

Sabrina Spelten

Interaktion der plasmid-codierten Serinprotease EspP aus  
Shiga Toxin-produzierenden *Escherichia coli* mit Proteinen  
der humanen Blutgerinnung und der Immunantwort

2010

Biologie

Dissertationsthema

**Interaktion der plasmid-codierten Serinprotease EspP aus Shiga Toxin-  
produzierenden *Escherichia coli* mit Proteinen der humanen Blutgerinnung und  
der Immunantwort**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von  
Sabrina Spelten  
aus Münster  
2010

Dekan: Prof. Dr. Klämbt

Erster Gutachter: PD Dr. Heidemann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Tudzynski

Tag der mündlichen Prüfung: 22.12.2010

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des internationalen Graduiertenkollegs 1409 „*Interactions of Pathogens with Biotic and Abiotic Surfaces*“ in der Abteilung für Innere Medizin B und in Kooperation mit dem Institut für Hygiene des Universitätsklinikums Münster unter der Betreuung von Herrn Dr. med. Jan Heidemann und der Mitbetreuung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch durchgeführt. Des Weiteren bestand eine Kooperation mit dem Max Planck Institut für Molekulare Biomedizin in Münster.

Die experimentellen Arbeiten wurden im Zeitraum von Januar 2007 bis März 2010 an den oben genannten Instituten durchgeführt.

Finanziell unterstützt wurde das Projekt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des internationalen Graduiertenkollegs 1409.

*„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“*

(Enrico Fermi, Physiker)

Meinen Eltern Manfred und Brigitte Werth

## Danksagung

Herrn Dr. Jan Heidemann danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Helge Karch danke ich für seine Hilfe und die Erlaubnis in seinem Labor gearbeitet haben zu dürfen.

Herrn Dr. Alexander Zarbock möchte ich besonders für die spannenden und lehrreichen Erfahrungen in seiner Arbeitsgruppe danken. Ohne Flusskammer-Experimente wäre die Qualität dieser Arbeit deutlich geringer ausgefallen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Ihm für die mir jederzeit gewährte fachliche Unterstützung und guten Ratschläge herzlichst bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Alexander Schmidt und Frau Dr. Waltraud Walz-Schmidt für die großartigen Bedingungen im Graduiertenkolleg, die damit verbundenen vielfältigen Möglichkeiten sich fachlich und persönlich weiterzubilden, sowie die große Hilfsbereitschaft und volle Unterstützung bei Problemen jeglicher Art.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Hygiene, des GMI-Labors und den weiteren Angehörigen des Graduiertenkollegs danke ich für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Andreas Bauwens möchte ich mich für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie und bei Frau Dr. Anne Müsken für die Einführung in diverse mikrobiologische und molekularbiologische Arbeitstechniken bedanken. Darüber hinaus danke ich beiden für die schöne gemeinsame Zeit außerhalb des Labors und besonders Dir, liebe Anne, für den Beistand in den weniger glücklichen Momenten während dieser Zeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Jens Brockmeyer für seine mir jederzeit gewährte fachliche und persönliche Unterstützung und die zahlreichen guten Ratschläge und Hinweise. Ohne Deine Hilfe, lieber Jens, wäre die vorliegende Arbeit nie entstanden!

Mein ganz persönlicher Dank geht an Dich, lieber Oliver, und an Euch, meine lieben Eltern. Ohne Eure Liebe, Euer Vertrauen und Eure Unterstützung wäre ich niemals dort angekommen wo ich jetzt bin. Ihr habt mir auch in schwierigen Momenten die Kraft gegeben niemals aufzugeben.



---

## Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Inhaltsverzeichnis .....   | 1  |
| 1. Zusammenfassung .....   | 1  |
| 2. Einleitung .....  | 3  |
| 2.1 <i>SHIGA TOXIN-PRODUZIERENDE ESCHERICHIA COLI</i> (STEC) ..... | 3  |
| 2.1.1 Übertragung und Infektion .....                              | 4  |
| 2.1.2 Pathogenese und Krankheitsverlauf .....                      | 5  |
| 2.2 NACHWEIS .....   | 7  |
| 2.3 VIRULENZFAKTOREN .....   | 8  |
| 2.3.1 Shiga-Toxine .....   | 8  |
| 2.3.2 Adhäsine .....   | 9  |
| 2.3.3 „Cytotolethal distending“ Toxin .....                        | 11 |
| 2.3.4 Subtilase Zytotoxin .....                                    | 11 |
| 2.3.5 EHEC Hämolyse .....  | 12 |
| 2.3.6 EspP .....   | 13 |
| 2.4 HÄMOSTASE .....  | 15 |
| 2.4.1 Von Willebrand-Faktor .....                                  | 17 |
| 2.4.2 Fibrinogen .....   | 19 |
| 2.4.3 Fibronectin .....  | 20 |
| 2.4.4 Thrombospondin-1 .....                                       | 21 |
| 2.4.5 Vitronectin .....  | 21 |
| 2.5 LEUKOZYTEN .....   | 22 |
| 2.5.1 Selektine .....  | 23 |
| 2.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....                                   | 25 |
| 3. Material und Methoden .....                                     | 26 |
| 3.1 MATERIAL .....   | 26 |
| 3.1.1 Chemikalien .....  | 26 |
| 3.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN .....                                | 27 |
| 3.2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....                           | 27 |
| 3.2.2 Medien und Nährböden für Bakterienkulturen .....             | 27 |
| 3.2.3 Haltung und Anzucht .....                                    | 28 |
| 3.3 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....                             | 29 |
| 3.3.1 Proteinfällungen .....                                       | 29 |

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.3.2 | Herstellung von Thrombozytenlysaten.....                                 | 29 |
| 3.3.3 | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....    | 30 |
| 3.3.4 | Western Blot .....   | 32 |
| 3.4   | HERSTELLUNG UND REINIGUNG VON ESPPA.....                                 | 35 |
| 3.4.1 | Anzucht der Bakterien.....   | 35 |
| 3.4.2 | Aufarbeitung des Bakterienüberstands .....                               | 35 |
| 3.4.3 | Aktivitätstest.....  | 36 |
| 3.5   | HÄMOSTASEOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....                      | 36 |
| 3.5.1 | Gewinnung von humanem Plasma .....                                       | 36 |
| 3.5.2 | Gewinnung von Thrombozyten .....   | 36 |
| 3.5.3 | Ristocetin-Kofaktor-Test .....   | 37 |
| 3.5.4 | vWF-Antigen-Test.....  | 37 |
| 3.5.5 | Kollagen-Bindeassay .....  | 38 |
| 3.6   | FLUSSKAMMER-EXPERIMENTE.....   | 38 |
| 3.6.1 | Aufbau der Flusskammern.....   | 38 |
| 3.6.2 | Beschichten der Kapillaren .....   | 38 |
| 3.6.3 | Blockieren der Kapillare .....   | 39 |
| 3.6.4 | Inkubation mit EspP $\alpha$ .....                                       | 39 |
| 3.6.5 | Perfusion der Flusskammern mit Vollblut.....                             | 39 |
| 3.6.6 | Visualisierung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion.....             | 40 |
| 3.7   | ZELLBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN.....                                      | 40 |
| 3.7.1 | Verwendete Zelllinie.....  | 41 |
| 3.7.2 | Kultivierung der Zellen .....  | 41 |
| 3.7.3 | Bestimmung der Zelldichte .....  | 41 |
| 3.7.4 | Kryokonservierung von Zelllinien .....                                   | 42 |
| 3.7.5 | Proliferationsassay.....   | 42 |
| 4.    | Ergebnisse .....   | 43 |
| 4.1   | FUNKTIONELLE ÜBERPRÜFUNG VON P-SELEKTIN IN DER FLUSSKAMMER .....         | 43 |
| 4.2   | UNTERSUCHUNG VON PROTEINEN DER HÄMOSTASE ALS SUBSTRATE FÜR ESPPA ...     | 50 |
| 4.2.1 | SDS-PAGE von gereinigtem vWF nach Inkubation mit EspP $\alpha$ .....     | 51 |
| 4.2.2 | Western Blot von humanem Plasma nach EspP $\alpha$ Inkubation.....       | 53 |
| 4.2.3 | Überprüfung der Funktion von vWF nach Inkubation mit EspP $\alpha$ ..... | 54 |
| 4.2.4 | vWF-Antigentest .....  | 54 |
| 4.2.5 | Ristocetin-Kofaktor-Test .....   | 55 |
| 4.2.6 | Kollagen-Bindungsassay .....   | 57 |

---

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 4.2.7 | Überprüfung der Funktion von vWF anhand eines Flusskammer-Modellsystems .....                    | 59 |
| 4.3   | INTERAKTION VON FIBRONEKTIN MIT ESPPA .....  | 61 |
| 4.3.1 | SDS-PAGE von gereinigtem Fibronectin nach EspP $\alpha$ -Inkubation .....                        | 62 |
| 4.3.2 | Western Blot von Thrombozytenüberständen nach EspP $\alpha$ -Inkubation .....                    | 63 |
| 4.3.3 | Western Blot von humanem Plasma nach EspP $\alpha$ -Inkubation .....                             | 64 |
| 4.3.4 | Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Fibronectin anhand von Flusskammer-Experimenten .....     | 65 |
| 4.3.5 | Interaktion von Fibrinogen und EspP $\alpha$ .....   | 67 |
| 4.3.6 | SDS-PAGE von gereinigtem Fibrinogen nach EspP $\alpha$ -Inkubation .....                         | 68 |
| 4.3.7 | Einsatz von Fibrinogen in der Flusskammer .....  | 70 |
| 4.4   | INTERAKTION VON THROMBOSPONDIN-1 UND ESPPA .....   | 72 |
| 4.4.1 | Western Blot von gereinigtem TSP-1 nach EspP $\alpha$ -Inkubation .....                          | 73 |
| 4.4.2 | Western Blot von Thrombozytenüberständen und humanem Plasma nach EspP $\alpha$ -Inkubation ..... | 74 |
| 4.4.3 | Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Thrombospondin-1 .....                                    | 74 |
| 4.5   | KEINE SPALTUNG VON VITRONEKTIN DURCH ESPPA .....   | 75 |
| 4.6   | BEURTEILUNG DER ZYTOTOXIZITÄT VON ESPPA .....  | 75 |
| 4.6.1 | Zellproliferationstest mit HBMEC in Anwesenheit von EspP $\alpha$ .....                          | 76 |
| 4.7   | ADDENDUM: HERSTELLUNG UND REINIGUNG VON ESPPA .....  | 77 |
| 4.7.1 | Proteingehaltbestimmung von EspP $\alpha$ .....  | 78 |
| 4.7.2 | Bestimmung der proteolytischen Aktivität von EspP $\alpha$ .....                                 | 79 |
| 5.    | Diskussion .....   | 81 |
| 5.1   | P-SELEKTIN .....   | 81 |
| 5.2   | VON WILLEBRAND-FAKTOR .....  | 83 |
| 5.3   | FIBRONEKTIN .....  | 86 |
| 5.4   | FIBRINOGEN .....   | 88 |
| 5.5   | THROMBOSPONDIN-1 .....   | 89 |
| 5.6   | VITRONEKTIN .....  | 90 |
| 5.7   | ZYTOTOXIZITÄT VON ESPPA .....  | 91 |
| 5.8   | SCHLUSSBEMERKUNGEN UND AUSBLICK .....  | 92 |
| 6.    | Verzeichnis der Abkürzungen .....  | 93 |
| 7.    | Literaturverzeichnis .....   | 96 |

---

## 1. Zusammenfassung

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) besiedeln häufig den Gastrointestinaltrakt von Nutztieren und werden meistens über kontaminierte Lebensmittel auf den Menschen übertragen. Eine Infektion mit diesem Zoonoserreger beim Menschen verursacht gastrointestinale Erkrankungen, die von wässrigen Durchfällen bis hin zur hämorrhagischen Kolitis reichen und in einigen Fällen zu schwerwiegenden Komplikationen wie dem hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) führen können. Shiga Toxine (Stx) werden als Hauptvirulenzfaktoren der STEC angesehen, obwohl in den letzten Jahren weitere Virulenzfaktoren identifiziert wurden. Dies deutet daraufhin, dass es sich bei der Pathogenese einer EHEC Infektion um einen multifaktoriellen Prozess handelt. Zu diesen Virulenzfaktoren gehört das Autotransporterprotein EspP (*Extracellular serine protease, Plasmid encoded*).

