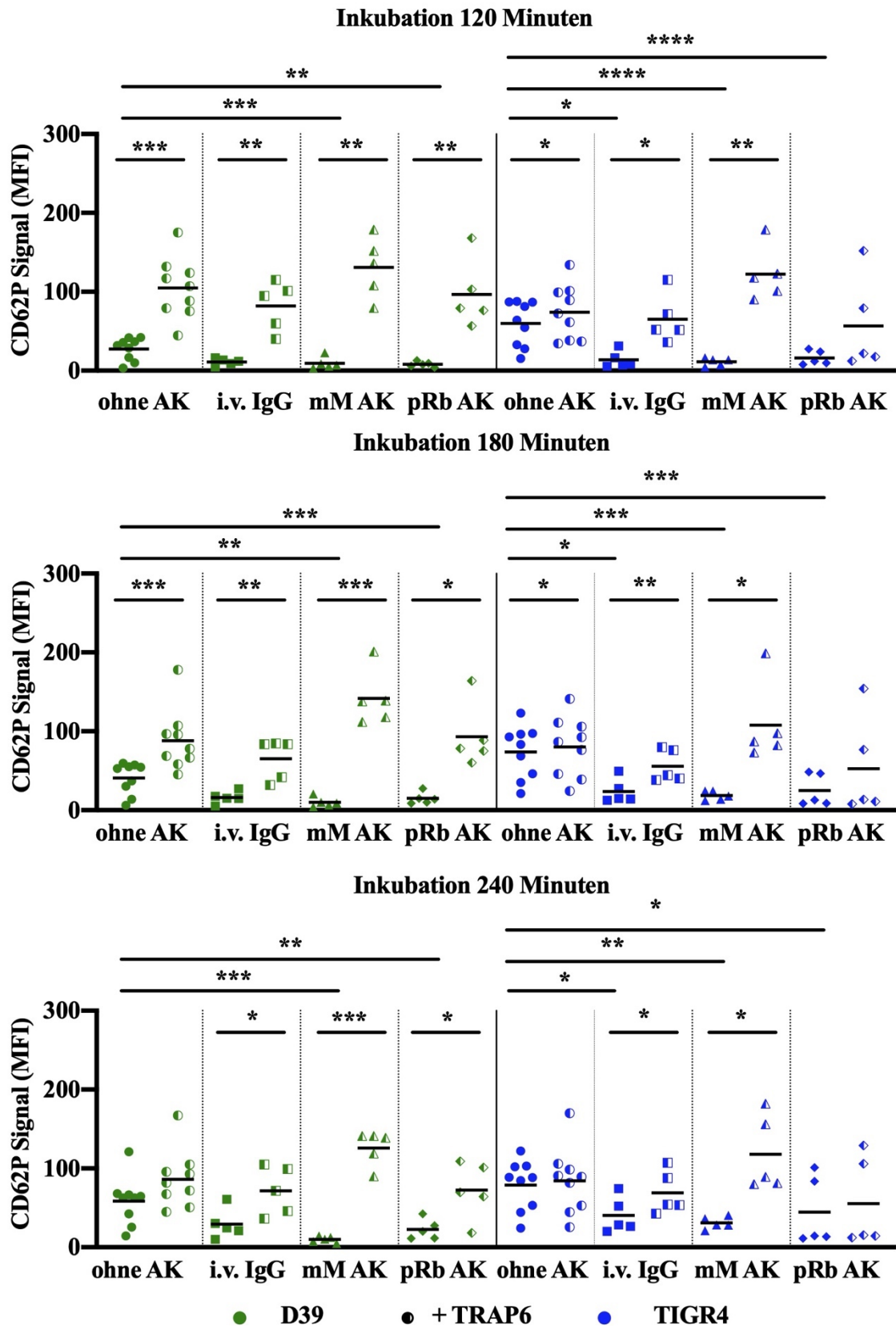


Abbildung 5 - CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit D39 und TIGR4. I.v. IgG, monoklonalen Maus Anti-Pneumolysin (mM AB) oder polyklonalen Kaninchen Anti-Pneumolysin AK (pRb AB) im Vergleich mit der Reagibilität auf TRAP-6 (halbes Symbol) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).**

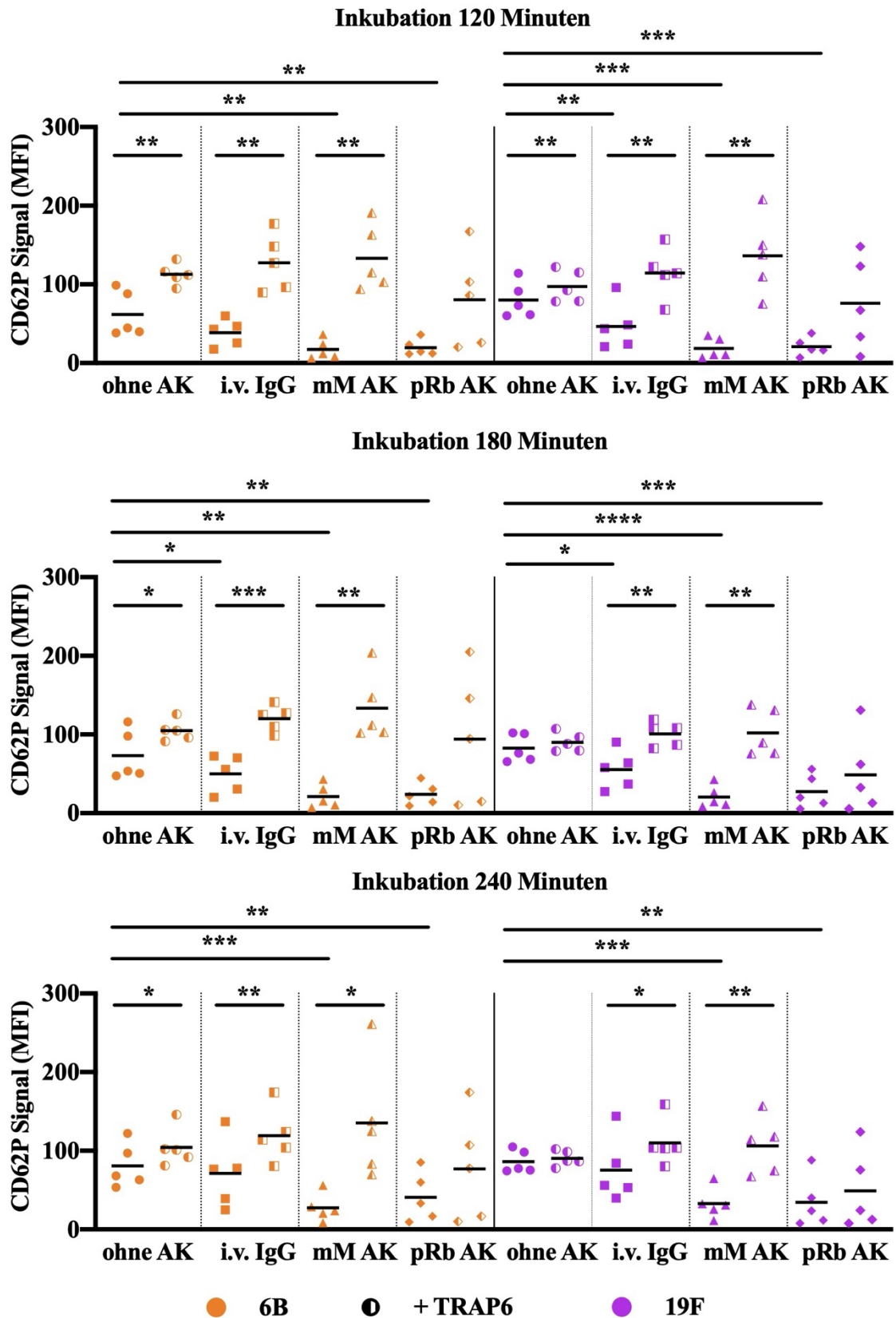


Abbildung 6 - CD62P Signal (MFI) von Thrombozyten nach Inkubation mit 6B und 19F. I.v. IgG, monoklonalen Maus Anti-Pneumolysin (mMAK) oder polyklonalen Kaninchen Anti-Pneumolysin AK (pRb AB) im Vergleich mit der Reagibilität auf TRAP-6 (halbes Symbol) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

3.3 Einfluss von i.v. IgG auf die Konzentration von Thrombozyten

In vorherigen Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass Thrombozyten durch Pneumolysin zerstört werden und dieser Effekt durch i.v. IgG verhindert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin überprüft, ob humanes IgG (Privigen, 1mg/ml) auch einen Einfluss auf die Konzentration der Thrombozyten nach Inkubation mit Pneumokokken hat. Dazu wurde mithilfe von CountBright™ absolute counting beads die genaue Thrombozytenkonzentration nach Inkubation berechnet. Diese Konzentration wurde auf die jeweilige Kontrolle (Inkubation ohne Pneumokokken und ohne IgG) normiert (Abbildung 7).

Die Inkubation von Thrombozyten mit Pneumokokken ohne i.v. IgG führte zu einer Abnahme der Thrombozytenkonzentration. Bei Zugabe von i.v. IgG kam es zu einer deutlich geringeren Abnahme der Konzentration. Bei den Stämmen 6B und 19F zeigte sich der Effekt am stärksten (Tabelle 6).

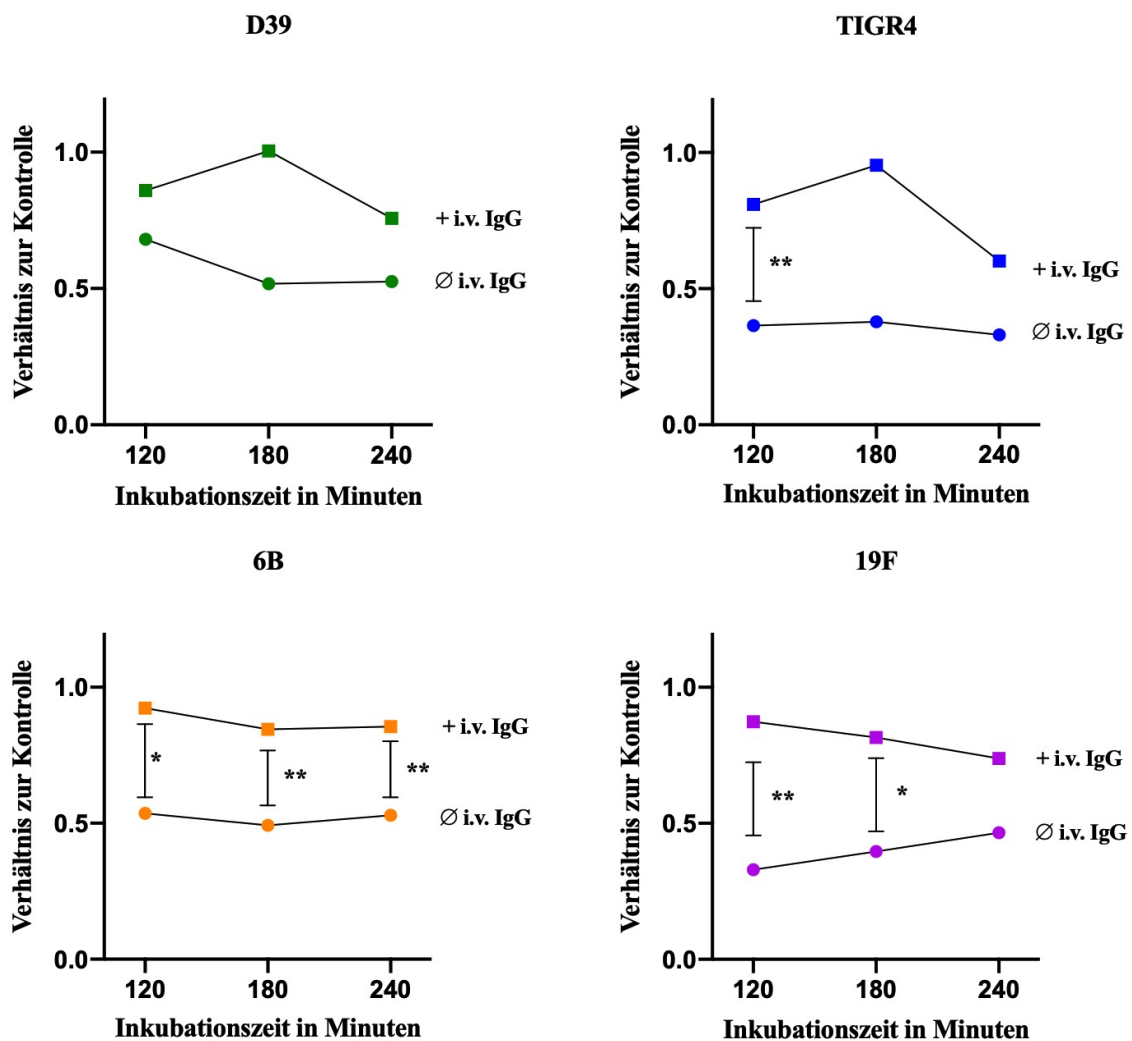


Abbildung 7 - Konzentration von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken Stämmen und i.v. IgG. Normiert auf die zugehörige Kontrolle (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

Nach Inkubation alleinig mit humanem IgG zeigten Thrombozyten eine leicht erhöhte CD62P Expression. Bei der zusätzlichen Inkubation mit IV.3 AK, welche den Fc γ IIa Rezeptor der Thrombozyten blockieren, war keine erhöhte Expression mehr sichtbar (Abb. 7; Tabelle 7). Auch bei der Inkubation mit $\Delta p/ly$ Mutanten zeigte die Zugabe von humanem IgG eine höhere CD62P Expression (Abbildung 8; Tabelle 7). Eine Reaktion auf TRAP-6 blieb unter allen beschriebenen Bedingungen möglich (Abbildung 8; Tabelle 7).