EspP existiert in vier unterschiedlichen Subtypen: EspP $\alpha$ , EspP $\beta$ , EspP $\gamma$  und EspP $\delta$ , von denen nur EspP $\alpha$  und EspP $\gamma$  proteolytisch aktiv sind. EspP $\alpha$  ist vor allem in den hochvirulenten Serotypen zu finden, so dass sich die vorliegende Arbeit mit diesem Subtypen befasst. Über die funktionellen Eigenschaften des EspP ist bislang bekannt, dass es den Gerinnungsfaktor V durch proteolytische Spaltung inaktiviert und darüber hinaus von Willebrand-Faktor (vWF) und P-Selektin spalten kann.

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Spaltung des vWF und des P-Selektins zu einem Funktionsverlust beider Proteine führt. Darüber hinaus sollten weitere, an der Blutgerinnung beteiligte Substrate für EspP $\alpha$  identifiziert und daraus resultierende mögliche Funktionsstörungen der betreffenden Proteine charakterisiert werden. Aufgrund der widersprüchlichen Datenlage bezüglich der Zytotoxizität von EspP $\alpha$  das Protein hinsichtlich dieser Eigenschaft erneut geprüft.

Mit Hilfe von Flusskammer-Experimenten konnte gezeigt werden, dass an Oberflächen adhäriertes P-Selektin nach Inkubation mit EspP $\alpha$  einen vollständigen Funktionsverlust aufweist, da nach Perfusion mit humanem Blut keine Leukozyten mehr an P-Selektin binden und auf dem Zelladhäsionsmolekül rollen können. Das durch P-Selektin vermittelte Abfangen und Rollen der Leukozyten ist die Voraussetzung für die Einwanderung der Leukozyten in entzündetes Gewebe. E-Selektin, welches trotz großer struktureller und funktioneller Ähnlichkeit mit P-Selektin nicht durch EspP $\alpha$  gespalten wird, bleibt hingegen voll funktionsfähig.

---

vWF, ein Schlüsselprotein der Hämostase wird in gereinigter Form durch EspP $\alpha$  gespalten. Zusätzlich erfolgt die Spaltung des Proteins nach Sezernierung aus den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten und in umgebendem Plasma. Die Adhäsion von Thrombozyten an vWF in der extrazellulären Matrix ist bei einer Gefäßverletzung essentiell und wurde aus diesem Grund mit Hilfe ähnlicher Flusskammer-Experimente untersucht. Immobilisierter vWF ist nach Inkubation mit EspP $\alpha$  nicht mehr in der Lage, Thrombozyten aus dem Blutstrom abzufangen um die Bildung von Thromben zu initiieren. Klinische Standardmethoden zur Diagnose vWF-abhängiger Gerinnungsstörungen wurden in abgewandelter Form für weitere Funktionsanalysen eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten eine stark verringerte Kollagenbindungsfähigkeit des vWF und im Falle des aufgereinigten vWF einen vollständigen Funktionsverlust. Bei der Thrombozytenadhäsion fungiert vWF als Vermittler zwischen der Bindung von Thrombozyten an Matrixkollagen. Eine weitere funktionelle Eigenschaft des vWF ist die Vermittlung der Thrombozytenaggregation, die durch Inkubation mit der bakteriellen Protease ebenfalls beeinträchtigt wurde. Als weitere Substrate für EspP $\alpha$  wurden Fibronectin (FN) und Fibrinogen (FG) identifiziert, welche neben weiteren Eigenschaften ebenfalls an der Thrombozytenadhäsion beteiligt sind. Auch diese Substrate konnten in gereinigter Form, in humanem Blutplasma und teils aus Thrombozytenüberständen durch EspP $\alpha$  gespalten werden. Auch hier belegten Flusskammer-Experimente den durch EspP $\alpha$  verursachten Verlust dieser Proteinfunktionen. Als weiteres Substrat wurde Thrombospondin-1 (TSP-1) identifiziert. Es konnte in gereinigter Form, in umgebendem Plasma und aus Trombozytenüberständen gespalten werden. Ebenso wurde Vitronectin als Substrat in Betracht gezogen, konnte aber nicht gespalten werden. Es wurde keine Zytotoxizität von EspP $\alpha$  nachgewiesen. Somit werden bereits publizierten Daten unterstützt, welche belegen, dass die Protease keine zytotoxische Wirkung besitzt.

In zukünftigen Studien sollte die Regulation und Expression von EspP $\alpha$  während des Infektionsprozesses untersucht werden. Darüber hinaus erscheint es angebracht, die Interaktionsfähigkeit von EspP $\alpha$  mit den humanen Zielproteinen in komplexeren Modellsystemen unter Berücksichtigung des Zusammenspiels unterschiedlicher Virulenzfaktoren von STEC zu untersuchen.

---

## 2. Einleitung

### 2.1 Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC)

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* sind in den letzten 2 Jahrzehnten als weltweite Verursacher hämorrhagischer Colitis (HC) und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS), einer häufigen Ursache für akutes Nierenversagen bei Kindern, in das öffentliche Interesse getreten (Bielaszewska *et al.*, 2005 ; Tarr, 2009).

Im Jahr 1982 wurden Ausbrüche schwerer blutiger Durchfallerkrankungen in den USA beschrieben und mit dem bis dato selten nachgewiesenen Serotyp O157:H7 assoziiert (Riley *et al.*, 1983, Wells *et al.*, 1983). Karmali und Mitarbeiter berichteten ebenfalls 1983 von vereinzelt HUS-Fällen bei Patienten, aus deren Stuhlproben zytotoxinproduzierende *Escherichia coli*-Stämme isoliert wurden (Karmali *et al.*, 1983 a und b). Sie konnten zeigen, dass das isolierte Toxin ein hohes zytotoxisches Potential gegenüber Vero-Zellen (einer etablierten Zelllinie aus Nierenzellen von Grünen Meerkatzen) aufwies. Dieser Effekt wurde bereits zuvor von Konowalchuk *et al.* (1977) nach Experimenten mit Kulturfiltraten verschiedener *E. coli* Stämme beschrieben. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Struktur und Funktion des Toxins dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ1 ähnelte (O'Brien *et al.*, 1983), so dass von diesem Zeitpunkt an die Bezeichnung Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* (STEC) verwendet wurde. Wenig später gelang der Nachweis einer Beteiligung des Toxins an der Entstehung von HC und HUS (Karmali *et al.*, 1985) und führte zur Abgrenzung dieser hoch pathogenen Stämme von den weniger pathogenen STEC. Als enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) werden alle humanpathogenen Stämme bezeichnet, die eine HC oder ein HUS verursachen, Shiga-Toxin exprimieren, eine „Attaching and Effacing“ (A/E)-Läsion an Epithelzellen induzieren und das 60 MDa große Virulenzplasmid tragen. EHEC sind somit eine Untergruppe der STEC (Nataro und Kaper, 1998; Paton und Paton, 1998).

Shiga Toxin-produzierende *Escherichia coli* werden mittels Serotypisierung in verschiedenen Gruppen zusammengefasst. Der Serotyp eines *E.coli*-Isolates wird durch seine O („Ohne Hauch“) bzw. H („Hauch“) Antigene definiert. Historisch wurden so Bakterien unterschieden, die aufgrund peritricher Begeißelung zur Fortbewegung fähig sind oder unbegeißelt und somit unbeweglich sind. Das Erscheinungsbild einer schwärmenden Kolonie ähnelt einem Hauch, den der menschliche Atem in Form von Wassertröpfchen beim Anhauchen einer Glasplatte hinterlässt (White, 1926;

---

Kauffmann, 1978). Die Bezeichnungen wurden bis heute zur Serotypisierung beibehalten. Das O-Antigen wird durch Variationen im Polysaccharid-Anteil des Lipopolysaccharids (LPS), einem Bestandteil der bakteriellen Zellwand, bestimmt. Beim H-Antigen handelt es sich um Proteine der Flagellen (Gyles, 2007).

Es existieren 174 O-Antigene (diskontinuierlich von 1-181 nummeriert) und 56 H-Antigene innerhalb des internationalen Serotypisierungsschemas, welche in vielen verschiedenen Kombinationen unter *Escherichia coli* verbreitet sind (Scheutz, 2004). Es konnten aus fast 500 Serotypen weltweit EHEC-Stämme isoliert werden (Bettelheim, 2007), der wichtigste Vertreter weltweit ist jedoch der sorbitol-fermentierende Serotyp O157:H7, wenn auch von regionalen Unterschieden berichtet wird. So gilt z.B. der zuerst in Deutschland beschriebene nicht sorbitol-fermentierende O157:NM (*Non Motile*) als zweithäufigste Ursache für sporadische HUS-Erkrankungen (Karch *et al.*, 1990; Karch *et al.* 1993, Friedrich *et al.*, 2002; Karch *et al.*, 2005). Neben O157:H7 gibt es etwa 10 Serogruppen, die häufiger als andere mit schweren klinischen Verläufen in Verbindung gebracht werden (Gyles, 2007). Besonders hervorzuheben sind dabei O26, O103, O111 und O145 (Karmali *et al.*, 2003). Der Schweregrad des Krankheitsverlaufs ist offenbar mit einem bestimmten Serotyp assoziiert, so dass eine Klassifizierung in 5 Seropathotypen vorgenommen wurde (Karmali *et al.*, 2003). Zu Gruppe A gehören die hochvirulenten Serotypen O157:H7 und O157:NM. Zu Gruppe B gehören Serotypen, die ähnlich schwere Krankheitsbilder wie O157:H7 verursachen, aber insgesamt seltener auftreten, ihre Vertreter sind O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19 und O145:NM. Gruppe C bis E repräsentieren Serotypen, die weniger häufig und an milderen klinischen Verläufen beteiligt sind (Karmali *et al.*, 2003).

### **2.1.1 Übertragung und Infektion**

Der Darm von Rindern gilt als Hauptreservoir von STEC (Hancock *et al.*, 1994), obwohl auch in einer Vielzahl anderer Tierarten STEC-Stämme nachgewiesen werden konnten, so z.B. in Schafen, Ziegen und Schweinen (Beutin *et al.*, 1993 ; Caprioli *et al.*, 1993; Karmali *et al.*, 1989). Die Kolonisierung von Rindern und anderen Haustieren durch STEC ist meist transient für weniger als 4 Wochen und verursacht keine Symptome (Karch *et al.*, 1999).

Der Hauptinfektionsweg für den Menschen ist die Aufnahme von fäkal-kontaminierten Nahrungsmitteln wie z.B. unzureichend gegartem Rinderhackfleisch (Hamburger), welches in den 90er Jahren in den USA einen großen Ausbruch mit mehr als 700

---

Erkrankungsfällen verursacht hat (Bell *et al.*, 1994). Aber auch andere Nahrungsmittel gelten als mögliche Infektionsquelle für STEC, so z.B. unpasteurisierte Milch, Rohmilch und Rohmilchprodukte, Salami sowie Obst- und Gemüseprodukte (Rangel *et al.*, 2005). Ausbrüche von O157:H7-Infektionen wurden aber auch durch kontaminiertes Trink- und Badewasser, fäkal-orale Übertragung von Mensch zu Mensch und Kontakt zu Tieren (z.B. Streichelzoos) verursacht (Rangel *et al.*, 2005). Eine besondere Risikogruppe für STEC-Infektionen sind Kinder, aber auch ältere Menschen haben ein erhöhtes Infektionsrisiko (Karmali, 1989; Nataro und Kaper, 1998).

Ein besonderes Merkmal von STEC ist ihre hohe Säureresistenz und ihre damit verbundene sehr geringe Infektionsdosis von weniger als hundert bis hin zu einigen hundert Bakterien (Griffin *et al.*, 1995).

Nach §§ 6 und 7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) ist das enteropathische HUS und der Nachweis von EHEC meldepflichtig. Demgemäß wurden in Deutschland für die Jahre 2007 und 2008 839 bzw. 835 Fälle von EHEC-Infektionen gemeldet (Robert Koch-Institut, 2009).

### **2.1.2 Pathogenese und Krankheitsverlauf**

Nach einer Inkubationszeit von 1 bis 3 Tagen treten zunächst wässrige Durchfälle auf, die im weiteren Krankheitsverlauf bei 90% der Patienten in wässrig-blutige Durchfälle übergehen können (Tarr *et al.*, 2005; Ostroff *et al.*, 1989). 10% bis 15% der Patienten entwickeln ein hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS), welches durch eine mikroangiopathische hämolytische Anämie eine Thrombozytopenie und ein akutes Nierenversagen gekennzeichnet ist (Gerber *et al.*, 2002).

Obwohl die genauen, den Symptomen zugrunde liegenden Mechanismen nicht vollständig geklärt sind, wird eine thrombotische Mikroangiopathie, die aus einer mikrovaskulären Endothelschädigung hervorgeht, als Primärereignis beim Übergang von einer gastrointestinalen Infektion hin zum Nierenversagen angesehen (Karmali, 2004; Tarr *et al.*, 2005; Andreoli *et al.*, 2002). Bereits in einem sehr frühen Stadium des Krankheitsverlaufs werden bei Patienten prothrombotische Gerinnungsstörungen beobachtet, die aus der Aktivierung oder der Verletzung endothelialer Zellen hervorgehen können (Chandler *et al.*, 2002). Da bei EHEC-Infektionen keine Bakteriämie auftritt, wird angenommen, dass die beobachteten vaskulären Schädigungen an den Glomeruli, am Gastrointestinaltrakt und an anderen Organen, wie z.B. Gehirn und Pankreas, wahrscheinlich durch Shiga-Toxin (Stx) verursacht werden

(Richardson *et al.*, 1988; Inward, 1997; Karmali, 1989 und 2004; Raife *et al.*, 2004; Bielaszewska *et al.*, 1997).

Neben der Schädigung von Endothelzellen aktiviert Shiga-Toxin Leukozyten und Thrombozyten (Te Loo *et al.*, 2000 und 2001; Karpman *et al.* 2001). Das Ausmaß der prothrombotischen Aktivierung korreliert mit dem Risiko, ein HUS zu entwickeln und es wird angenommen, dass die Entstehung eines HUS mit dem Grad der prothrombotischen Aktivierung im frühen Infektionsstadium zusammenhängt (Chandler *et al.*, 2002). Das aktivierte Gerinnungssystem verursacht eine Thrombusbildung im mikrovaskulären Endothel der Glomeruli und schädigt zusätzlich Tubuluszellen, so dass die glomeruläre Filtrationsrate verringert wird (Habib und Jackson, 1992). Der hohe Verbrauch an Thrombozyten führt zu einer Verringerung der Plättchenzahl (Thrombozytopenie). Die hämolytische Anämie ist ein Resultat der mechanischen Zerstörung von Erythrozyten durch Fibrinfäden (Zoja *et al.*, 1992; Karpman *et al.*, 2001). Der Schweregrad eines HUS umfasst sowohl milde klinische Verläufe, als auch fulminante Verlaufsformen, bei dem neben dem Gastrointestinaltrakt auch Pankreas, Lunge, Herz und das zentrale Nervensystem betroffen sein können (Upadhyaya *et al.*, 1980). Die Mortalität im akuten Stadium kann bis 5% betragen. Auftretende Folgeschäden umfassen z.B. eine eingeschränkte Nierenfunktion, Bluthochdruck, neurologische Schäden oder Pankreasschäden (Scheiring *et al.*, 2008).

Bei der Behandlung einer Infektion mit STEC sollte auf die Gabe von Antibiotika verzichtet werden, da diese das Risiko, ein HUS zu entwickeln, erhöhen kann (Wong *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass die Lyse der Bakterien oder verstärkte Induktion des phagen-codierten *stx*-Gens als Reaktion auf die Antibiotikabehandlung zu vermehrter Freisetzung von Shiga-Toxin führt und somit der klinische Verlauf verschlechtert werden kann (Grif *et al.*, 1998; Kimmitt *et al.*, 2000).

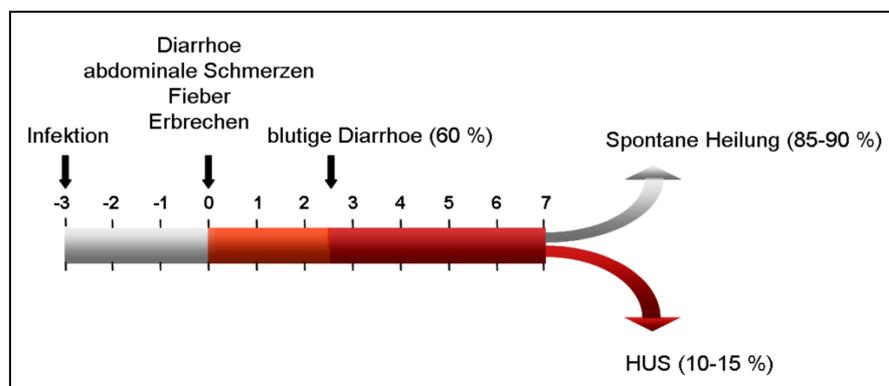


Abb. 2.1: Krankheitsverlauf einer Infektion mit O157:H7 in Kindern. Modifiziert nach Tarr *et al.*, (2005)

---

## 2.2 Nachweis

Die Diagnose einer STEC-Infektion bzw. der Nachweis von STEC in Lebensmitteln stellt aus verschiedenen Gründen hohe Anforderungen an die verwendeten Nachweismethoden. Nur in einem sehr frühen Infektionsstadium befindet sich eine ausreichende Anzahl von STEC in Stuhlproben von Patienten. Nach dem Auftreten der ersten klinischen Symptome ist die Ausscheidung von STEC schon stark vermindert (Paton und Paton, 1998). Zusätzlich erschwert die Anwesenheit kommensaler *E.coli* den spezifischen Nachweis von STEC (Paton und Paton, 1998). Auch die Detektion in Lebensmitteln ist aufgrund der vorhandenen geringen Keimzahl problematisch (Nataro und Kaper 1998).

Serotyp O157:H7 ist im Gegensatz zu den meisten anderen *E.coli* nicht in der Lage, Sorbitol innerhalb von 24 Stunden zu fermentieren. Diese Eigenschaft wird zum Nachweis genutzt, da dieser Serotyp durch das Wachstum farbloser Kolonien auf Sorbitol MacConkey agar phänotypisch identifiziert werden kann (March und Ratnam, 1986).

Die sorbitolfermentierenden Serotypen können mit dieser Methode folglich nicht von kommensalen *E.coli* unterschieden werden, so dass die Detektion des O157-Antigens mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) oder PCR (Polymerase Chain Reaction) eine weitere Screeningmethode für Stuhlproben von Patienten darstellt (Park *et al.*, 1996; Fratamico *et al.*, 1995).

Auch mit dieser Methode werden nicht alle Serotypen erfasst, da nicht alle das O157-Antigen tragen, so dass sich zahlreiche unterschiedliche Nachweismethoden des Shiga-Toxins etabliert haben. Zu diesen Methoden zählen Zytotoxizitätstests mit Vero-Zellen, ELISA-Verfahren mit anti-Stx-Antikörpern (Bitzan und Karch, 2003), sowie Nachweismethoden auf genetischer Ebene mittels PCR oder Immuno-PCR (Zhang *et al.*, 2008). Selbst diese Nachweismethoden erlauben keine 100%ige Absicherung der Diagnose, da in den letzten Jahren gezeigt wurde, dass STEC eine hohe genetische Variabilität, insbesondere während des Infektionsprozesses aufgrund des hohen Selektionsdrucks, aufweisen (Mellmann *et al.*, 2009). So können STEC während des Krankheitsprozesses in 30% der Fälle Stx verlieren (Herold *et al.*, 2004; Mellmann *et al.*, 2005; Bielaszewska, 2007). Aus diesem Grund wird der Nachweis von Stx-Antikörpern oder spezifischen Antikörpern gegen das O-Antigen in Patientenserum empfohlen (Paton und Paton, 1989; Nataro und Kaper, 1989).

---

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der bestehenden Nachweismethoden in Bezug auf Sensitivität, Selektivität, Kosten und Geschwindigkeit ist stets eine Kombination von Testverfahren erforderlich, die an die klinischen Bedingungen und verfügbaren Ressourcen angepasst werden müssen (Paton und Paton, 1998).

## 2.3 Virulenzfaktoren

Obwohl Shiga-Toxine als die hauptsächlichen Virulenzfaktoren von STEC angesehen werden, sind nicht alle Shiga-Toxin-tragenden Stämme hochvirulent. Außerdem wurde die Entwicklung eines HUS bei Patienten nach Infektion mit STEC, die ihre Fähigkeit Stx zu produzieren verloren haben, beobachtet (Schmidt *et al.*, 1999a). Neben den Shiga-Toxinen exprimieren EHEC zusätzliche Pathogenitätsfaktoren (Law 2000; Gyles 2007), die dementsprechend an der Pathogenese beteiligt sein können. In diesem Abschnitt soll daher ein Überblick über STEC-Virulenzfaktoren, mit besonderem Fokus auf EspP, gegeben werden.