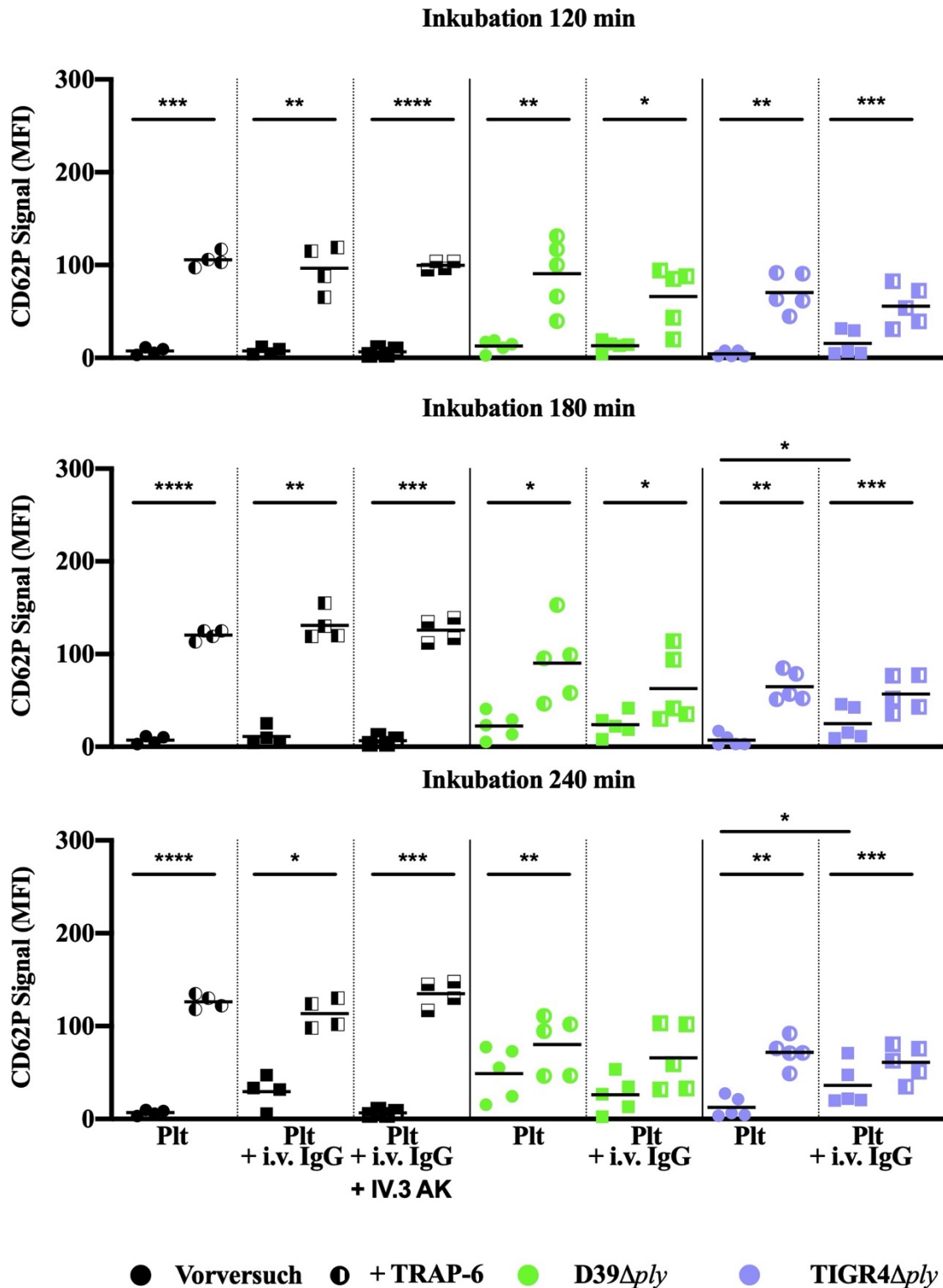


Abbildung 8 - CD62P Expression (MFI) auf Thrombozyten nach Inkubation über 120, 180 und 240 Minuten mit i.v. IgG und verschiedenen Pneumokokken Mutanten. Direkter Vergleich zwischen unbehandelten Proben, Proben mit i.v. IgG oder nach Zugabe von IV.3 AK und der Kontrolle der Reagibilität auf TRAP-6 (halbes Symbol) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).**

3.4 Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen Pneumokokken Stämmen

3.4.1 Thrombozyten beeinflussen das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply

Zur Untersuchung, ob Thrombozyten auch einen Effekt auf das Wachstum der verschiedenen Pneumokokken-Stämme haben, wurden die Proben nach den Inkubationszeiten ausplattiert und anschließend die koloniebildenden Einheiten (CFU) bestimmt (Abbildung 9).

TIGR4 und die pneumolysinfreie Mutante TIGR4 Δ ply zeigten ein geringeres Wachstum nach der Inkubation mit Thrombozyten. Dieses verminderte Wachstum war bei der Mutante geringer ausgeprägt als beim WT. Die stärksten Effekte zeigten sich nach 240 Minuten Inkubation. Bei den anderen Stämmen war kein Einfluss der Thrombozyten auf das Wachstum zu erkennen (Tabelle 8).

3.4.2 Der Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von TIGR 4 und TIGR4 Δ ply wird durch i.v. IgG aufgehoben

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von Thrombozytensuspensionen mit humanem IgG (Privigen, 1mg/ml) auf das Wachstum der Stämme und Mutanten untersucht.

Der negative Effekt der Thrombozyten auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply zeigte sich in Anwesenheit von humanem IgG nicht mehr. Bei D39 und D39 Δ ply zeigte sich auch nach Zugabe von humanem IgG zu den Thrombozyten kein Effekt auf das Wachstum (Abbildung 10, Tabelle 9).

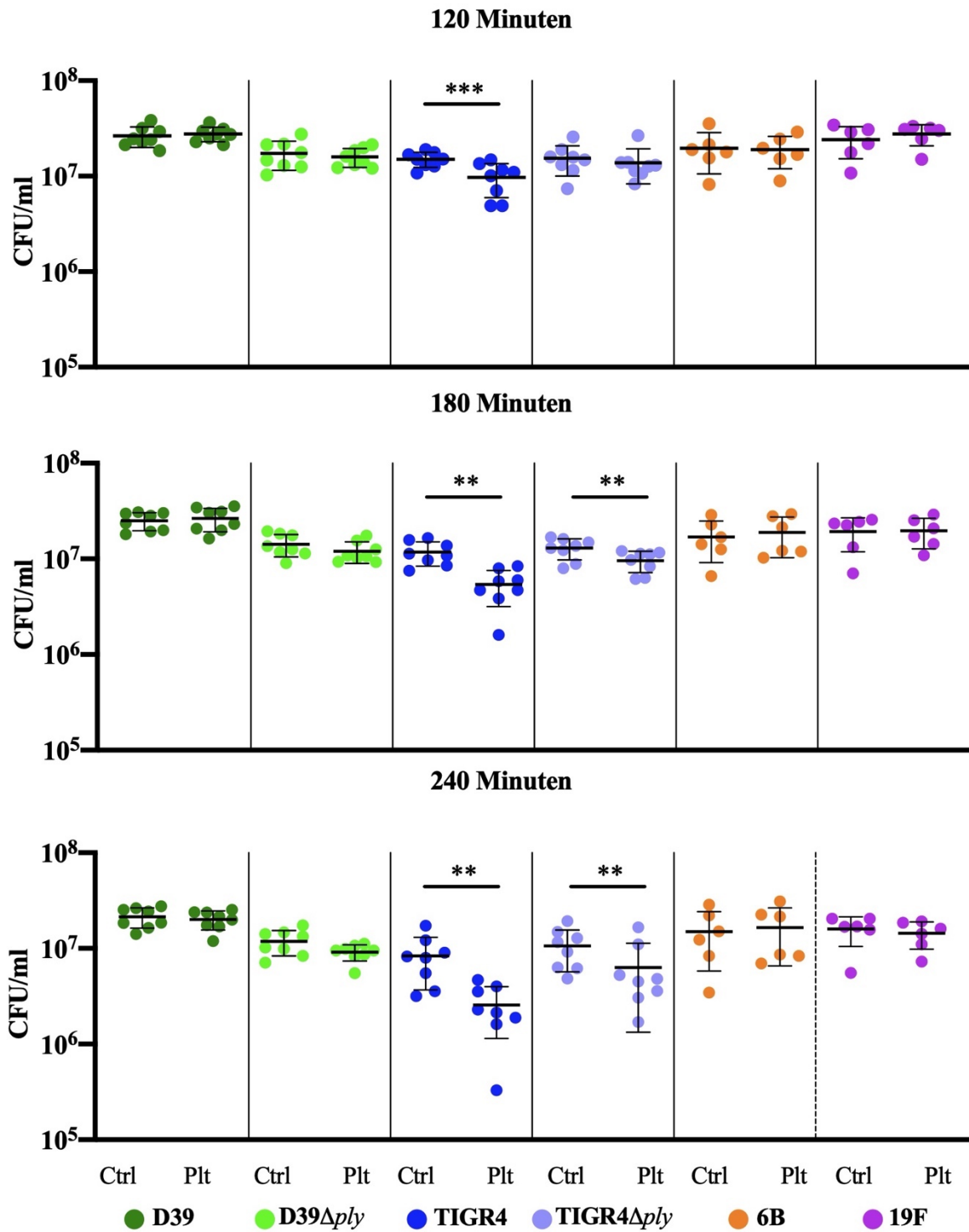


Abbildung 9 - Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen. Kolonieformende Einheiten (CFU/ml) verschiedener *S. pneumoniae* Stämme und Mutanten nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl) oder Thrombozytensuspension (Plt) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

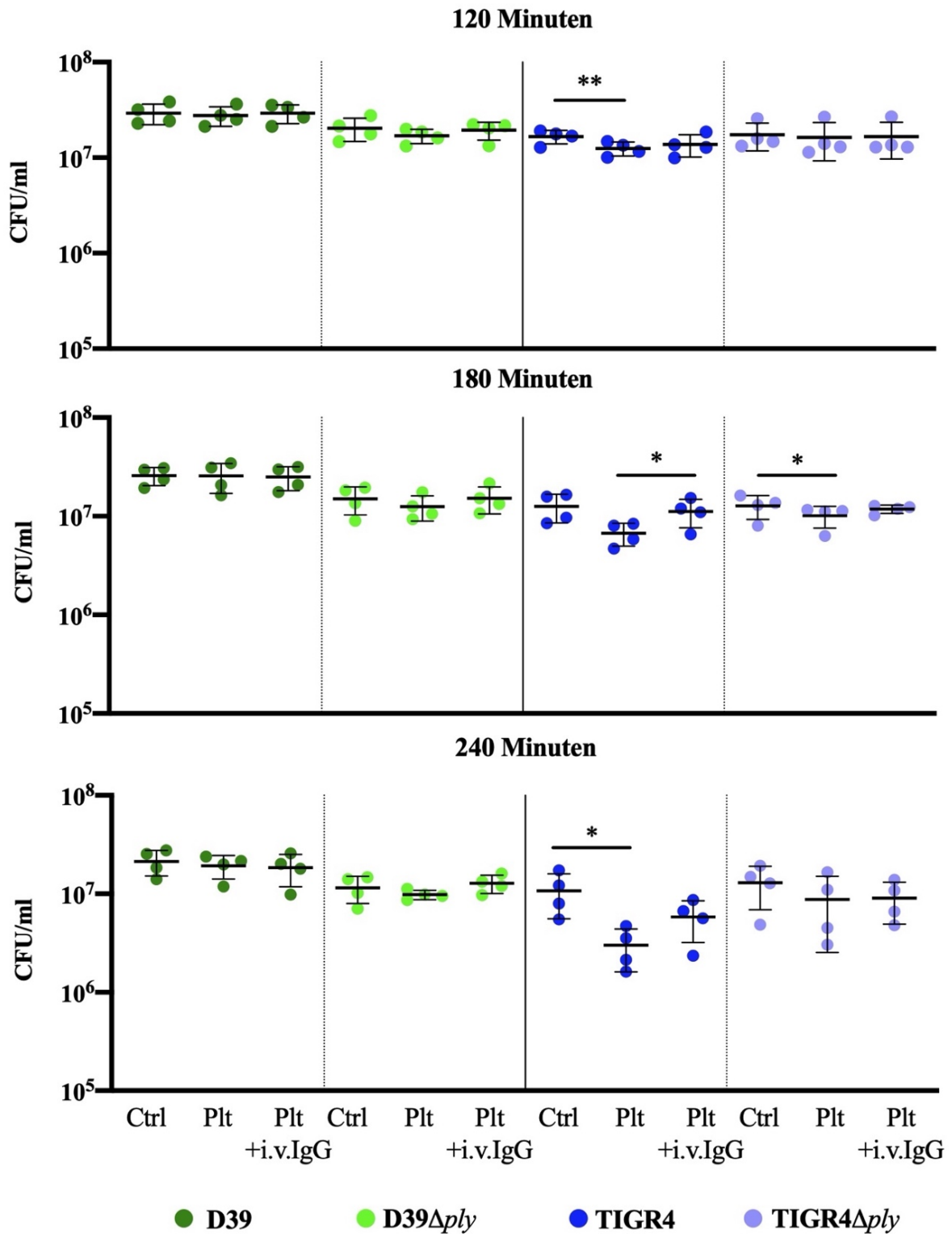


Abbildung 10 - Einfluss von i.v. IgG in Kombination mit Thrombozyten auf das Wachstum verschiedener *S. pneumoniae* Stämme. Kolonieformenden Einheiten (CFU/ml) verschiedener *S. pneumoniae* Stämme und Mutanten nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl), Thrombozytensuspension (Plt) oder i.v. IgG und Thrombozytensuspension (Plt + i.v. IgG) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

3.4.3 Der Einfluss auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4 Δ ply wird durch hitzebeständige Moleküle mit einer Größe von über 10 kDa ausgelöst

Um zu identifizieren, welcher Bestandteil der Thrombozyten den wachstumshemmenden Effekt vermittelt, wurden verschiedene Suspensionen hergestellt. Zum einen wurden Thrombozyten durch TRAP-6 und Kollagen aktiviert und anschließend zentrifugiert, um eine Suspension der in den Granula enthaltenen Moleküle zu erhalten (Releasate). Außerdem wurden Thrombozyten durch vierfaches Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff lysiert. Neben dem unbehandelten Lysat wurde ein Teil des Lysates denaturiert oder größenfiltriert. Diese verschiedenen Proben wurden dann mit den Pneumokokken inkubiert.

Wie schon oben beschrieben hemmte die Thrombozytensuspension das Wachstum der Pneumokokken insbesondere nach 240 Minuten. Der gleiche Effekt zeigte sich bei der Inkubation mit unbehandeltem Thrombozytenlysat. Auch das denaturierte Thrombozytenlysat zeigte einen wachstumshemmenden Effekt. In der weiteren Auftrennung zeigte sich der Effekt nach Filtration nur für das Lysat mit Molekülen >10 kDa, nicht für das Filtrat mit den kleineren Molekülen. Das Releasat zeigten im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf das Wachstum der Pneumokokken (Abbildung 11, Tabelle 10). Bei der Inkubation mit der Mutante TIGR4 Δ ply waren diese Effekte weniger stark ausgeprägt (Abbildung 12, Tabelle 10).

Um die Stoffklasse der wachstumshemmenden Bestandteile und die genaue Größe zu identifizieren, wurde das Lysat außerdem mit einer Proteinase behandelt beziehungsweise in weiteren Schritten größenfiltriert. Aufgrund des Zeitaufwandes der Aufarbeitung mussten diese und die Inkubation mit den aufgetrennten Proben zweizeitig stattfinden. Nach der Aufbewahrung bei -20 °C zeigte sich am Folgetag kein Einfluss der einzelnen Komponenten auf das Wachstum der Pneumokokken. Eine genauere Eingrenzung der Thrombozytenbestandteile, welche den wachstumshemmenden Effekt auslösen, war somit nicht möglich (Abbildung 13, Tabelle 11).

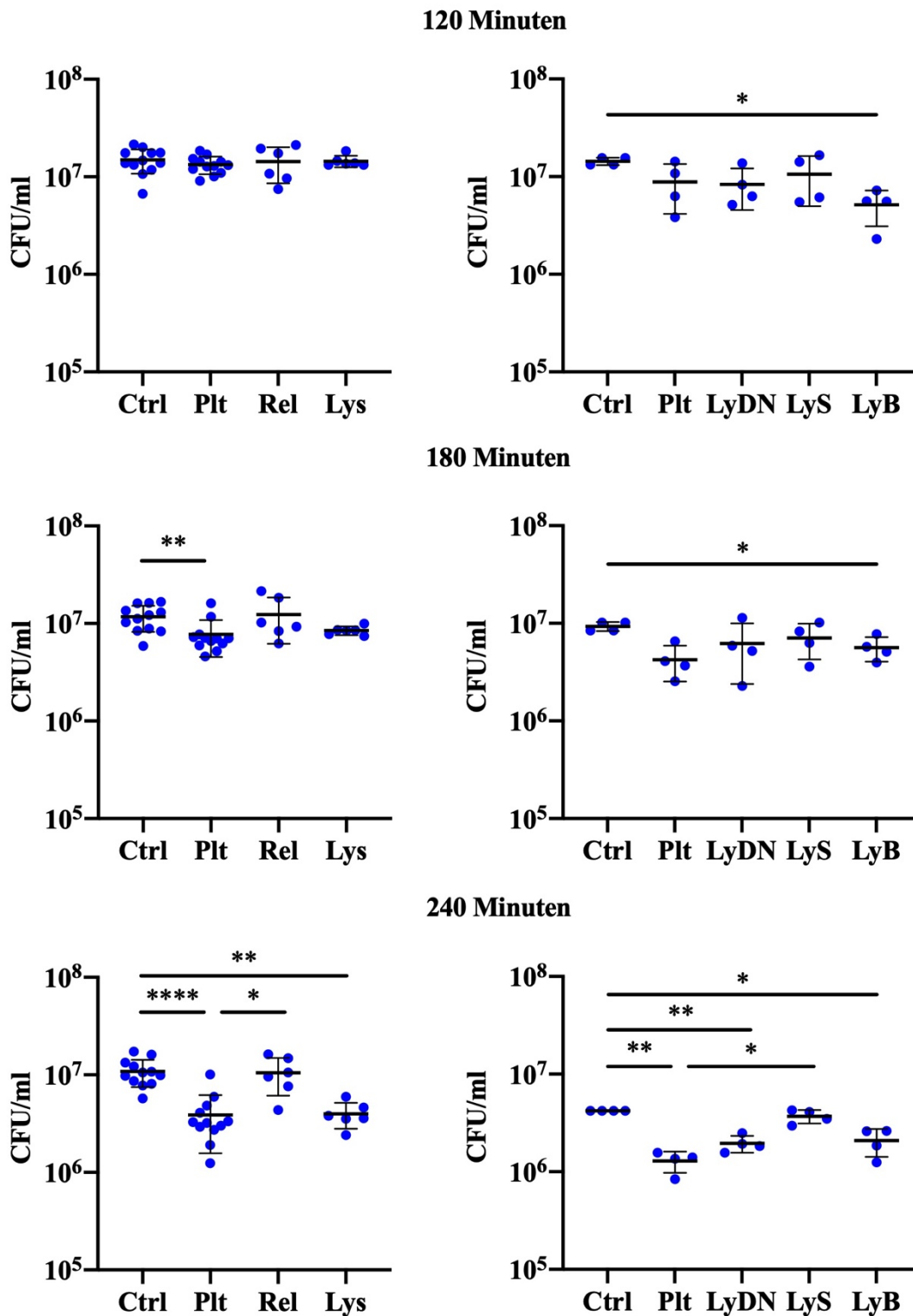


Abbildung 11 - Einfluss von Releasate und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4. Kolonieformenden Einheiten (CFU/ml) von TIGR4 nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl), Thrombozytensuspension (Plt), Releasate aktivierter Thrombozyten (Rel), Thrombozytenlysat (Lys), denaturiertem Thrombozytenlysat (LyDN), filtrierte LySAT mit Molekülen < 10 kDa (LyS) oder > 10 kDa (LyB) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