### 2.3.1 Shiga-Toxine

Die Familie der Shiga-Toxine besteht im Wesentlichen aus zwei Hauptgruppen, dem Stx1 und dem Stx2, die beide auf temperenten lambdoiden Phagen kodiert sind. Während Stx1 98% Sequenzhomologie zu Stx von *Shigella dysenteriae* aufweist, liegt die Sequenzhomologie von Stx2 nur bei 60% (Nataro und Kaper, 1998).

Neben diesen Hauptgruppen gibt es folgende Subtypen: Stx1c (Zhang *et al.*, 2002), Stx1d (Kuczius *et al.*, 2004), Stx2c (Schmidt *et al.* 1999b), Stx2d (Pierard *et al.*, 1998), Stx2d<sub>aktivierbar</sub> (Melton- Celsa *et al.*, 2002; Bielaszewska *et al.*, 2006), Stx2e (Sonntag *et al.*, 2005), Stx2f (Schmidt *et al.*, 2000; Sonntag *et al.*, 2005) und Stx2g (Leung *et al.*, 2003).

Obwohl die Wirkmechanismen beider Stx-Gruppen gleich sind, findet man bei schweren Krankheitsverläufen häufiger Stämme mit Stx2 (Kleanthous *et al.*, 1990; Friedrich *et al.*, 2002). Es konnte sogar gezeigt werden, dass Stx2 eine 1000fach stärkere Zytotoxizität gegenüber Nierenendothelzellen aufweist als Stx1 (Louise und Obrig, 1995).

Shiga-Toxine gehören zur Gruppe der A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>-Toxine. Sie besitzen eine enzymatisch aktive A-Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 32 kDa und 5 B-Untereinheiten mit einer ungefähren Größe von jeweils 7,7 kDa. Die B-Untereinheit vermittelt die Bindung an den Rezeptor Globotriaosylceramid (Gb3) (Lingwood, 2003), der besonders von mikrovaskulären Endothelzellen der Niere (Boyd und Lingwood,

---

1989), des Darms (Jacewicz *et al.*, 1999) und des Gehirns (Ren *et al.*, 1999) exprimiert wird. Die A-Untereinheit besitzt eine N-Glykosidase-Aktivität und hydrolysiert einen spezifischen Adeninrest der 28S rRNA, welche zur 60S ribosomalen Untereinheit gehört (Endo *et al.*, 1988; Saxena *et al.*, 1989). Infolgedessen wird die Proteinsynthese gehemmt und es kommt zum Zelltod durch Apoptose (Endo *et al.*, 1988).

Bis heute ist noch nicht vollständig verstanden, auf welchem Weg Shiga-Toxine aus dem Darm zu ihren hauptsächlichen Zielzellen, den mikrovaskulären Nierenendothelzellen transportiert werden. Es wird angenommen, dass Shiga-Toxine durch parazellulär (Hurley *et al.*, 2001) in den Blutkreislauf gelangen und dort an polymorphkernige Leukozyten, Monozyten und Plättchen binden können, welche als Transportmittel zum Nierenendothel dienen (van Setten *et al.*, 1996; Karpman *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass durch die Interaktion von LPS (Lipopolysaccharid) und Stx mit Monozyten die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) angeregt wird. Dies führt zu einer erhöhten Gb3-Expression auf Endothelzellen (van der Kar *et al.*, 1992). Van Setten *et al.* (1996) führen die erhöhte Freisetzung von Zytokinen, die bei HUS-Patienten beobachtet werden kann, direkt auf diese Interaktion zurück. Die Arbeitsgruppe um Romer (2007) konnte zeigen, dass die Aufnahme von Stx in die Zielzellen durch Clathrin-unabhängige Endozytose erfolgt. Dabei werden Mikrodomänen aus Gb3 und der B-Untereinheit des Stx gebildet, die zur Einstülpung der Zellmembran führen. Nach der Aufnahme des Toxins erfolgt sein retrograder Transport über Endosomen und den Golgi-Apparat hin zum endoplasmatischen Reticulum, seinem Wirkort (Sandvig *et al.*, 1992).

Die besondere Empfindlichkeit der Glomeruli gegenüber Stx konnte bislang noch nicht vollständig geklärt werden. Es wird jedoch angenommen, dass Unterschiede in der Rezeptorpräsentation auf der endothelialen Oberfläche und Unterschiede im intrazellulären Verbleib des Toxins zu einer variierenden Empfindlichkeit beitragen können (Falguieres *et al.*, 2001).

### **2.3.2 Adhäsine**

Adhäsine sorgen nach der Magenpassage für die Adhäsion an die Darmschleimhaut, so dass der Transport der Bakterien aus dem Darm reduziert und die Verweildauer erhöht wird (Law, 2000).

Die Adhärenz über das in die äußere Membran der LEE-positiven *E. coli* eingelagerte Intimin führt zu einer podestartigen Ausstülpung des Aktinzytoskeletts der

---

Darmepithelzellen, so dass die Bakterien daran haften können. Die daraus resultierenden A/E (Attaching/Effacing)-Läsionen sind ein charakteristisches Kennzeichen einer EHEC-Infektion (Tzipori *et al.*, 1995).

Die Proteine, die für die Ausbildung dieser Anheftungsstellen verantwortlich sind, werden durch eine Pathogenitätsinsel (PAI) kodiert, welche als „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) bezeichnet wird. Sie besitzt eine Größe von 43 kb und besteht aus drei funktional unterschiedlichen Regionen (Kaper *et al.*, 1998). Die zentrale Region dieses chromosomalen Bereichs enthält das *eae*-Gen (*e.coli attaching and effacing*) und kodiert den Adhärenzfaktor Intimin. Außerdem kodiert sie den zugehörigen Intimin-Rezeptor *tir*, der vom Bakterium sezerniert wird und in der Zellmembran der Enterozyten verankert wird. Stromabwärts liegt ein Typ III Sekretionssystem, welches für die Sekretion von *tir* und den *esp*-Proteinen, deren kodierendes *esp*-Gen (*e.coli secreted proteins*) ebenfalls in dieser Region liegt, verantwortlich ist (Perna *et al.*, 1998). Die *esp*-Proteine greifen in die epitheliale Signaltransduktion ein, wodurch sie an der Ausbildung der A/E-Läsionen beteiligt sind (Karch, 2001).

Das Genom von EHEC O157:H7 trägt insgesamt 16 Gencluster, die für verschiedene Fimbrienadhäsine kodieren, von denen allerdings nur wenige exprimiert werden (Low *et al.*, 2006). Hierzu gehören *lpf* (*long polar fimbriae*) (Doughty *et al.*, 2002), *sfa* (*s fimbriae major subunit*) (Spears *et al.*, 2006) und *sfp* (*sorbitol-fermenting ehec O157 fimbriae plasmid-encoded*) (Brunner *et al.*, 2001). Der Beitrag der *Lpf* (*Long polar fimbriae*) an der Adhäsion wird kontrovers diskutiert und es wird in Frage gestellt, ob *Lpf* überhaupt einen Beitrag zur Virulenz leisten (Tatsuno *et al.*, 2006; Gyles, 2007).

Die *sfp*-Fimbrien sind sowohl auf dem Plasmid der SF O157:H7 kodiert als auch im Genom einiger O165:H25/NM Stämme (Bielaszewska *et al.*, 2009). Müsken und Mitarbeiter (2008) zeigten dass die *Sfp*-Fimbrien zur Adhäsion unter mikroaerophilen Bedingungen beitragen können.

Weitere Adhäsionsfaktoren, die in der Literatur beschrieben wurden, sind *Efal* (*EHEC factor for adherence*) (Nicholls *et al.*, 2000; Janka *et al.*, 2002), *Iha* (*IrgA homologue adhesin*) (Tarr *et al.*, 2000), *OmpA* (*outer membrane protein A*) (Torres und Kaper, 2003), *Saa* (*STEC autoagglutinin adhesin*) (Paton *et al.*, 2001) und das Plasmid-kodierte *ToxB* (Tatsuno *et al.*, 2001).

Die Vielzahl an Adhäsionsfaktoren verdeutlicht, dass auch dieser Schritt der Pathogenese ein multifaktorielles Ereignis ist.

---

### 2.3.3 „Cytotolethal distending“ Toxin

„Cytotolethal distending“ Toxine (CDT) bilden eine Familie von Toxinen mit verschiedenen Subtypen und werden durch unterschiedliche Pathogene wie z.B. *Campylobacter* ssp. (Johnson und Lior, 1988) *Shigella* ssp. (Okuda *et al.*, 1995), *Helicobacter* ssp. (Chien *et al.*, 2000) und *Escherichia coli* (Janka *et al.*, 2003; Toth *et al.*, 2003) gebildet.

Bislang wurden 5 verschiedene Subtypen des Toxins, CDT-I bis CDT-V, in *E.coli* identifiziert, von denen insbesondere CDT-V häufig in SF O157:NM, O157:H7 und einigen eae-negativen nicht-O157 Stämmen vorkommt (Janka *et al.*, 2003; Friedrich *et al.*, 2006; Bielaszewska *et al.*, 2004).

Das CDT-Holotoxin ist aus den drei Untereinheiten Cdt-A, Cdt-B und Cdt-C aufgebaut. Cdt-B verfügt über eine DNase Aktivität, Cdt-A und Cdt-C spielen vermutlich bei der Rezeptorbindung und der Internalisierung des Toxins eine Rolle (Lara-Tejero und Galan, 2001). Nach der Aufnahme des Toxins in die Zelle führt die DNase Aktivität der B-Untereinheit zu einem Zellzyklusarrest in der G2/M Phase, der zur Apoptose führt (Bielaszewska *et al.*, 2005).

CDT-V wird als ein weiterer potentieller Virulenzfaktor von EHEC diskutiert (Karch *et al.*, 2006).

### 2.3.4 Subtilase Zytotoxin

Das Subtilase Zytotoxin ist eine Subtilase-ähnliche Serinprotease und gehört wie Shiga-Toxin zur Familie der A<sub>1</sub>B<sub>5</sub>-Toxine. Erstmals wurde das Toxin in eae-negativen O111:H21 Stämmen nachgewiesen, es ist aber auch in vielen weiteren Stämmen vorhanden (Paton *et al.*, 2004). Das Toxin wird über einen Clathrin-abhängigen Endozytoseweg aufgenommen (Chong *et al.*, 2008) und inaktiviert das Chaperon BiP im endoplasmatischen Reticulum (Paton *et al.*, 2004).

Eine hohe Zytotoxizität wurde für das Protein durch Paton und Mitarbeiter (2006) nachgewiesen. In Mäusen verursacht das Zytotoxin Thrombosen des mikrovaskulären Endothels und Nekrosen in der Niere, dem Gehirn und der Leber (Paton *et al.*, 2004), welche den Läsionen in HUS-Patienten ähneln (Upadhyaya *et al.*, 1980).

Trotz seiner hohen Zytotoxizität in Zellkulturtests und im Tiermodell ist eine Beteiligung des Toxins am humanen Infektionsprozess fraglich, da es nur in geringem Maße mit den hochvirulenten Serotypen assoziiert ist.

---

### 2.3.5 EHEC Hämolysin

Das Hämolysin der enterohämorrhagischen *E.coli* (EHEC-Hly) ist ein RTX-Toxin (*Repeat-in-Toxin*) und gehört zur Gruppe der Poren-bildenden Zytolysine.

EHEC-Hly-produzierende Stämme bilden nach einer etwa 16-stündigen Inkubationszeit auf Blutplatten mit gewaschenen Erythrozyten schmale, trübe Lysehöfe, welche die Bakterienkolonien umgeben (Schmidt *et al.*, 1994). Dies wird als „enterohämolytischer Phänotyp“ bezeichnet (Schmidt *et al.*, 1994) und wurde zuerst von Beutin und Mitarbeitern (1988) beschrieben. Die Bezeichnung Enterohämolysin (Ehly) wird allerdings für ein Phagen-kodiertes Hämolysin verwendet, das nur selten in EHEC-Stämmen zu finden ist (Beutin *et al.*, 1993).

Das EHEC-hly Operon, bestehend aus den 4 Genen EHEC-*hlyC*, *-hlyA*, *-hlyB*, *-hlyD*, ist auf dem 90 kb großen Virulenzplasmid von *E.coli* O157:H7 kodiert (Schmidt *et al.*, 1996). Das Gen *hlyA* kodiert für das Hauptprodukt Haemolysin (RtxA). Haemolysin wird durch posttranslationale Modifikation mittels der Acyltransferase RtxC, kodiert durch *hlyC*, aktiviert und anschließend durch den *sec*-unabhängigen Transportweg unter Beteiligung der Transmembranproteine RtxB und RtxD, kodiert durch *hlyB* und *hlyD*, exportiert (Welch und Pellet, 1988). Die Aktivität des EHEC-Hly ist, wie bei anderen Mitgliedern der RTX-Toxin-Familie, strikt calciumabhängig und hitzelabil (Bauer und Welch, 1996).

Von Aldick und Mitarbeitern (2007) wurde in Stx-negativen Stämmen aus Stuhlproben von HUS-Patienten EHEC-Hly nachgewiesen. Alle untersuchten Stämme wiesen den „enterohämolytischen Phänotyp“ auf. Es zeigte sich eine zeit- und dosisabhängige zytotoxische Wirkung auf mikrovaskuläre Endothelzellen, die bei einer Mutante mit spontanem Verlust des EHEC-hly Operons deutlich reduziert war.

Dennoch ist die Relevanz des Toxins für den Krankheitsprozess, aufgrund seines schnellen und irreversiblen Aktivitätsverlusts (Bauer und Welch, 1997) umstritten. Untersuchungen zur Interaktion von EHEC-Hämolysin und Membranvesikeln zeigten, dass EHEC-Hly schnell an die Oberfläche von Membranvesikeln bindet und dass Vesikel-assoziiertes Hämolysin eine ca. 80-fach höhere Stabilität und Aktivität im Vergleich zu freiem Hämolysin aufweist (Aldick *et al.*, 2009).

Die Assoziation mit Vesikeln stellt daher möglicherweise einen Mechanismus zur Stabilisierung von EHEC-Hämolysin dar, so dass unter physiologischen Bedingungen im Wesentlichen die Vesikel-assoziierte Form von EHEC-Hämolysin funktionell relevant sein dürfte.

---

### 2.3.6 EspP

EspP steht für „*extracellular serine protease, plasmid encoded*“ und ist ein weiterer Virulenzfaktor, der auf dem 90 kb großen Virulenzplasmid pO157 kodiert ist.

Der ORF (*Open Reading Frame*) besteht aus 3900 Basenpaaren (bp) und ist homolog zur Proteinfamilie der Autotransporter (Brunner *et al.*, 1997; Pohlner *et al.*, 1987).

Autotransporter sind Proteine, die alle notwendigen Bestandteile zum Transport durch die bakterielle innere und äußere Membran innerhalb eines Moleküls tragen (Pohlner *et al.*, 1987; Henderson 2004). Dieser Sekretionsweg wird dementsprechend als Autotransporter-Sekretionsweg, oder als Typ V Sekretionssystem bezeichnet. Das *espP*-Gen kodiert für ein 142 kDa großes Holoprotein, welches eine für Autotransporter typische Struktur aufweist. N-terminal befindet sich ein Signalpeptid, welches den Transport über die innere Membran durch den *sec*-Sekretionsweg vermittelt. Die C-terminale  $\beta$ -Domäne, auch „ *$\beta$ -barrel*“ (*barrel* = Fass) genannt, bildet einen Kanal, der vermutlich den Transport der „Passenger-Domäne“ durch die äußere Membran in den extrazellulären Raum ermöglicht. Die Deletion der vermutlichen Transportdomänen innerhalb des ORF führt dazu, dass die 104 kDa große Passenger-Domäne nicht mehr in den extrazellulären Raum transportiert werden kann (Brunner *et al.*, 1997), welches die Identifikation von EspP als ein Autotransporter-Protein unterstützt. Die „Passenger-Domäne“ trägt die Effektorfunktion des Proteins (Henderson, 2004). Kürzlich veröffentlichte Forschungsergebnisse zeigen, dass der Autotransporter-Sekretionsweg in seinen mechanistischen Details sehr komplex ist. Da die vorliegende Arbeit sich mit den Effektoreigenschaften der Passenger-Domäne beschäftigt, wird auf eine ausführliche Darstellung der Transportmechanismen verzichtet und auf die entsprechende Literatur verwiesen (Dautin und Bernstein, 2007; Dautin *et al.*, 2007; Barnard *et al.*, 2007; Ieva *et al.*, 2008; Ruiz-Perez *et al.*, 2009; Ieva *et al.*, 2009).

EspP spaltet porcines Pepsin A und den humanen Blutgerinnungsfaktor V (Brunner *et al.*, 1997). Darüber hinaus zeigt die Protease Autoproteolyse, bei der am C-Terminus ein 18 kDa großes Fragment abgespalten wird. Die Autoproteolyse von EspP $\alpha$  hat keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteins (Brockmeyer, 2009). Die Analyse der entstandenen Fragmente von Faktor V und EspP $\alpha$  zeigt, dass das entsprechende Substrat nach Leucin und einer weiteren hydrophoben Aminosäure gespalten wird (Brockmeyer, 2009). Des Weiteren wird die Proteasefunktion durch Inkubation mit dem Serinproteaseinhibitor Phenylmethansulfonyl-Fluorid (PMSF) gehemmt (Brunner *et al.*, 1997). Zusätzlich belegen vergleichende Homologie- und Funktionsstudien, dass es

---

sich bei EspP um eine Serinprotease handelt, so dass EspP in die Unterfamilie der „serine protease autotransporters of enterobacteriaceae“ eingeteilt werden kann.

Eine Analyse der Gensequenzen von *EspP* aus 575 EHEC und STEC-Stämmen zeigte, dass EspP in vier weitere Subtypen untergliedert werden kann, welche als *espP* $\alpha$ , *espP* $\beta$ , *espP* $\gamma$  und *espP* $\delta$  bezeichnet werden (Brockmeyer *et al.*, 2007). Von diesen Subtypen sind nur EspP $\alpha$  und EspP $\gamma$  proteolytisch aktiv, EspP $\beta$  und EspP $\delta$  sind entweder proteolytisch inaktiv oder werden nicht sezerniert (Brockmeyer *et al.*, 2007). Die Analyse der Verteilungsstruktur von *espP* zeigte, dass proteolytisch aktives EspP vorwiegend in den humanpathogenen Serogruppen O157, O26, O111 und O145 vorkommt. Besonders im hochpathogenen Serotyp O157:H7 ist *espP* $\alpha$  in 100% der Fälle zu finden (Brockmeyer *et al.*, 2007). Auch eine Studie von Khan und Mitarbeitern zeigt, dass EspP $\alpha$  vorwiegend mit hochpathogenen Serotypen assoziiert ist (Khan *et al.*, 2008). Ein Vergleich von STEC Stämmen aus Milchprodukten und von Patientenisolaten zeigte eine deutlich höheres Auftreten von EspP in humanpathogenen Stämmen (Pradel *et al.*, 2008). Obwohl in der letztgenannten Studie keine Analyse in Bezug auf die EspP-Subtypen statt fand, unterstreicht die gemeinsame Betrachtung der drei Studien die Rolle von EspP als möglichen Virulenzfaktor.

Darüber hinaus wurden in Seren von Patienten mit EHEC-Infektionen Antikörper gegen EspP nachgewiesen (Brunder *et al.*, 1997), so dass EspP auch während der Infektion exprimiert wird und ein Einfluss von EspP während einer EHEC-Infektion sehr wahrscheinlich ist.

Über die genaue Funktion von EspP während der Pathogenese existieren bislang nur wenige Erkenntnisse. Wie bereits erwähnt, spaltet EspP $\alpha$  den humanen Blutgerinnungsfaktor V. Eine daraus resultierende mögliche Störung der Hämostase könnte zur Entstehung einer hämorrhagischen Kolitis beitragen (Brunder *et al.*, 1997). Darüber hinaus wurde berichtet, dass EspP $\alpha$  P-Selektin und von Willebrand-Faktor spalten kann (Brockmeyer, 2009). Beide Proteine tragen Schlüsselfunktionen während der Hämostase und während Entzündungsprozessen. Eine genauere Analyse der Spaltung von P-Selektin zeigte außerdem, dass die beiden anderen Mitglieder der Selektin-Familie E-Selektin und L-Selektin, trotz einer hohen Homologie der Proteine untereinander, nicht gespalten werden (Brockmeyer, 2009). Obwohl noch andere Faktoren bei der Substratspezifität eine Rolle spielen, lassen die bisherigen Ergebnisse die Vermutung zu, dass die Spaltung von P-Selektin hochspezifisch ist (Brockmeyer 2009). Alle bisher identifizierten Substrate des EspP sind wichtige Kofaktoren der

---

Hämostase bzw. Schlüsselfaktoren bei Entzündungsprozessen und sind in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten gespeichert (Harrisson und Cramer 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die proteolytische Spaltung und ihre Effekte auf die bereits beschriebenen Substrate eingehender charakterisiert. Darüber hinaus wurden weitere Proteine der Hämostase als Substrate für EspP identifiziert und genauer untersucht. Die nächsten 2 Kapitel enthalten einen Überblick über die Rolle der untersuchten EspP-Substrate bei der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten bzw. bei der Rekrutierung von Leukozyten während des Entzündungsprozesses.