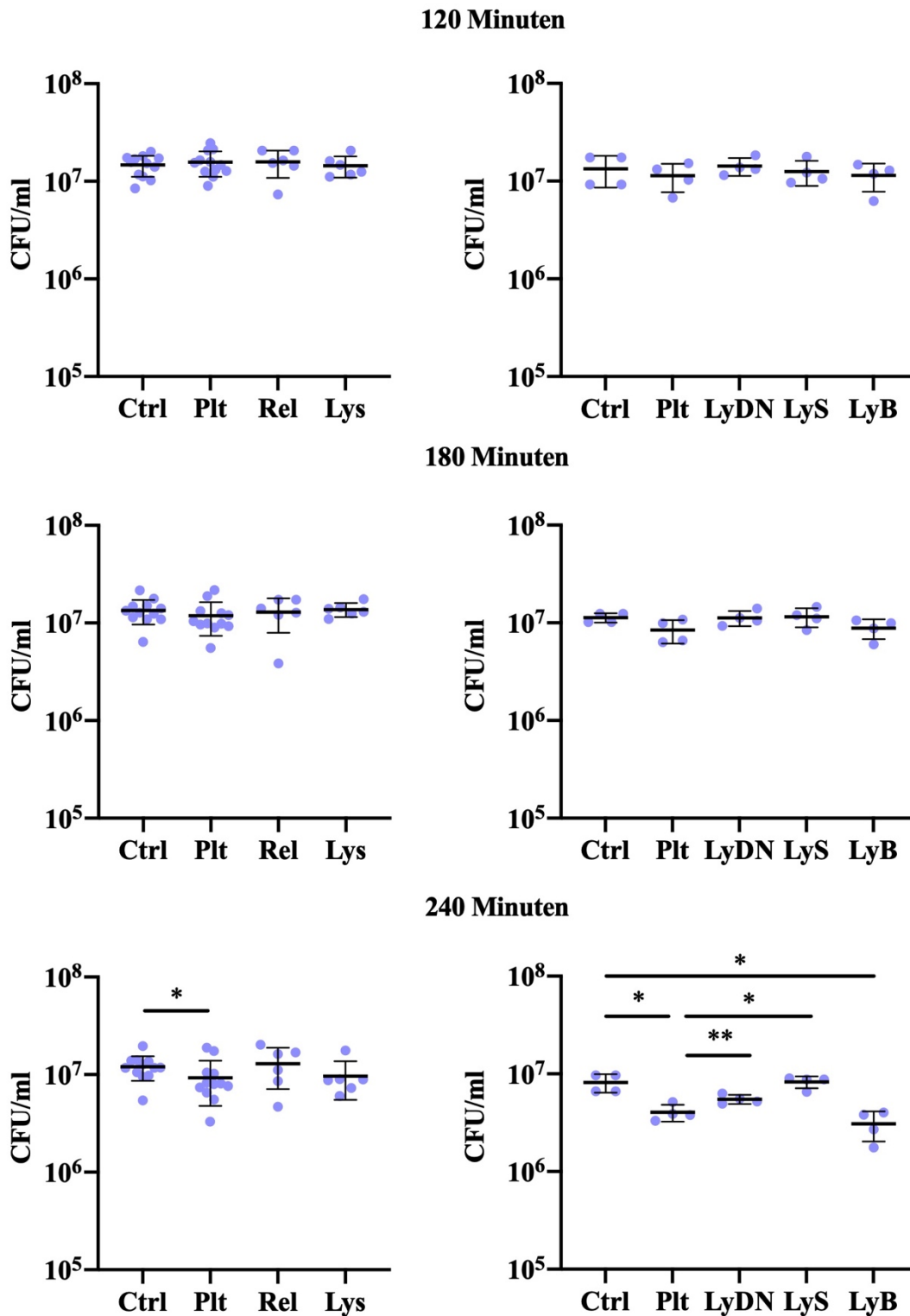


Abbildung 12 - Einfluss von Release und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4Δply. Kolonieformenden Einheiten (CFU/ml) von TIGR4Δply nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl), Thrombozytensuspension (Plt), Release aktivierter Thrombozyten (Rel), Thrombozytenlysate (Lys), denaturiertem Thrombozytenlysate (LyDN), filtriertem Lysate mit Molekülen < 10 kDa (LyS) oder filtriertem Lysate mit Molekülen > 10 kDa (LyB) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

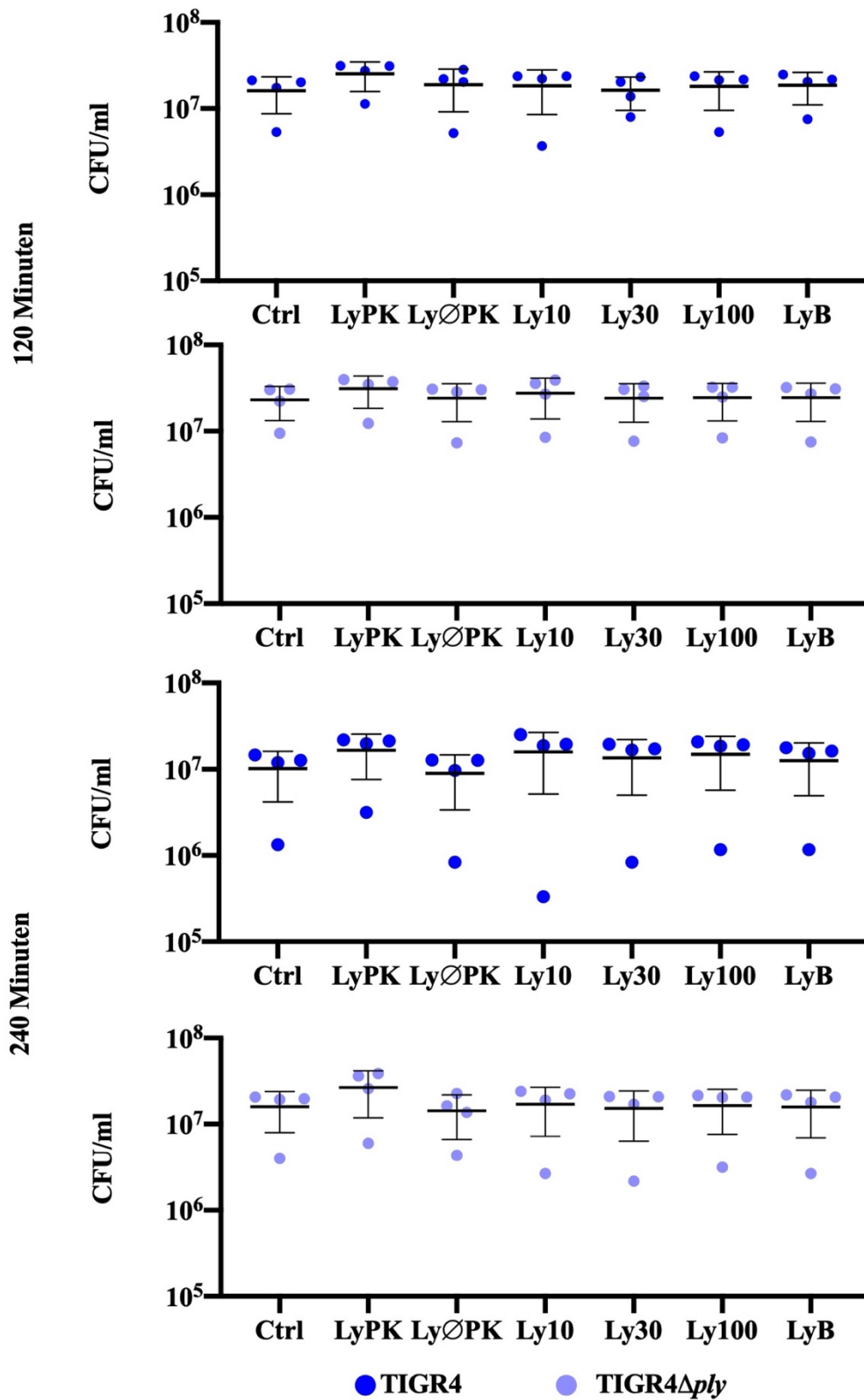


Abbildung 13 - Einfluss von verschieden behandelten Lysaten auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4Δply. Kolonieformende Einheiten (CFU/ml) von TIGR4 und TIGR4Δply nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl), Proteinase K behandeltem Thrombozytenlysat (LyPK), einem Kontrollansatz ohne Proteinase (LyØPK) sowie filtriertem Lysat mit Molekülen < 10 kDa (Ly10), 10 - 30 kDa (Ly30), 30 - 100 kDa (Ly100) oder > 100 kDa (LyB) (* p≤0,05, ** p≤0,01, *** p≤0,001, **** p≤0,0001)

4 Diskussion

4.1 Einordnung der wichtigen Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde der stammspezifische Einfluss von Thrombozyten und Pneumokokken aufeinander untersucht. Die anfangs aufgezählten Fragestellungen konnten dabei wie folgt beantwortet werden:

4.1.1 Haben Pneumokokken einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion?

Wie bereits in anderen Arbeiten gezeigt, führt die Inkubation von Thrombozyten mit Pneumokokken zu einem Anstieg der CD62P Expression (54,55,59). Anschließend konnte kein weiterer Anstieg durch Stimulation mit TRAP-6 beobachtet werden. Die Gründe hierfür sind die Porenbildung durch Pneumolysin, daraus folgend ein vollständiger Funktionsverlust der Thrombozyten sowie die intrazelluläre CD62P- Färbung (54).

In dieser Arbeit wurde dies für drei der vier Stämme bestätigt (Serotyp 2 (D39), Serotyp 4 (TIGR4) und Serotyp 19F). Für den Serotyp 6B wurde zwar ein signifikanter Anstieg der CD62P Expression gezeigt, jedoch blieben hier die Thrombozyten auch nach längerer Exposition reagibel für TRAP-6. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es wie von Price et al 2009 beschrieben einzelne Stämme von Pneumokokken gibt, welche kaum Pneumolysin extrazellulär präsentieren, sondern dies erst bei Lyse freigesetzt wird (60). Zudem könnte auch die stamm- und bakterienspezifische Ausschüttung von Pneumolysin wie von Surve et al 2018 beschrieben, den Unterschied in der Reaktion der Thrombozyten erklären (61).

4.1.2 Haben pneumolysinfreie Mutanten einen anderen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion als Wildtyp-Pneumokokken?

Dass auch die Inkubation mit unbekapselten, pneumolysinfreien Mutanten zu einer Aggregation von Thrombozyten führt, wurde bereits von Keane et al 2010 gezeigt (55). Diese Arbeit zeigt, dass auch die bekapselte Mutanten TIGR4 Δ ply und D39 Δ ply zu einer Aktivierung von Thrombozyten führen.

Die Beobachtung beim Serotyp 6B und die nachgewiesene Aktivierung von Thrombozyten durch Pneumolysin defiziente Mutanten sprechen dafür, dass auch andere Bestandteile, wie beispielsweise die Kapsel der Pneumokokken, eine aktivierende Wirkung auf die Thrombozyten haben. Andererseits schränkt diese Aktivierung die Funktion der Thrombozyten nicht ein. Da jedoch das Pneumolysin verantwortlich ist für eine Porenbildung und den daraus folgenden Funktionsverlust der Thrombozyten, war dieser Effekt für die pneumolysinfreien Mutanten zu erwarten.

4.1.3 Haben Thrombozyten einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken? Gibt es stammspezifische Unterschiede oder eine Abhängigkeit von Pneumolysin im Einfluss von Thrombozyten auf das Pneumokokkenwachstum?

Wolff et al 2020 und Palankar et al 2018 haben gezeigt, dass Thrombozyten in der Lage sind, das Wachstum von *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* zu hemmen (27,28). Maghsoudi et al 2017 zeigten Gleiches für thrombozytenreiches Plasma und *Streptococcus agalacticae*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* sowie *Staphylococcus epidermidis* (62). Für Pneumokokken blieb dieser Effekt in bisherigen Untersuchungen jedoch aus (27). In dieser Arbeit konnte nun erstmals ein heterogenes Bild für die untersuchten Stämme gezeigt werden. Drei der vier untersuchten Stämme zeigten kein verändertes Wachstum nach der Inkubation mit Thrombozyten. Bei Serotyp 4 (TIGR4) kam es nach Inkubation mit Thrombozyten jedoch zu einem signifikant geringeren Wachstum.

Hamaguchi et al 2018 zeigten unabhängig von Thrombozyten, dass sich die Überlebensrate von Pneumokokken zwischen den Serotypen und in Abhängigkeit von der Kapselgröße unterscheidet. Erstaunlicherweise zeigte der Serotyp 4 dort im Vergleich mit den Serotypen 2 und 19F bei gleicher Kapselgröße ein höheres Überleben (63). In den hier präsentierten Ergebnissen ist dieser Serotyp jedoch der einzige mit einer Wachstumshemmung. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Serotyp 4 für die antimikrobiellen Substanzen aus Thrombozyten zugänglicher ist als die Serotypen 2, 6B und 19F. Dieser Effekt ist zudem unabhängig von Pneumolysin, da auch bei der pneumolysinfreien Mutante TIGR4 Δ ply eine Hemmung des Wachstums auftrat.

4.1.4 Haben pneumolysinspezifische Antikörper oder humane Antikörperringemische (i.v. IgG) einen Einfluss auf die Pneumokokken-Thrombozyten Interaktion?

Durch Jahn et al 2020 wurde gezeigt, dass pneumolysinspezifische Antikörper oder humanes i.v. IgG die Reaktion der Thrombozyten auf TRAP-6 nach der Inkubation mit Pneumolysin erhalten können (54).

Mit dieser Arbeit wurde gezeigt, dass dieser Effekt sich auf alle vier getesteten Stämme und alle Zeitpunkte sowohl für monoklonale Maus-Antikörper als auch für humanes i.v. Antikörperringemisch übertragen lässt. Bei der Inkubation mit polyklonalen Kaninchenantikörpern scheinen weitere Interaktionen zwischen Antikörpern und Thrombozyten abzulaufen, sodass zwar eine geringe CD62P Expression auftrat, eine zusätzliche Steigerung durch TRAP-6 jedoch nicht möglich war.

Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz zum Wildtyp bei der pneumolysinfreien Mutante TIGR4 Δ *ply* ein höheres CD62P Signal bei Inkubation mit i.v. IgG. Dies entspricht wahrscheinlich der bereits durch Watson et al 2016 und Moriarty et al 2016 beschriebenen höheren Aktivierung von Thrombozyten in Gegenwart von IgG und Pathogenen, welche auf eine Signalkaskade durch den Fc γ RIIa zurückzuführen ist (15,18). Dies wird auch durch die in dieser Arbeit beschriebene Aktivierung der Thrombozyten allein durch i.v. IgG und deren Ausbleiben bei Zugabe von IV.3 Antikörpern gestützt.

Jahn et al 2020 zeigten, dass unter Verwendung von i.v. IgG die Funktion der Thrombozyten bewahrt werden kann (54). Diese Arbeit macht zudem deutlich, dass auch die Konzentration der Thrombozyten durch Zugabe von i.v. IgG stabil gehalten wird. Da Thrombozyten die Integrität von Blutgefäßen sichern, könnten die Ergebnisse ein Hinweis darauf sein, dass die Verwendung humaner Immunglobuline einen Überlebensvorteil bei invasiven Pneumokokkenerkrankungen bietet (64). Passend dazu zeigte sich in den klinischen Daten zum Einsatz von Trimodulin (einem Präparat mit anteiligem humanen IgG) bei Jahn et al 2020 ein nominell höheres Überleben im Rahmen einer Pneumokokken-Pneumonie mit respiratorischem Versagen (54).

Im Blick auf stammspezifische Unterschiede wurde bei den Stämmen 6B und 19F eine stärkere Abnahme der Thrombozytenzahl nach Inkubation ohne i.v. IgG gezeigt. Nach Sleeman et al kommt es bei diesen Stämmen häufiger zur Besiedlung, aber seltener zu einer invasiven Infektion (49). Zugleich sind in einer Metaanalyse zur Sterblichkeit bei invasiven Pneumokokkenerkrankungen von Weinberger et al 2010 diese Stämme mit einer hohen Mortalität beschrieben (65). Dies könnte daran liegen, dass es nach Überwinden der immunologischen Barriere bei invasiver Erkrankung zu einem stärkeren Absinken der Thrombozytenkonzentration kommt. Entsprechend der Notwendigkeit von Thrombozyten für die Abdichtung von endothelialen Schwachstellen könnte dies zu fulminanteren Verläufen führen (64). Diese These lässt sich durch eine Arbeit von Burgos et. al. 2014 unterstützen, in welche gezeigt wurde, dass insbesondere der Serotyp 19F zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für Lungenversagen und maschinelle Beatmung führte (37).

Eine andere Beobachtung war das Ausbleiben des wachstumshemmenden Effektes von Thrombozyten auf die Stämme TIGR4 und TIGR4 Δ *ply* nach der Zugabe von humanem i.v. IgG. Wahrscheinlich ist dies auf die verminderte Freisetzung von Defensinen und anderen mikrobiellen Substanzen aus den Thrombozyten aufgrund der verminderten Aktivierung sowie der verminderten pneumolysininduzierten Lyse zurückzuführen. So zeigten Kraemer et al 2010, dass eine Ausschüttung von hBD-1, welches das Wachstum von *S. Aureus* hemmt, durch

dessen porenbildendes α -Toxin ausgelöst wird (20). Dort blieb jedoch die Abnahme der wachstumshemmenden Wirkung durch die Zugabe von IgG aus (20). Fraglich ist, ob sich die Erkenntnisse auf Pneumokokken und Pneumolysin übertragen lassen.

Weiterhin konnten Palankar et al 2018 zeigen, dass die Wachstumshemmung von E.Coli auf eine Interaktion von PF4, PF4 bindenden IgG Antikörpern und den Fc γ RIIA zurückzuführen ist (28). Da bei aufgereinigten Thrombozyten PF4 lediglich durch die Ausschüttung von Granula freigesetzt wird, könnte eine geringere Aktivierung aufgrund einer niedrigeren Menge an PF4 zu einer reduzierten Wachstumshemmung führen.

4.1.5 Kann eine Substanz aus den Thrombozyten identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Wachstum von Pneumokokken hat?

Es wurde in diesem Zusammenhang nachgewiesen, dass die Wachstumshemmung durch eine Substanz aus dem Lysat von Thrombozyten verursacht wird, welche hitzebeständig und größer als 10 kDa ist. In dieser Größenunterscheidung kommen Defensine, welche eine Größe von 3-4 kDa zeigen, sowie PF-4 als Monomer (7,8 kDa) nicht in Frage (66,67).

Eine weitere Eingrenzung war aufgrund fehlender Beständigkeit des Effekts nach Lagerung des Lysats bei -20°C nicht möglich.

4.2 Anknüpfungspunkte für künftige Forschung

4.2.1 Anwendungen von humanem IgG

Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die Interaktion zwischen Thrombozyten und Pneumokokken vollends zu verstehen und klinisch anwendbare Schlüsse zu ziehen. Es konnte gezeigt werden, dass Pneumolysin einen Funktionsverlust von Thrombozyten erzeugt, welcher beispielsweise durch IgG Präparate unterbunden werden kann. Wiebe et al. machten deutlich, dass dies nicht nur auf die Reaktion auf TRAP-6 zutrifft, sondern auch auf die Thrombusbildung und die Fähigkeit, Defekte zu verschließen (68). Diese Erkenntnisse wurden für mehrere pathogene Stämme bestätigt und können einen Anknüpfungspunkt für die Vermeidung schwerwiegender Komplikationen einer invasiven Pneumokokkenerkrankung bieten. Jedoch wäre hierzu die Erhebung klinischer Daten notwendig.

4.2.2 Ausweitung auf weitere Serotypen

Zudem fokussiert sich diese Arbeit auf nur vier der über 100 bekannten Serotypen, welche alle durch die aktuellen Impfungen abgedeckt sind (69). Da sich seit Einführung der Impfstoffe eine

Verschiebung hin zu nicht-impfbaren Serotypen vollzieht, sind diese für eine weitere Erforschung besonders interessant (69).

Erneut bestätigt diese Arbeit Pneumolysin als einen wichtigen Virulenzfaktor der Pneumokokken, welcher zudem unabhängig vom Serotyp ist. Pneumolysin könnte damit ein Kandidat sein, wenn es um die Entwicklung serotypunabhängiger Impfstoffe geht. In diesen Bereich zielt beispielsweise die Entwicklung des PnuBioVax Impfstoff, welcher unter anderem eine Immunität gegen Pneumolysin erzeugen soll und bereits in einer Phase-I-Studie getestet wurde (70).

4.2.3 Zusammenspiel mit anderen Immunzellen

In den durchgeführten Experimenten wurde lediglich die Interaktion zwischen aufgereinigten Thrombozyten und Pneumokokken untersucht. Thrombozyten interagieren jedoch im Blut mit verschiedenen Immunzellen, beispielsweise mit neutrophilen Granulozyten über P-Selektin und P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 oder B-Zellen über CD40-L und CD40 (7,25,26,71). Diese Aspekte sollten in der zukünftigen Forschung zum Beispiel durch Zusatz einzelner aufgereinigter Immunzellen untersucht werden, um die genaue Bedeutung von Thrombozyten als Zellen der Immunabwehr zu beleuchten.

4.2.4 Sonstige Anknüpfungspunkte

Zuletzt könnten die genauere Eingrenzung und Bestimmung des Substrates aus Thrombozyten, welches für den wachstumshemmenden Effekt gegenüber TIGR4 verantwortlich ist, ein Ansatz sein. Hier könnte die Aufreinigung und der hochkonzentrierte Einsatz der Substanz möglicherweise einen Ansatz zur Bekämpfung von Pneumokokkeninfektionen bieten.

In der Zusammenschau liefert diese Arbeit einen weiteren Baustein zum Verständnis der Interaktion zwischen Thrombozyten und Pneumokokken mit möglichen, klinisch relevanten Ansatzpunkten für Therapie und Prävention von Komplikationen im Rahmen von Pneumokokkeninfektionen.

5 Zusammenfassung

In dieser Promotion wurde die Interaktion zwischen Thrombozyten und verschiedenen *Streptococcus pneumoniae* Stämmen untersucht. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Bedeutung des Pneumolysin gelegt, welches einen bedeutenden Virulenzfaktor der Pneumokokken darstellt. Es wurden vier verschiedene Pneumokokkenstämme untersucht, welche in vivo unterschiedlich häufig invasive Erkrankungen auslösen.

Im Einklang mit der Literatur bestätigt diese Arbeit, dass eine Inkubation von Thrombozyten mit Wildtyp-Pneumokokken zu einer erhöhten Anfärbbarkeit von CD62-P sowie einem Verlust der Reagibilität auf TRAP6 führt. Zugleich wurde durch die Inkubation mit pneumolysindefizienten Mutanten gezeigt, dass dieser Effekt ohne Pneumolysin nicht auftritt. Anschließend wurde durch Pneumolysinantikörper aus Mäusen und Kaninchen sowie durch humane IgG Präparate gezeigt, dass durch Zugabe von Antikörpern ein Schutz der Thrombozyten vor dem Funktionsverlust möglich ist.

Außerdem führt die Inkubation mit Wildtypneumokokken zu einer Abnahme der Thrombozytenkonzentration. Auch diesem Effekt konnte durch die Zugabe von humanem IgG entgegengewirkt werden.

Beim Einfluss der Thrombozyten auf das Wachstum von Pneumokokken zeigte sich ein heterogenes Bild. Es konnte für den untersuchten Stamm TIGR 4 sowie die pneumolysindefiziente Mutante TIGR4 Δ *ply* ein wachstumshemmender Effekt der Inkubation mit Thrombozyten nachgewiesen werden. Eine genaue Eingrenzung der verantwortlichen Substanz aus den Thrombozyten war nicht möglich. Es wurde jedoch gezeigt, dass es sich um einen hitzeempfindlichen Stoff mit einer Größe von >10 kDa handeln muss.

Diese Arbeit liefert einen weiteren Baustein in der Betrachtung der Interaktion zwischen dem Menschen und Pneumokokken als weit verbreitetem Pathogen. Um die genaue Rolle der Thrombozyten in der Interaktion zu verstehen, sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, welche beispielsweise die Interaktion zwischen Thrombozyten und anderen Immunzellen in die Betrachtung einbeziehen. Zugleich liefert die Arbeit weitere Hinweise zur besonderen Bedeutung von Pneumolysin als Serotyp unabhängigen Virulenzfaktor, welcher somit insbesondere für die Entwicklung von Impfstoffen interessant ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.* Juni 2017;36(2):195–8.
2. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood.* 15. Juli 2003;102(2):449–61.
3. Ma Y -Q., Qin J, Plow EF. Platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$: activation mechanisms. *J Thromb Haemost.* Juli 2007;5(7):1345–52.
4. Berndt MC, Metharom P, Andrews RK. Primary haemostasis: newer insights. *Haemophilia.* Mai 2014;20:15–22.
5. Behari M, Shrivastava M. Role of platelets in neurodegenerative diseases: a universal pathophysiology. *Int J Neurosci.* 6. März 2013;123(5):287–99.
6. Portier I, Campbell RA. Role of Platelets in Detection and Regulation of Infection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Januar 2021;41(1):70–8.
7. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation, and Thrombosis. *Circ Res.* 19. Januar 2018;122(2):337–51.
8. Cox D, Kerrigan SW, Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost.* Juni 2011;9(6):1097–107.
9. Maouia A, Rebetz J, Kapur R, Semple JW. The Immune Nature of Platelets Revisited. *Transfus Med Rev.* Oktober 2020;34(4):209–20.
10. Liu X, Liu H, Luo X, Zhang P, Gao Y, Xie S, Xu K, Chang J, Ma L. Strains of Group B streptococci from septic patients induce platelet activation via Toll-like Receptor 2. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* März 2017;44(3):335–43.
11. Assinger A, Kral JB, Yaiw KC, Schrottmaier WC, Kurzejamska E, Wang Y, Mohammad AA, Religa P, Rahbar A, Schabbauer G, Butler LM, Söderberg-Naucler C. Human Cytomegalovirus–Platelet Interaction Triggers Toll-Like Receptor 2–Dependent Proinflammatory and Proangiogenic Responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* April 2014;34(4):801–9.

12. Cognasse F, Hamzeh-Cognasse H, Lafarge S, Delezay O, Pozzetto B, McNicol A, Garraud O. Toll-like receptor 4 ligand can differentially modulate the release of cytokines by human platelets. *Br J Haematol*. April 2008;141(1):84–91.
13. Quirino-Teixeira AC, Rozini SV, Barbosa-Lima G, Coelho DR, Carneiro PH, Mohana-Borges R, Bozza PT, Hottz ED. Inflammatory signaling in dengue-infected platelets requires translation and secretion of nonstructural protein 1. *Blood Adv*. 12. Mai 2020;4(9):2018–31.
14. Chaipan C, Soilleux EJ, Simpson P, Hofmann H, Gramberg T, Marzi A, Geier M, Stewart EA, Eisemann J, Steinkasserer A, Suzuki-Inoue K, Fuller GL, Pearce AC, Watson SP, Hoxie JA, Baribaud F, Pöhlmann S. DC-SIGN and CLEC-2 Mediate Human Immunodeficiency Virus Type 1 Capture by Platelets. *J Virol*. 15. September 2006;80(18):8951–60.
15. Moriarty RD, Cox A, McCall M, Smith SGJ, Cox D. *Escherichia coli* induces platelet aggregation in an FcγRIIa-dependent manner. *J Thromb Haemost*. April 2016;14(4):797–806.
16. Boilard E, Paré G, Rousseau M, Cloutier N, Dubuc I, Lévesque T, Borgeat P, Flamand L. Influenza virus H1N1 activates platelets through FcγRIIA signaling and thrombin generation. *Blood*. 1. Mai 2014;123(18):2854–63.
17. McNicol A. Bacteria-induced intracellular signalling in platelets. *Platelets*. 19. Mai 2015;26(4):309–16.
18. Watson CN, Kerrigan SW, Cox D, Henderson IR, Watson SP, Arman M. Human platelet activation by *Escherichia coli* : roles for FcγRIIA and integrin αIIbβ3. *Platelets*. 17. August 2016;27(6):535–40.
19. Hu H, Armstrong PCJ, Khalil E, Chen YC, Straub A, Li M, Soosairajah J, Hagemeyer CE, Bassler N, Huang D, Ahrens I, Krippner G, Gardiner E, Peter K. GPVI and GPIIbα Mediate Staphylococcal Superantigen-Like Protein 5 (SSL5) Induced Platelet Activation and Direct toward Glycans as Potential Inhibitors. Tse H, Herausgeber. *PLoS ONE*. 28. April 2011;6(4):e19190.
20. Kraemer BF, Campbell RA, Schwertz H, Cody MJ, Franks Z, Tolley ND, Kahr WHA, Lindemann S, Seizer P, Yost CC, Zimmerman GA, Weyrich AS. Novel Anti-bacterial

Activities of β -defensin 1 in Human Platelets: Suppression of Pathogen Growth and Signaling of Neutrophil Extracellular Trap Formation. DeLeo FR, Herausgeber. PLoS Pathog. 10. November 2011;7(11):e1002355.

21. Valle-Jiménez X, Ramírez-Cosmes A, Aquino-Domínguez AS, Sánchez-Peña F, Bustos-Arriaga J, Romero-Tlalolini MDLÁ, Torres-Aguilar H, Serafín-López J, Aguilar Ruíz SR. Human platelets and megakaryocytes express defensin alpha 1. Platelets. 2. April 2020;31(3):344–54.
22. Yeaman MR. Platelets: at the nexus of antimicrobial defence. Nat Rev Microbiol. Juni 2014;12(6):426–37.
23. Schrottmaier W, Kral J, Badrnya S, Assinger A. Aspirin and P2Y₁₂ Inhibitors in platelet-mediated activation of neutrophils and monocytes. Thromb Haemost. 2015;114(09):478–789.
24. Ghasemzadeh M, Kaplan ZS, Alwis I, Schoenwaelder SM, Ashworth KJ, Westein E, Hosseini E, Salem HH, Slattery R, McColl SR, Hickey MJ, Ruggeri ZM, Yuan Y, Jackson SP. The CXCR1/2 ligand NAP-2 promotes directed intravascular leukocyte migration through platelet thrombi. Blood. 30. Mai 2013;121(22):4555–66.
25. Cognasse F, Duchez AC, Audoux E, Ebermeyer T, Arthaud CA, Prier A, Eyraud MA, Mismetti P, Garraud O, Bertoletti L, Hamzeh-Cognasse H. Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40. Front Immunol. 3. Februar 2022;13:825892.
26. Zarbock A, Polanowska-Grabowska RK, Ley K. Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation. Blood Rev. März 2007;21(2):99–111.
27. Wolff M, Handtke S, Palankar R, Wesche J, Kohler TP, Kohler C, Gruel Y, Hammerschmidt S, Greinacher A. Activated platelets kill *Staphylococcus aureus*, but not *Streptococcus pneumoniae* —The role of Fc γ RIIa and platelet factor 4/heparinantibodies. J Thromb Haemost. Juni 2020;18(6):1459–68.
28. Palankar R, Kohler TP, Krauel K, Wesche J, Hammerschmidt S, Greinacher A. Platelets kill bacteria by bridging innate and adaptive immunity via PLATELET FACTOR 4 and Fc γ RIIA. J Thromb Haemost. Juni 2018;16(6):1187–97.

29. Gaertner F, Ahmad Z, Rosenberger G, Fan S, Nicolai L, Busch B, Yavuz G, Luckner M, Ishikawa-Ankerhold H, Hennel R, Benechet A, Lorenz M, Chandraratne S, Schubert I, Helmer S, Striednig B, Stark K, Janko M, Böttcher RT, Verschoor A, Leon C, Gachet C, Gudermann T, Mederos y Schnitzler M, Pincus Z, Iannacone M, Haas R, Wanner G, Lauber K, Sixt M, Massberg S. Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*. November 2017;171(6):1368-1382.e23.
30. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol*. Juni 2018;16(6):355–67.
31. Bridy-Pappas AE, Margolis MB, Center KJ, Isaacman DJ. *Streptococcus pneumoniae* : Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention. *Pharmacotherapy*. 2. August 2005;25(9):1193–212.
32. Brooks LRK, Mias GI. *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol*. 22. Juni 2018;9:1366.
33. Keller LE, Robinson DA, McDaniel LS. Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*: Emergence and Pathogenesis. *Camilli A, Collier RJ, Herausgeber. mBio*. 4. Mai 2016;7(2):e01792-15.
34. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*. Juli 2015;28(3):871–99.
35. Mitchell AM, Mitchell TJ. *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors and variation. *Clin Microbiol Infect*. Mai 2010;16(5):411–8.
36. Leung AKC, Wong AHC, Hon KL. Community-Acquired Pneumonia in Children. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 11. September 2018;12(2):136–44.
37. Burgos J, Lujan M, Larrosa MN, Fontanals D, Bermudo G, Planes AM, Puig M, Rello J, Falco V, Pahissa A. Risk factors for respiratory failure in pneumococcal pneumonia: the importance of pneumococcal serotypes. *Eur Respir J*. 1. Februar 2014;43(2):545–53.
38. van de Beek D, Brouwer MC, Koedel U, Wall EC. Community-acquired bacterial meningitis. *The Lancet*. September 2021;398(10306):1171–83.

39. Ziane H, Manageiro V, Ferreira E, Moura IB, Bektache S, Tazir M, Caniça M. Serotypes and Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* Isolates from Invasive Pneumococcal Disease and Asymptomatic Carriage in a Pre-vaccination Period, in Algeria. *Front Microbiol.* 14. Juni 2016;7.
40. Jansen AGSC, Rodenburg GD, Van Der Ende A, van Alphen L, Veenhoven RH, Spanjaard L, Sanders EAM, Hak E. Invasive Pneumococcal Disease among Adults: Associations among Serotypes, Disease Characteristics, and Outcome. *Clin Infect Dis.* 15. Juli 2009;49(2):e23–9.
41. Cools F, Delputte P, Cos P. The search for novel treatment strategies for *Streptococcus pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev.* 5. Januar 2021;fuaa072.
42. Hyams C, Camberlein E, Cohen JM, Bax K, Brown JS. The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. *Infect Immun.* Februar 2010;78(2):704–15.
43. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : INDUCTION OF TRANSFORMATION BY A DESOXYRIBONUCLEIC ACID FRACTION ISOLATED FROM PNEUMOCOCCUS TYPE III. *J Exp Med.* 1. Februar 1944;79(2):137–58.
44. Aaberge IS, Eng J, Lermark G, Løvik M. Virulence of *Streptococcus pneumoniae* in mice: a standardized method for preparation and frozen storage of the experimental bacterial inoculum. *Microb Pathog.* Februar 1995;18(2):141–52.
45. Imöhl M, Reinert RR, Ocklenburg C, van der Linden M. Association of Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* with Age in Invasive Pneumococcal Disease. *J Clin Microbiol.* April 2010;48(4):1291–6.
46. Orihuela CJ, Gao G, Mcgee M, Yu J, Francis KP, Tuomanen E. Organ-specific models of *Streptococcus pneumoniae* Disease. *Scand J Infect Dis.* Januar 2003;35(9):647–52.
47. Brueggemann AB, Peto TEA, Crook DW, Butler JC, Kristinsson KG, Spratt BG. Temporal and Geographic Stability of the Serogroup-Specific Invasive Disease Potential of *Streptococcus pneumoniae* in Children. *J Infect Dis.* Oktober 2004;190(7):1203–11.

48. Brueggemann AB, Griffiths DT, Meats E, Peto T, Crook DW, Spratt BG. Clonal Relationships between Invasive and Carriage *Streptococcus pneumoniae* and Serotype- and Clone-Specific Differences in Invasive Disease Potential. *J Infect Dis.* Mai 2003;187(9):1424–32.
49. Sleeman KL, Griffiths D, Shackley F, Diggle L, Gupta S, Maiden MC, Moxon ER, Crook DW, Peto TEA. Capsular Serotype-Specific Attack Rates and Duration of Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in a Population of Children. *J Infect Dis.* September 2006;194(5):682–8.
50. Sjostrom K, Spindler C, Ortqvist A, Kalin M, Sandgren A, Kuhlmann-Berenzon S, Normark BH. Clonal and Capsular Types Decide Whether Pneumococci Will Act as a Primary or Opportunistic Pathogen. *Clin Infect Dis.* 15. Februar 2006;42(4):451–9.
51. Burgos J, Falcó V, Borrego A, Sordé R, Larrosa MN, Martínez X, Planes AM, Sánchez A, Palomar M, Rello J, Pahissa A. Impact of the emergence of non-vaccine pneumococcal serotypes on the clinical presentation and outcome of adults with invasive pneumococcal pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* April 2013;19(4):385–91.
52. Guckian JC. Effect of pneumococci on blood clotting, platelets, and polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* Oktober 1975;12(4):910–8.
53. Niemann S, Kehrel BE, Heilmann C, Rennemeier C, Peters G, Hammerschmidt S. Pneumococcal association to platelets is mediated by soluble fibrin and supported by thrombospondin-1. *Thromb Haemost.* 2009;102(10):735–42.
54. Jahn K, Handtke S, Palankar R, Weißmüller S, Nouailles G, Kohler TP, Wesche J, Rohde M, Heinz C, Aschenbrenner AF, Wolff M, Schüttrumpf J, Witzentrath M, Hammerschmidt S, Greinacher A. Pneumolysin induces platelet destruction, not platelet activation, which can be prevented by immunoglobulin preparations in vitro. *Blood Adv.* 22. Dezember 2020;4(24):6315–26.
55. Keane C, Tilley D, Cunningham A, Smolenski A, Kadioglu A, Cox D, Jenkinson HF, Kerrigan SW. Invasive *Streptococcus pneumoniae* trigger platelet activation via Toll-like receptor 2. *J Thromb Haemost.* Dezember 2010;8(12):2757–65.