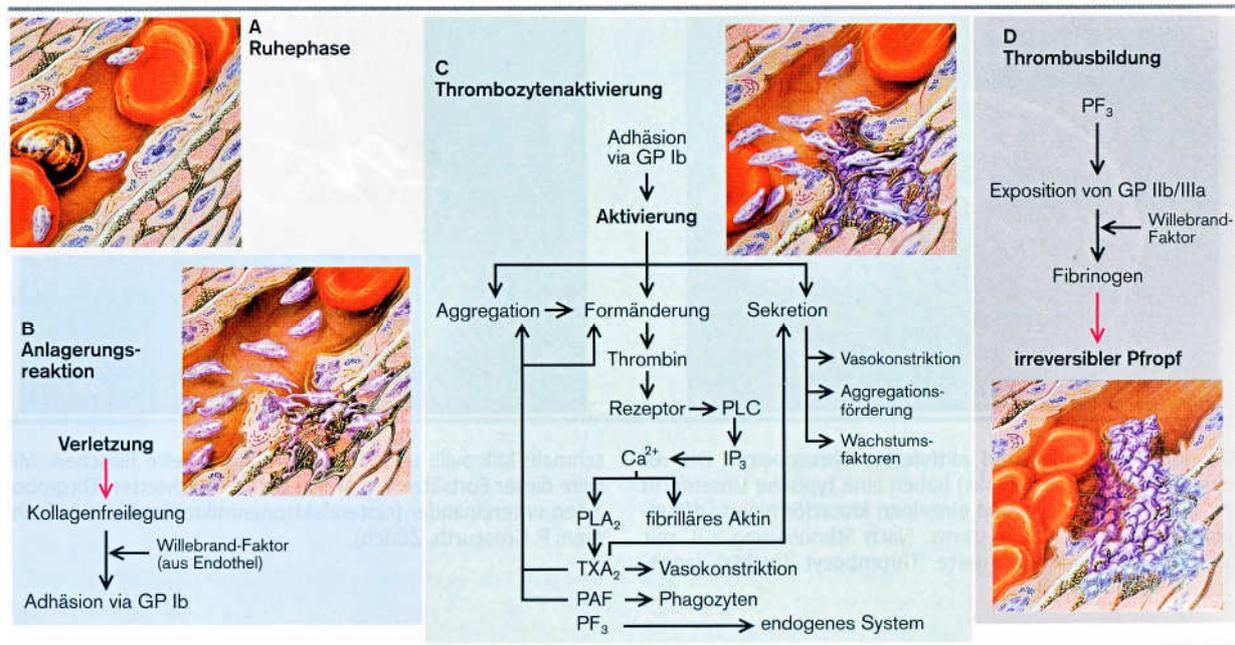
## 2.4 Hämostase

Bei der Hämostase (Blutstillung) sorgen Wechselwirkungen zwischen dem Gefäßendothel, den Thrombozyten und den Gerinnungsfaktoren aus dem Plasma für einen schnellen Verschluss von Verletzungen im Blutgefäßsystem, um Blutverluste zu minimieren.

Thrombozyten sind anukleäre Fragmente von Megakaryozyten aus dem Knochenmark. Sie enthalten neben einigen Mitochondrien auch Glykogen und unterschiedliche Typen von Granula. Die großen  $\alpha$ -Granula enthalten hauptsächlich Faktoren, die für die Plättchenadhäsion und Plättchenaggregation wichtig sind, sowie weitere Gerinnungs- und Wachstumsfaktoren. Die  $\delta$ -Granula (elektronendichte Granula) enthalten Serotonin, Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat und Histamin. Sie haben ebenfalls wichtige Funktionen bei der initialen Blutgerinnung und sind für die Vasokonstriktion im Umfeld des beschädigten Gefäßabschnitts wichtig und zusätzlich an der Gefäßreparatur beteiligt. Die  $\lambda$ -Granula enthalten Lysosomen und verschiedene Hydrolasen. Diese dienen hauptsächlich der Resorption des Gerinnsels bei der Wiederherstellung der Gefäßwand (Rendu und Brohard-Bohn, 2001).

Die normale Thrombozytenzahl beim Erwachsenen beträgt 170.000 bis 400.000/ $\mu$ L Blut. Die durchschnittliche Lebensdauer eines Thrombozyten beträgt ungefähr 10 Tage. Bei einer Gefäßverletzung werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an denen sich Thrombozyten mit Hilfe weiterer Proteine, wie des von Willebrand-Faktors, anheften können. Bei der darauf folgenden Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Exozytose der  $\alpha$ -Granula und der elektronendichten Granula, wodurch weitere Thrombozyten rekrutiert und aktiviert werden, und so primäre Aggregate bilden können. Einhergehend mit der Aktivierung der Thrombozyten erfolgt eine morphologische Veränderung. Aus den diskoiden Thrombozyten formen sich kugelige Gebilde mit

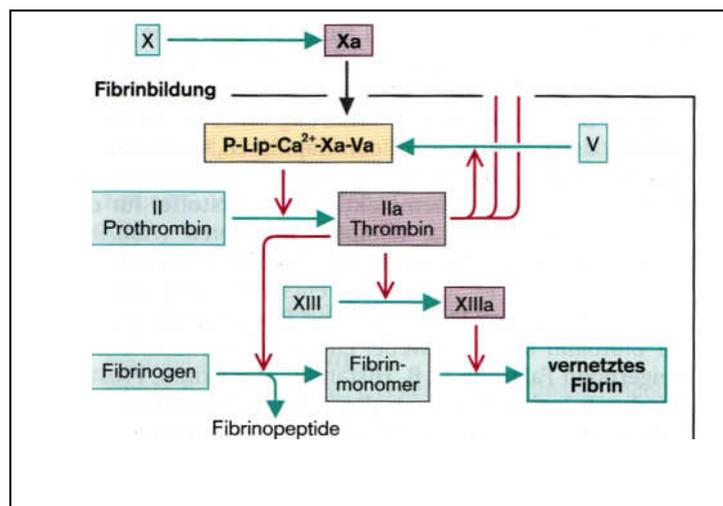
langen Pseudopodien durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte Umwandlung von globulärem in fibrilläres Aktin. Dieser Prozess ermöglicht eine Verzahnung der Thrombozyten. Die initiale Thrombusbildung wird auch als primäre Hämostase bezeichnet.



**Abb. 2.2: Aktivierung von Thrombozyten.** Morphologische Veränderungen (Abbildungen): A Unverletzte Kapillare; B Anlagerungsreaktion der Thrombozyten an Kollagen nach Verletzung; C Rekrutierung von Thrombozyten durch Signalstoffe aus aktivierten Thrombozyten und Aggregation von rekrutierten Thrombozyten; D Bildung eines weißen Thrombus. Biochemische Phasen (Pfeildiagramme): A Ruhephase; B Adhäsion an Kollagen mit Hilfe des Glykoproteinrezeptors Ib; C  $\text{Ca}^{2+}$  vermittelte Umwandlung von globulärem in fibrilläres Aktin; D Exposition des Glykoproteinrezeptors IIB/IIIa auf Thrombozyten und nachfolgende Aggregatbildung. Modifiziert nach: Klinker und Silbernagl „Lehrbuch der Physiologie“ 2.Aufl. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York; S.206 (2000).

Unmittelbar nach der initialen Thrombusbildung wird die plasmatische Gerinnung aktiviert. Dabei wird nach einer Kaskade von Enzymaktivierungen, die über zwei unterschiedliche Wege initiiert werden kann (extrinsischer und intrinsischer Weg), aus den Blutgerinnungsfaktoren X, V und IV sowie  $\text{Ca}^{2+}$  und Phospholipiden der Prothrombinasekomplex gebildet, der wiederum Prothrombin in enzymatisch aktives Thrombin umwandelt.

In der Fibrinbildungsphase spaltet Thrombin Fibrinogen in Fibrinmonomere, welche durch die Beteiligung weiterer Gerinnungsfaktoren und unter Ausbildung kovalenter Bindungen Polymere bilden. Das so entstandene Fibrinnetzwerk, in das auch Erythrozyten und Leukozyten eingelagert werden, stabilisiert den Thrombus. In der Retraktionsphase verbindet sich das Fibrinnetzwerk mit dem Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche unter Beteiligung von Fibronektin. Das in der Aktivierungsphase entstandene Thrombin fördert nicht nur die Aggregation der Thrombozyten, sondern auch die Aktivierung ihres kontraktiven Aktin-Myosin-Systems. Unter dem Zug der sich kontrahierenden Thrombozyten wird das Volumen des ursprünglichen Thrombus stark verringert und stabilisiert. Thrombozyten sind nicht nur essentiell für die Hämostase, sondern spielen auch eine wichtige proinflammatorische Rolle. Thrombozyten können mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten interagieren und ihre Rekrutierung und Transmigration in entzündetes Gewebe fördern.



**Abb. 2.3: Fibrinbildungsphase der plasmatischen Gerinnung:** Der Prothrombinasekomplex bestehend aus P-Lip-Ca<sup>2+</sup>-IXa-Va leitet die Fibrinbildung ein. Modifiziert nach: Klinker und Silbernagl „Lehrbuch der Physiologie“ 2.Aufl. Georg Thieme Verlag; Stuttgart, New York; S.209 (2000).

#### 2.4.1 Von Willebrand-Faktor

Der finnische Arzt Erik von Willebrand beschrieb als erster eine schwere Blutgerinnungsstörung bei einem fünfjährigen Mädchen. Später wurde sowohl das Krankheitsbild (von Willebrand-Jürgens-Syndrom) als auch das Protein, dessen Fehlen

---

oder Defekt für dieses Krankheitsbild verantwortlich gemacht wird, nach ihm benannt (Haberichter *et al.*, 2006).

Von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein multimeres Glykoprotein, das aus identischen Untereinheiten besteht. Das Dimer bzw. die Multimere sind über Disulfidbrücken miteinander verknüpft und haben eine Größe von ca. 500 kDa im Falle eines Dimers. Die Multimere können ein Molekulargewicht größer als 10000 kDa erreichen. Das Gen für vWF ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert und umfaßt 180 Kilobasen. vWF kann nur durch Endothelzellen und Megakaryozyten synthetisiert und gespeichert werden.

Die Wechselwirkung zwischen dem Glykoproteinrezeptor Iba und dem Integrin  $\alpha_2\beta_3$  auf der Thrombozytenoberfläche mit vWF spielt eine zentrale Rolle bei der Rekrutierung von Thrombozyten, dem initialen Plättchenarrest an geschädigtes Endothel und der Aktivierung von Thrombozyten (Reininger, 2008).

Endotheliale Zellen speichern vWF in seiner multimeren Form in den Weibel-Palade-Körperchen, wobei besonders die großen Multimere in diesem Kompartiment deponiert werden. Endothelzellen sind in der Lage, nach Stimulation mit entsprechenden Agonisten, wie z.B. Thrombin, vWF durch Exozytose der Weibel-Palade-Körperchen in die extrazelluläre Matrix und die Blutzirkulation abzugeben, oder ihn direkt nach der Synthese freizusetzen (Reininger, 2008).

Ein weiterer Speicherort der großen Multimere sind die  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten, welche ebenfalls nach ihrer Aktivierung vWF freisetzen können. Die großen vWF-Multimere haben eine besonders hohe Bindungsaffinität für Kollagen und den Glykoproteinrezeptorezeptor Iba, so dass durch Exozytose der  $\alpha$ -Granula sowie der Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen die hämostatisch effektivsten Multimere in unmittelbarer Nähe von vaskulären Läsionen verfügbar sind (Reininger, 2008). Obwohl auch subendothelialer vWF die Bindung von Plättchen effizient unterstützen kann (Stel *et al.*, 1985; Turitto *et al.*, 1985), bindet vorherrschend der im Plasma zirkulierende vWF an Komponenten der extrazellulären Matrix. Perfusion von extrazellulärer Matrix mit humanem Blut, welches einen inhibierenden anti-vWF-Antikörper enthielt, verringerte die Plättchenadhäsion um bis zu 90% (Stel *et al.*, 1985; Turitto *et al.*, 1985).