56. Feldman C, Anderson R. Platelets and Their Role in the Pathogenesis of Cardiovascular Events in Patients With Community-Acquired Pneumonia. *Front Immunol.* 17. September 2020;11:577303.
57. Bartlett B, Ludewick HP, Lee S, Dwivedi G. Cardiovascular complications following pneumonia: focus on pneumococcus and heart failure. *Curr Opin Cardiol.* März 2019;34(2):233–9.
58. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* 2. Dezember 1991;66(6):734–6.
59. Letsiou E, Teixeira Alves LG, Felten M, Mitchell TJ, Müller-Redetzky HC, Dudek SM, Witzernath M. Neutrophil-Derived Extracellular Vesicles Activate Platelets after Pneumolysin Exposure. *Cells.* 18. Dezember 2021;10(12):3581.
60. Price KE, Camilli A. Pneumolysin Localizes to the Cell Wall of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol.* April 2009;191(7):2163–8.
61. Surve MV, Bhutda S, Datey A, Anil A, Rawat S, Pushpakaran A, Singh D, Kim KS, Chakravorty D, Banerjee A. Heterogeneity in pneumolysin expression governs the fate of *Streptococcus pneumoniae* during blood-brain barrier trafficking. Tuomanen EI, Herausgeber. *PLOS Pathog.* 16. Juli 2018;14(7):e1007168.
62. Maghsoudi O, Ranjbar R, Mirjalili SH, Fasihi-Ramandi M. Inhibitory Activities of Platelet-Rich and Platelet-Poor Plasma on the Growth of Pathogenic Bacteria. *Iran J Pathol.* 2017;12(1):79–87.
63. Hamaguchi S, Zafar MA, Cammer M, Weiser JN. Capsule Prolongs Survival of *Streptococcus pneumoniae* during Starvation. Freitag NE, Herausgeber. *Infect Immun.* März 2018;86(3):e00802-17.
64. Ho-Tin-Noé B, Demers M, Wagner DD. How platelets safeguard vascular integrity. *J Thromb Haemost.* Juli 2011;9:56–65.
65. Weinberger DM, Harboe ZB, Sanders EAM, Ndiritu M, Klugman KP, Rückinger S, Dagan R, Adegbola R, Cutts F, Johnson HL, O'Brien KL, Anthony Scott J, Lipsitch M.

- Association of Serotype with Risk of Death Due to Pneumococcal Pneumonia: A Meta-Analysis. *Clin Infect Dis*. 15. September 2010;51(6):692–9.
66. Lakka Klement G, Shai E, Varon D. The Role of Platelets in Angiogenesis. In: *Platelets*. Academic Press; 2013. S. 487–502.
67. Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest*. 15. April 1998;101(8):1633–42.
68. Wiebe F, Handtke S, Wesche J, Schnarre A, Palankar R, Wolff M, Jahn K, Voß F, Weißmüller S, Schüttrumpf J, Greinacher A, Hammerschmidt S. Polyvalent Immunoglobulin Preparations Inhibit Pneumolysin-Induced Platelet Destruction. *Thromb Haemost*. Juli 2022;122(07):1147–58.
69. Vadlamudi NK, Chen A, Marra F. Impact of the 13-Valent Pneumococcal Conjugate Vaccine Among Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 18. Juni 2019;69(1):34–49.
70. Entwisle C, Hill S, Pang Y, Joachim M, McIlgorm A, Colaco C, Goldblatt D, De Gorguette D'Argoeuves P, Bailey C. Safety and immunogenicity of a novel multiple antigen pneumococcal vaccine in adults: A Phase 1 randomised clinical trial. *Vaccine*. 18. Dezember 2017;35(51):7181–6.
71. Elzey BD, Tian J, Jensen RJ, Swanson AK, Lees JR, Lentz SR, Stein CS, Nieswandt B, Wang Y, Davidson BL, Ratliff TL. Platelet-Mediated Modulation of Adaptive Immunity. *Immunity*. Juli 2003;19(1):9–19.

7 Appendix

<i>I.</i>	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>48</i>
<i>II.</i>	<i>Tabellen der Mittel- und p-Werte</i>	<i>50</i>
<i>III.</i>	<i>Eidesstattliche Erklärung</i>	<i>55</i>
<i>IV.</i>	<i>Lebenslauf</i>	<i>56</i>
<i>V.</i>	<i>Publikationen</i>	<i>58</i>
<i>VI.</i>	<i>Danksagung</i>	<i>59</i>

I. Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Azid-Citrat-Dextrose-Antikoagulans
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	cluster of differentiation
CD41	Integrin α -IIb
CD62P	P-selectin
CFU	Koloniebildende Einheiten
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GP	Glycoprotein
hBD-1	humanes β 1-Defensin
HCL	Salzsäure
HIPA	heparin-induced platelet activation
HIPA-SL	HIPA-Suspensionslösung
HIPA-WL	HIPA-Waschlösung
IgG	Immunglobulin G
IPE	invasive Pneumokokken Erkrankungen
KCl	Kaliumchlorid
kDA	Kilodalton
MFI	mean fluorescence intensity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
NaCl	Natrumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
OD ₆₀₀	optical density at 600 nm
PBS	phosphate buffered saline
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cychrom5
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia Hydrogenii

Ply	Pneumolysin
PRP	platelet rich plasma
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
S.pneumoniae	Streptococcus pneumoniae
THY	Todd-Hewitt Broth mit 2% Hefe Extrakt
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAP-6	Thrombin Receptor Activating Peptide 6
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp

II. Tabellen der Mittel- und p-Werte

Tabelle 2 – Inkubation von Thrombozyten mit verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen sowie die Kontrolle der Reagibilität auf TRAP-6. Mittelwerte der MFI (CD62P) sowie p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für D39 und TIGR4 n=9, für D39 Δ ply, TIGR4 Δ ply, 6B und 19F n=5, Ctrl entspricht der Inkubation mit PBS.

MFI (CD62P)		120 Minuten			180 Minuten			240 Minuten			
		Mittelwert		p-Wert	Mittelwert		p-Wert	Mittelwert		p-Wert	
		Ø TRAP-6	+ TRAP-6		Ø TRAP-6	+ TRAP-6		Ø TRAP-6	+ TRAP-6		
D39	WT	Ctrl	4,121	155,5	<0,0001	2,999	100,8	<0,0001	2,999	127,9	0,0003
		PNK	27,44	104,8	0,0053	40,72	88,16	0,0069	58,69	86,33	n.s.
	Δ ply	Ctrl	3,016	131,1	0,0067	2,557	101,3	0,003	17,4	104,9	0,022
		PNK	12,83	90,78	0,0055	22,35	90,34	0,0135	49,02	80,08	0,0025
TIGR4	WT	Ctrl	3,205	134,7	<0,0001	2,208	97,09	<0,0001	2,259	119,7	0,0003
		PNK	59,77	74,13	0,015	73,73	80,24	0,0152	78,94	84,37	n.s.
	Δ ply	Ctrl	1,367	93,64	0,002	1,132	94,64	0,0024	16,07	90,06	0,0058
		PNK	4,402	70,36	0,0011	7,116	64,76	0,0002	12,67	71,86	0,0007
6B	Ctrl	6,774	185	<0,0001	6,834	174	0,0002	6,396	124,4	0,0002	
	PNK	61,88	112,8	0,0096	73,12	104,9	0,0306	80,74	104,4	0,0156	
19F	Ctrl	6,774	185	<0,0001	6,834	174	0,0002	6,396	124,4	0,0002	
	PNK	80,02	97,26	0,0026	82,6	90,04	n.s.	86,06	90,38	n.s.	

Tabelle 3 - Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen oder PBS. P-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests (* = ungepaarter T-Test). Für D39 und TIGR4 n=9, für D39 Δ ply, TIGR4 Δ ply, 6B und 19F n=5, Ctrl entspricht der Inkubation mit PBS.

P-Wert (alle Ø TRAP-6)		120 Minuten	180 Minuten	240 Minuten	
D39	WT	Ctrl	0,0008	0,0004	0,0004
		Δ ply	n.s.*	n.s.*	n.s.*
	Δ ply	Ctrl	0,0207	0,0306	n.s.
TIGR4	WT	Ctrl	0,0002	0,0002	<0,0001
		Δ ply	0,0011*	0,0010*	0,0008*
	Δ ply	Ctrl	0,0447	n.s.	n.s.
6B	Ctrl	0,0071	0,0049	0,002	
19F	Ctrl	0,0009	0,0001	<0,0001	

Tabelle 4 - Inkubation von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen und verschiedenen Antikörpern sowie der Reagibilität auf TRAP-6. Mittelwerte der MFI (CD62P) sowie p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für D39 ohne AK und TIGR4 ohne AK n=9, für alle anderen Versuche n=5.

	MFI (CD62P)	120 Minuten			180 Minuten			240 Minuten		
		Mittelwert		p-Wert	Mittelwert		p-Wert	Mittelwert		p-Wert
		Ø TRAP-6	+ TRAP-6		Ø TRAP-6	+ TRAP-6		Ø TRAP-6	+ TRAP-6	
D39	Ohne AK	27,44	104,8	0,0002	40,72	88,16	0,0069	58,7	86,3	n.s.
	i.v. IgG	11,11	82,12	0,0053	15,98	65,08	0,0077	29,3	71,6	0,0186
	mM AK	9,48	130,9	0,0014	10,05	141,6	0,0006	9,88	126	0,0002
	pRB AK	8,02	96,68	0,0094	15,04	93,28	0,0154	22,6	72,4	0,0394
TIGR4	Ohne AK	59,77	74,13	0,015	73,73	80,24	0,0152	78,9	84,4	n.s.
	i.v. IgG	13,7	65,18	0,0134	23,66	55,68	0,0018	40,3	69	0,0197
	mM AK	11,14	122,3	0,0017	18,48	107,9	0,018	30,9	118	0,0133
	pRB AK	16,18	56,6	n.s.	24,93	52,61	n.s.	44,8	55,4	n.s.
6B	Ohne AK	61,88	112,8	0,0096	73,12	104,9	0,0306	80,7	104	0,0156
	i.v. IgG	38,52	127,6	0,0064	49,88	120,3	0,0002	71,2	119	0,0037
	mM AK	17,21	133,2	0,0034	21,26	133,6	0,0049	27,4	135	0,0185
	pRB AK	19,5	80,4	n.s.	24	94,12	n.s.	40,9	77,1	n.s.
19F	Ohne AK	80,02	97,26	0,0026	82,6	90,04	n.s.	86,1	90,4	n.s.
	i.v. IgG	46,56	114,6	0,0011	55,42	100,6	0,0088	75,4	110	0,22
	mM AK	18,72	136,3	0,0032	20,57	102,2	0,0038	32,9	106	0,0047
	pRB AK	20,7	75,98	n.s.	27,56	48,8	n.s.	34,3	48,9	n.s.

Tabelle 5 - Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen und verschiedenen Antikörpern. p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für D39 ohne AK und TIGR4 ohne AK n=9, für alle anderen Versuche n=5.

	P-Wert (alle Ø TRAP-6)	120 Minuten	180 Minuten	240 Minuten
		Ohne AK	Ohne AK	Ohne AK
D39	i.v. IgG	n.s.	n.s.	n.s.
	mM AK	0,004	0,0028	0,0006
	pRB AK	<0,0001	0,0004	0,0014
TIGR4	i.v. IgG	0,0184	0,0312	0,0205
	mM AK	<0,0001	0,0003	0,0011
	pRB AK	<0,0001	0,0007	0,0458
6B	i.v. IgG	n.s.	0,0353	n.s.
	mM AK	0,0047	0,0045	0,007
	pRB AK	0,0088	0,0049	0,0027
19F	i.v. IgG	0,0033	0,0158	n.s.
	mM AK	0,0002	<0,0001	0,0005
	pRB AK	0,0004	0,0002	0,005

Tabelle 6 – Vergleich der Konzentration von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen Pneumokokken Stämmen ohne und mit i.v. IgG. Mittelwerte des Verhältnisses zur Kontrolle (PBS) sowie p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für alle Versuche n=4.