Die Bindung von Thrombozyten an Oberflächen ist abhängig von der Flussgeschwindigkeit des Blutes bzw. dem Scherstress. Bei hohem Scherstress ist die Thrombozytenadhäsion streng abhängig von vWF und seinem Glykoproteinrezeptor Iba auf der Plättchenoberfläche (Reininger, 2008). Selbst auf einem Substrat wie Kollagen, für welches Plättchen mehrere Rezeptoren wie z.B. GPIb, Integrin  $\alpha_2\beta_3$  und Integrin

---

$\alpha_2\beta_1$  besitzen, muss bei hohem Scherstress erst vWF an Kollagen gebunden werden um die Adhäsion der Thrombozyten zu ermöglichen (Reininger, 2008). Dennoch ist die Plättchenadhäsion nicht auf den vWF beschränkt, sondern erfordert das Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Kollagen-gebundener vWF kann Thrombozyten nicht fest binden. Es erfolgt eine Ablösung der Plättchen von vWF und ein langsames Rollen über die Oberfläche in Flussrichtung des Blutes (Kato *et al.*, 2003; Donadelli *et al.*, 2006).

Das langsame Rollen der Thrombozyten ermöglicht wiederum die Bildung zusätzlicher Bindungen, die für eine stabile Plättchenadhäsion und Ausbreitung sorgen und die Aggregatbildung fördern (Reininger, 2008).

Das Integrin  $\alpha_2\beta_3$  bindet z.B. an vWF und weitere adhäsive Substrate wie z.B. Fibrinogen, Fibrin, Thrombospondin, Vitronektin und Fibronektin (Ruggeri *et al.*, 1982 und 1983). Das Wachstum des gebildeten Thrombus ist auch unter Flussbedingungen neben vWF von weiteren Proteinen, wie z.B. Fibrinogen, abhängig. Gemeinsam fördern sie die Thrombozytenaggregation (Donadelli *et al.*, 2006; Ruggeri *et al.*, 1999 und 2006). vWF trägt darüber hinaus zur Stabilisation des Thrombus bei, indem es z.B. kovalent an Fibrin bindet (Hantgan *et al.*, 1990).

#### **2.4.2 Fibrinogen**

Fibrinogen ist ein heterohexameres Glykoprotein mit einer Größe von 340 kDa, wird vorwiegend von Hepatozyten synthetisiert und zirkuliert im Plasma mit einer Konzentration von ca. 1,5 bis 4,0 g/L. Weitere Speicherorte sind, wie bei vWF, die  $\alpha$ -Granula von Plättchen, welche Fibrinogen durch Endozytose aus dem Plasma aufnehmen (Handagama, 1990).

Während der Blutgerinnung übernimmt Fibrinogen unterschiedliche Aufgaben. Fibrinogen wird nach Aktivierung der Gerinnungskaskade durch die Einwirkung von  $\alpha$ -Thrombin zu Fibrin umgewandelt. Darauf folgend polymerisieren die entstandenen Fibrinmonomere spontan und bilden intermolekulare Vernetzungen, so dass ein Fibrinnetzwerk zur Thrombusstabilisierung entsteht. An dieses Netzwerk können wiederum Thrombozyten, Leukozyten und Erythrozyten, die essentielle Aufgaben bei der Thrombusbildung erfüllen (Wohner, 2008) binden.

Außerdem besitzt Fibrinogen viele Bindungsstellen für Integrine und andere Rezeptoren, so dass Fibrinogen z.B. unterschiedliche Zelltypen binden kann (Herrick *et al.*, 1999). Thrombozyten können über das Integrin  $\alpha_2\beta_3$  an Fibrinogen adhären.

---

Hauptsächlich erfolgt die Aggregation von Plättchen (Lefkovits *et al.*, 1995; Weisel *et al.*, 1992) über diese Bindung, so dass Fibrinogen maßgeblich an der Thrombusbildung beteiligt ist. In Mäusen ist in Abwesenheit von Fibrinogen ein allein über vWF entstandener Thrombus zwar schneller gebildet, aber instabiler als ein über Fibrinogen und vWF langsam gebildeter Thrombus (Ni *et al.*, 2000).

### 2.4.3 Fibronektin

Fibronektin ist ein dimeres Glykoprotein mit einer Monomergröße von 250 kDa. Abhängig von seiner Herkunft existiert es in alternativen Spleißvarianten und hat unterschiedliche Funktionen. Plasma-Fibronektin wird von Hepatozyten synthetisiert und liegt in humanem Plasma mit einer Konzentration von 300 bis 400 µg/mL vor. Fibronektin aus Plasma kann in Fibrinnetzwerke eingebaut werden und verstärkt nicht nur den Thrombus, sondern führt dadurch auch zu einer veränderten Scherrate, die wiederum Einfluss auf die hämostatische Funktion von Fibrin und Gerinnungsfaktor VIIIa nehmen kann (Mosher, 1975; Berezky *et al.*, 2003; Board *et al.*, 1993).

Für die Interaktion mit Thrombozyten steht Fibronektin aus unterschiedlichen Quellen zur Verfügung: Fibronektin aus humanem Plasma und zelluläres Fibronektin, welches an der Stelle vaskulärer Läsionen von Zellen synthetisiert und sezerniert werden kann, sowie Fibronektin in extrazellulärer Matrix und aus den  $\alpha$ -Granula aktivierter Thrombozyten (Ginsberg *et al.*, 1981; Mosesson *et al.*, 1970; Nurden *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Thrombusbildung von Plättchen in Fibronektin-depletiertem Plasma auf der Basalmembran und auf Oberflächen, die mit fibrillärem Typ-III-Kollagen beschichtet wurden, verringert ist (Bastida *et al.*, 1987; Houdijk *et al.*, 1985). In einer weiteren Studie wurde allerdings beschrieben, dass die Adhäsion von Thrombozyten unabhängig vom Scherstress und weniger effizient als die Adhäsion an vWF und Kollagen ist. Die Zugabe von Fibronektin in physiologischen Konzentrationen stellte diese Fähigkeit wieder her (Polanowska-Grabowska *et al.*, 1999). Wie auch beim Fibrinogen, stellt das Integrin  $\alpha_2\beta_3$  den Hauptrezeptor für Fibronektin auf aktivierten Oberflächen dar (Plow *et al.*, 1985), obwohl Thrombozyten auch über das Glykoprotein Ib und vWF an Fibronektin binden können (Beumer *et al.*, 1995). Die Rolle von Fibronektin bei der Plättchenaggregation in Bezug auf eine inhibierende oder unterstützende Wirkung wird kontrovers diskutiert (Plow *et al.*, 1981; Moon *et al.*, 1986; Santoro, 1983; Dixit *et al.*, 1985; Thurlow *et al.*, 1990).

---

#### 2.4.4 Thrombospondin-1

Das Glykoprotein Thrombospondin-1 (TSP-1) ist Mitglied der Thrombospondinfamilie, bestehend aus TSP-1 bis TSP-5. TSP-1 und TSP-2 bilden eine weitere Untergruppe, da es sich bei diesen Proteinen um Trimere handelt, während TSP-3 bis TSP-5 Pentamere sind. Das Monomer von TSP-1 hat ein Molekulargewicht von 180 kDa. TSP-1 wird von Megakaryozyten synthetisiert und ist eines der Hauptbestandteile der  $\alpha$ -Granula. Nach der Degranulation verbleibt ungefähr die Hälfte des Thrombospondins auf der Zelloberfläche (Bonney *et al.*, 2008). Unter physiologischen Bedingungen befindet sich TSP-1 in einer Konzentration von 60 bis 300 ng/mL in humanem Plasma. TSP-1 ist ein multifunktionales Protein und ist in sehr unterschiedliche biologische Prozesse und in die Entstehung von Krankheiten involviert, wie z.B. Angiogenese, Atherosklerose, Thrombose und auch Hämostase. Aus diesem Grund soll hier kurz seine Rolle in der Thrombozytenadhäsion und –aggregation erläutert werden.

TSP-1 wird, außer von Megakaryozyten, von Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen synthetisiert und interagiert als Bestandteil der Gefäßwand mit Fibronectin, Kollagen, vWF, Proteoglykanen und Laminin (Bonney, 2001). In einer Studie mit TSP-1 beschichteten Plastikobjektträgern konnte die Adhäsion und Ausbreitung von Thrombozyten gezeigt werden (Tuszynski und Kowalska, 1991). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nur in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  Thrombozyten an Oberflächen adhäreren können (Agbanyo *et al.*, 1993). In einer weiteren Studie wird TSP-1 als ein alternativer Mechanismus zu vWF in Bezug auf die Plättchenadhäsion unter hohem Scherstress diskutiert (Jurk *et al.*, 2003). Unterschiedliche Studien belegen einen Beitrag von TSP-1 zur Aggregation von Thrombozyten unter statischen Bedingungen (Bonney *et al.*, 2008), aber auch unter Flussbedingungen konnte ein Beitrag von TSP-1 zur Plättchenaggregation gezeigt werden. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Interaktion von TSP-1 mit Fibrinogen in Bezug auf die Größe und Stabilität von Plättchenaggregaten (Bonney, 2001; Asch 1989).

#### 2.4.5 Vitronektin

Vitronektin ist ein multifunktionales 75 kDa großes Glykoprotein, welches im Serum vorwiegend als Monomer und in der extrazellulären Matrix vorkommt.

Unter anderem stabilisiert Vitronektin Protein PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*), das an der Regulation der Fibrinolyse beteiligt ist. Neben dieser Beteiligung unterstützt

---

Vitronektin die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Die Bindung von aktivierten Thrombozyten ist calciumabhängig und kann durch blockierende Antikörper verhindert werden (Asch und Podack, 1990).

## 2.5 Leukozyten

Da bereits in 2.3.6. die Spaltung von P-Selektin - einem Schlüsselprotein bei der Rekrutierung von Leukozyten - erwähnt wurde, soll hier kurz die Rolle der Leukozyten und von P-Selektin bei Entzündungsprozessen erläutert werden.

Leukozyten sind zelluläre Bestandteile des Immunsystems und haben ihren Ursprung im Knochenmark. Sie lassen sich in Lymphozyten, basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten, Monozyten, sowie dendritische Zellen unterteilen.

Lymphozyten sind Bestandteile der adaptiven Immunantwort und werden in T- und B-Lymphozyten untergliedert. Beide Lymphozytenpopulationen werden durch den Kontakt mit Antigenen aktiviert. T-Lymphozyten sind dabei darauf spezialisiert, fremde Erreger zu attackieren und zu lysieren. B-Lymphozyten produzieren und sezernieren spezifische Antikörper bzw. Immunglobuline (Janeway *et al.*, 2002).