Verhältnis zur Kontrolle		120 Minuten		180 Minuten		240 Minuten	
		Mittelwert	p-Wert	Mittelwert	p-Wert	Mittelwert	p-Wert
D39	ohne AK	0,6803	n.s.	0,5176	n.s.	0,5254	n.s.
	i.v. IgG	0,8597		1,005		0,7573	
TIGR4	ohne AK	0,3646	0,0045	0,3784	n.s.	0,3301	n.s.
	i.v. IgG	0,8099		0,9533		0,6012	
6B	ohne AK	0,536	0,0267	0,4929	0,0059	0,5294	0,0016
	i.v. IgG	0,9235		0,8455		0,8559	
19F	ohne AK	0,3299	0,0082	0,3963	0,0176	0,4653	n.s.
	i.v. IgG	0,8734		0,8153		0,7383	

Tabelle 7 – Vergleich des CD62P Signals von Thrombozyten nach Inkubation mit verschiedenen S. pneumoniae Mutanten und i.v. IgG. Mittelwerte der MFI sowie P-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für Vorversuche n=4, für alle anderen Versuche n=5.

MFI			120 Minuten		180 Minuten		240 Minuten	
			Mittelwert	p (vs. Ø TRAP-6)	Mittelwert	p (vs. Ø TRAP-6)	Mittelwert	p (vs. Ø TRAP-6)
Vorversuch	ohne AK	Ø TRAP-6	7,395	-	7,335	-	6,878	-
		+ TRAP-6	105,8	0,0005	120,5	<0,0001	126,3	<0,0001
	i.v. IgG	Ø TRAP-6	7,573	-	11,1	-	29,53	-
		Vs. Ohne AK + TRAP-6	96,8	0,008	131	0,002	113,5	0,0107
IV.3 AK	Ø TRAP-6	6,643	-	6,588	-	6,645	-	
	+ TRAP-6	99,9	<0,0001	125,8	0,0006	135	0,0004	
D39Δply	ohne AK	Ø TRAP-6	12,83	-	22,35	-	49,02	-
		+ TRAP-6	90,78	0,0055	90,34	0,0135	80,08	0,0025
	i.v. IgG	Ø TRAP-6	13,22	-	23,78	-	26,01	-
		Vs. Ohne AK + TRAP-6	66,06	0,0137	62,96	0,0437	65,72	n.s.
TIGR4Δply	ohne AK	Ø TRAP-6	4,402	-	7,116	-	12,67	-
		+ TRAP-6	70,36	0,0011	64,76	0,0002	71,86	0,0007
	i.v. IgG	Ø TRAP-6	15,7	-	24,92	-	36,14	-
		Vs. Ohne AK + TRAP-6	55,86	0,0009	56,88	0,0001	60,92	0,0135

Tabelle 8 - Einfluss von Thrombozyten auf das Wachstum von verschiedenen *S. pneumoniae* Stämmen. Mittelwerte der CFU/ml sowie p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für D39, D39 Δ ply, TIGR4 und TIGR4 Δ ply n=8, für 6B und 19F n=6.

10 ⁶ CFU/ml		120 Minuten		180 Minuten		240 Minuten	
		Mittelwert	p (vs. Ctrl)	Mittelwert	p (vs. Ctrl)	Mittelwert	p (vs. Ctrl)
D39	Ctrl	26,36	-	24,99	-	21,38	-
	mit Plt	27,71	n.s.	26,44	n.s.	20,11	n.s.
D39 Δ ply	Ctrl	17,33	-	14,21	-	11,88	-
	mit Plt	15,93	n.s.	11,99	n.s.	9,15	n.s.
TIGR4	Ctrl	15,05	-	11,74	-	8,37	-
	mit Plt	9,73	0,0006	5,39	0,002	2,56	0,0044
TIGR4 Δ ply	Ctrl	15,41	-	12,97	-	10,64	-
	mit Plt	13,84	n.s.	9,59	0,009	6,31	0,0039
6B	Ctrl	19,57	-	16,98	-	14,98	-
	mit Plt	19,02	n.s.	18,87	n.s.	16,50	n.s.
19F	Ctrl	24,07	-	19,34	-	15,96	-
	mit Plt	27,60	n.s.	19,62	n.s.	14,38	n.s.

Tabelle 9 - Einfluss von i.v. IgG in Kombination mit Thrombozyten auf das Wachstum verschiedener *S. pneumoniae* Stämme. Mittelwerte der CFU/ml sowie p-Werte für die Durchführung von gepaarten T-Tests. Für alle Versuche n=4.

10 ⁶ CFU/ml		120 Minuten		180 Minuten		240 Minuten	
		Mittelwert	p (vs. mit Plt)	Mittelwert	p (vs. mit Plt)	Mittelwert	p (vs. mit Plt)
D39	Ctrl	29,28	n.s.	25,85	n.s.	21,38	n.s.
	mit Plt	27,63	-	25,63	-	19,30	-
	Mit Plt und i.v. IgG	29,18	n.s.	24,95	n.s.	18,45	n.s.
D39 Δ ply	Ctrl	20,33	n.s.	15,08	n.s.	11,53	n.s.
	mit Plt	16,90	-	12,51	-	9,80	-
	Mit Plt und i.v. IgG	19,35	n.s.	15,18	n.s.	12,78	n.s.
TIGR4	Ctrl	16,58	0,0042	12,63	n.s.	10,75	0,048
	mit Plt	12,50	-	6,74	-	3,00	-
	Mit Plt und i.v. IgG	13,76	n.s.	11,21	0,0499	5,84	n.s.
TIGR4 Δ ply	Ctrl	17,40	n.s.	12,73	0,0491	12,96	n.s.
	mit Plt	16,28	-	10,10	-	8,79	-
	Mit Plt und i.v. IgG	16,58	n.s.	11,83	n.s.	9,03	n.s.

Tabelle 10 – Einfluss von Releasate und verschiedenen Lysaten auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4Δply. Mittelwerte der CFU/ml sowie p-Werte für die Durchführung einer Mixed-Effects Analysis gefolgt von Tukey multiple Comparison Tests (*) oder einer one-way ANOVA gefolgt von Tukey multiple Comparison Tests (**). Für Ctrl I und Plt I n= 12, für Rel und Lys n=6, für alle anderen Versuche n=4.

10 ⁶ CFU/ml	TIGR4								
	120 Minuten			180 Minuten			240 Minuten		
	Mittelwert	p vs. Ctrl I*/ Π**	p vs. Plt I*/ Π**	Mittelwert	p vs. Ctrl I*/ Π**	p vs. Plt I*/ Π**	Mittelwert	p vs. Ctrl I*/ Π**	p vs. Plt I*/ Π**
Ctrl I	14,93	-	n.s.	11,72	-	0,0053	10,87	-	<0,0001
Plt I	13,38	n.s.	-	7,71	0,0053	-	3,89	<0,0001	-
Rel	14,34	n.s.	n.s.	12,33	n.s.	n.s.	10,53	n.s.	0,0122
Lys	14,48	n.s.	n.s.	8,45	n.s.	n.s.	3,99	0,0041	n.s.
Ctrl II	14,40	-	n.s.	9,33	-	n.s.	4,20	-	0,0015
Plt II	8,81	n.s.	-	4,23	n.s.	-	1,29	0,0015	-
LyDN	8,35	n.s.	n.s.	6,20	n.s.	n.s.	1,95	0,0053	n.s.
<10 kDa	10,61	n.s.	n.s.	7,09	n.s.	n.s.	3,71	n.s.	0,0132
>10 kDa	5,16	0,0358	n.s.	5,64	0,0426	n.s.	2,08	0,0296	n.s.
	TIGR4Δply								
Ctrl I	14,70	-	n.s.	13,46	-	n.s.	12,03	-	0,0169
Plt I	15,67	n.s.	-	11,85	n.s.	-	9,31	0,0169	-
Rel	15,78	n.s.	n.s.	12,91	n.s.	n.s.	12,97	n.s.	n.s.
Lys	14,45	n.s.	n.s.	13,75	n.s.	n.s.	9,63	n.s.	n.s.
Ctrl II	13,38	-	n.s.	11,30	-	n.s.	8,18	-	0,0316
Plt II	11,36	n.s.	-	8,41	n.s.	-	4,04	0,0316	-
LyDN	14,25	n.s.	n.s.	11,25	n.s.	n.s.	5,51	n.s.	0,0047
<10 kDa	12,56	n.s.	n.s.	11,54	n.s.	n.s.	8,29	n.s.	0,0287
>10 kDa	11,46	n.s.	n.s.	8,84	n.s.	n.s.	3,08	0,0458	n.s.

Tabelle 11 – Einfluss gefilterter und verdauter Lysate auf das Wachstum von TIGR4 und TIGR4Δply. Mittelwerte der CFU/ml nach Inkubation mit HIPA-SL (Ctrl), Proteinase K behandeltem Thrombozytenlysate (LyPK), einem Kontrollansatz ohne Proteinase (LyØPK) sowie filtriertem Lysat mit Molekülen < 10 kDa (Ly10), 10 - 30 kDa (Ly30), 30 - 100 kDa (Ly100) oder > 100 kDa (LyB). Für alle Versuche n=4.

10 ⁶ CFU/ml	Mittelwert			
	120 Minuten		240 Minuten	
	TIGR4	TIGR4Δply	TIGR4	TIGR4Δply
Ctrl	16,08	23,18	10,18	15,93
LyPK	25,33	31,08	16,57	26,70
LyØPK	18,92	24,18	9,00	14,26
Ly10	18,32	27,55	15,96	17,04
Ly30	16,35	24,14	13,58	15,24
Ly100	18,06	24,43	14,92	16,47
LyB	18,65	24,48	12,62	15,79

III. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

IV. Lebenslauf

V. Publikationen

Poster:

Aschenbrenner AF, Handtke S, Kohler TP, Hammerschmidt S, Greinacher A. *Interaction between Platelets and Streptococcus pneumoniae*, 64th Annual Meeting Society of Thrombosis and Haemostasis Research 2020

Aschenbrenner AF, Handtke S, Kohler TP, Hammerschmidt S, Greinacher A. *Interaction between Platelets and Streptococcus pneumoniae*, ISTH 2020 Congress

Artikel:

Jahn K, Handtke S, Palankar R, Weißmüller S, Nouailles G, Kohler TP, Wesche J, Rohde M, Heinz C, **Aschenbrenner AF**, Wolff M, Schüttrumpf J, Witzernath M, Hammerschmidt S, Greinacher A. *Pneumolysin induces platelet destruction, not platelet activation, which can be prevented by immunoglobulin preparations in vitro.*, Blood Adv. 2020

Aschenbrenner AF, Schramm S. *Medizinstudium im Wandel – Für wissenschafts- und kompetenzbasierte Ärzt:innen von morgen*, Forum Wissenschaft 1/2022

Buchbeiträge:

Schramm S, **Aschenbrenner AF**. *Bundesvertretung der Medizinstudierenden in Deutschland e.V. (bvmd)*. In: Heilkunst Reloaded, Herausgegeben von Jünger J, Bertram W, Brass K, Mutschler AF, Nagel E, 392 Seiten, MWV Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2023

VI. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle den Menschen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Dabei seien insbesondere erwähnt:

Herrn Prof. Dr. Greinacher für die freundliche Überlassung des Themas, regelmäßiges konstruktives Feedback und schnelle Antworten auf meine Fragen.

Das gesamten Forschungslabor der Transfusionsmedizin, insbesondere Jan und Stefan für die Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Das Team im Labor der AG Hammerschmidt, welche mich insbesondere bei der Arbeit rund um die Pneumokokken anleiteten und unterstützten.

Meine Familie, welche mich auf meinem gesamten Weg bis hierher begleitet und unterstützt hat.

Meiner liebevollen und liebenswerten WG, für lange Abende und spannende Diskussionen.

Und natürlich Tina, welche mich immer wieder unterstützt und mich durch die Höhen und Tiefen des Alltags begleitet.