Granulozyten zirkulieren im Blut und dringen nur dann in Gewebe ein, wenn sie zu Infektions- oder Entzündungsherden mittels Chemotaxis gelockt werden. Neutrophile Granulozyten werden dort dazu aktiviert, Bakterien durch Phagozytose aufzunehmen. Eosinophile und basophile Granulozyten bekämpfen in den Körper eingedrungene Parasiten, die zu groß sind um direkt phagozytiert zu werden, indem sie zytotoxisch wirkende Substanzen aus ihren Granula freisetzen. Bei der Degranulation basophiler Granulozyten wird unter anderem Histamin freigesetzt, welches an allergischen Reaktionen beteiligt ist (Janeway *et al.*, 2002).

Unreife dendritische Zellen wandern über das Blut in die peripheren Gewebe, wo sie Antigene aufnehmen. Wenn sie auf einen Krankheitserreger treffen, reifen sie und wandern in die lymphatischen Gewebe, wo sie antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren.

Monozyten werden durch Chemotaxis transendothelial ins Gewebe rekrutiert und differenzieren dort zu Makrophagen, welche die wichtigsten geweberesidenten phagozytischen Zellen des angeborenen Immunsystems sind.

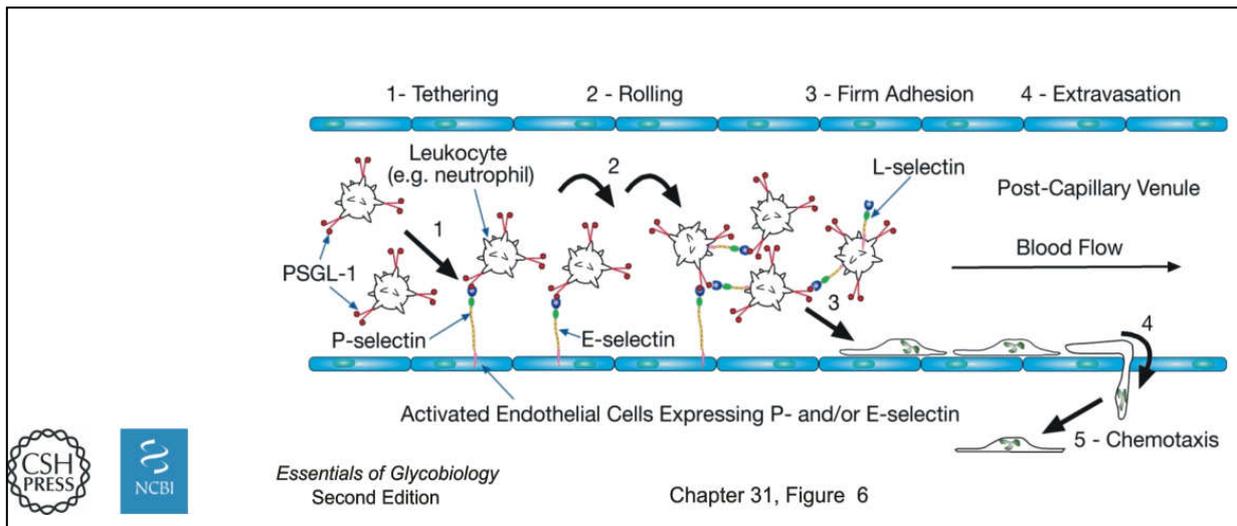
---

### 2.5.1 Selektine

Selektine gehören zu den Zelladhäsionsmolekülen, die bei der Verbindung von Zellen im Gewebe und auch bei weniger dauerhaften Wechselwirkungen eine Rolle spielen.

Die Selektinfamilie besteht aus den drei Mitgliedern E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin. Sie werden von unterschiedlichen vaskulären Zelltypen exprimiert, wie z.B. Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (P- und E-Selektin) sowie von Thrombozyten, bei denen P-Selektin Bestandteil der  $\alpha$ -Granula ist (Harrison und Cramer, 1999). Alle Selektine haben eine gemeinsame Grundstruktur, die sich in den lektinartigen Domänen ihrer extrazellulären Abschnitte unterscheiden. Die Lektindomänen binden an spezifische Zuckergruppen und somit die Selektine jeweils an ein Kohlenhydratmolekül der Zelloberfläche.

Selektine sind von besonderer Bedeutung wenn es darum geht, dass Leukozyten in spezifischen Geweben ihren Bestimmungsort erreichen. So vermittelt P-Selektin über PSGL-1 die Bindung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Yang *et al.*, 1999; Evangelista *et al.*, 1999). P- und E-Selektin ermöglichen darüber hinaus das Rollen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten auf aktiviertem Endothel und auf Thrombozyten (Kansas, 1996; Doré *et al.*, 1993; Oloffson, 1994). Somit unterstützen sie initial den Prozess der Transmigration von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Außerdem spielt P-Selektin eine wichtige Rolle bei der Hämostase, indem es das Rollen von Thrombozyten unter anderem über seinen Rezeptor PSGL-1 (*P-Selectin glycoprotein ligand*) auf der Endothelzelloberfläche, bzw. über die Interaktion von P-Selektin und dem Glykoproteinrezeptor Ib vermittelt (Frenette *et al.*, 1995; Romo *et al.*, 1999; da Costa Martins *et al.*, 2007; Bombeli *et al.*, 1998).



**Abb. 2.4: Beispiel einer Interaktion neutrophiler Granulozyten mit aktivierten Endothelzellen.** P-Selektin und E-Selektin vermitteln das Rollen auf aktiviertem Endothel über PSGL-1. Aus: „Essentials of Glycobiology“ 2.Aufl. Cold Spring Harbour Laboratory Press; Cold Spring Harbour, New York.

---

## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle von EspP $\alpha$  während einer EHEC-Infektion ist immer noch weitgehend ungeklärt. Während aktuelle Untersuchungen zur Prävalenz, Verteilung und Struktur von EspP $\alpha$  seine Rolle als EHEC Virulenzfaktor untermauern (Brockmeyer *et al*, 2007) ist über die mögliche Funktion der Protease während der Infektion kaum etwas bekannt. Da EspP $\alpha$  allerdings in der Lage ist, den humanen Blutgerinnungsfaktor V zu spalten (Brunner *et al.*, 1997); sowie von Willebrand-Faktor und P-Selektin durch EspP $\alpha$  gespalten werden können (Brockmeyer, 2009), liegt die Vermutung nahe, dass EspP mit Funktionen der humanen Blutgerinnung und Immunabwehr interagieren kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die bereits bekannten Substrate (von Willebrand-Faktor und P-Selektin) hinsichtlich eines möglichen funktionellen Defekts zu untersuchen. Da alle drei Proteine im selben Speicherkompartiment, den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten vorhanden sind, sollten weitere wichtige Proteine der Hämostase aus diesem Speicherkompartiment als mögliche Interaktionspartner für EspP $\alpha$  identifiziert werden. Darüber hinaus sollten die potentiellen neuen Substrate im Hinblick auf einen möglichen, durch EspP $\alpha$  verursachten, funktionellen Defekt geprüft werden.

Da in der Literatur widersprüchliche Daten bezüglich der Zytotoxizität von EspP $\alpha$  existieren, sollte eine mögliche zytotoxische Wirkung von EspP $\alpha$  auf Endothelzellen analysiert werden.

---

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert erwähnt, in Analysen-Qualität von den Firmen Fluka (Deisenheim), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenheim) und VWR (Darmstadt) bezogen. Spezielle Chemikalien und Reagenzien sind für die jeweiligen Methoden gesondert aufgeführt.

| Geräte                   | Hersteller, Standort, Modell  |
|--------------------------|---|
| Autoklaven               | H&P Labortechnik, München: Varioklav E500   |
| Brutschränke             | Heraeus, Hanau: Function Line   |
| Elektrophorese-Kammern   | Bio-Rad, München: mini-Protean® 3 Cell  |
| Elektrophorese-Netzteile | Bio-Rad, München: Modelle 3000Xi, 300 Biometra Göttingen: Modelle P23, 24               |
| Foto-Imager              | Bio-Rad, München: Modell ChemiDoc XRS   |
| Mikrotiterplatten-Leser  | Dynex, Berlin: Opsys MR   |
| Mikroskope               | Carl Zeiss Jena: Axiovert 25 +40 CFL, Axioskop 50, Axio Imager A1-Mikroskop             |
| Mikrowellenofen          | AEG, Frankfurt am Main: Micromat  |
| pH-Meter                 | WTW, Weilheim i. OB: Modell pH 530  |
| Proteinblotkammern       | Carl Roth, Karlsruhe: Semidry Blotter V20-SBD Bio-Rad, München: tank blotting chamber   |
| Schüttelinkubator        | Sartorius BBI Systems, Melsungen; Certomat R/H  |
| Sicherheitswerkbank      | W.H. Mahl Reinraum Klima, Trendelburg: Sterilguard Class II Type A/B3                   |
| UV/VIS Photometer        | Shimadzu Duisburg: UV/VIS Spektrophotometer UV Mini 1240                                |
| Vortexer                 | Merck, Darmstadt: Modell Test Tube Shaker MELBI 1719                                    |
| Waagen                   | OHAUS; Pinebrook, NJ, USA, verschiedene Modelle Scout 2, Explorer                       |
| Wasserbad                | Haake, Karlsruhe SWB25  |
| Zentrifugen              | Eppendorf Hamburg, verschiedene Modelle 5804R, 5417R Hettich, Tuttlingen: Rotanta 460RS |

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Bakterienstämme und Plasmide

| Laborstämme              | Genotyp  | Serotyp | Referenz                         |
|--------------------------|--|---------|----------------------------------|
| <i>E. coli</i> K12 DH5α  | huA2 Δ(argF-lacZ)U169<br>phoA glnV44 Φ80<br>Δ(lacZ)M15 gyrA96<br>recA1 relA1 endA1 thi-1<br>hsdR17 |         | Hanahan, 1985                    |
| <i>E. coli</i> K12 HB101 | hsdS20 recA13 ara-14<br>proA2 lacY1 galK2<br>rpsL20 xyl-5, mtl-1<br>supE44                         |         | Boyer und Roulland-Dussoix, 1969 |
| Wildtypstamm             | Genotyp  | Serotyp | Referenz                         |
| EDL 933                  | stx1, stx2   | O157:H7 | O'Brien <i>et al.</i> , 1984     |

| Plasmide | Eigenschaft  | Referenz                     |
|----------|--|------------------------------|
| pB9-5    | pK18 mit 4,4Kb HindIII/SmaI Fragment<br>aus pO157 mit EspP | Brunder <i>et al.</i> , 1997 |
| pBS263A  | pB9-5 mit Mutation von AS S263 zu A                        | Brockmeyer, 2009             |

### 3.2.2 Medien und Nährböden für Bakterienkulturen

#### Luria-Bertani (LB) Medium

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| Trypton                          | 10 g             |
| Hefeextrakt                      | 5 g              |
| NaCl                             | 10 g             |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 1 L<br>pH 7,4 |

---

### LB Agar nach Lennox

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Trypton                          | 10g             |
| Hefeextrakt                      | 5g              |
| NaCl                             | 5g              |
| Agar-Agar                        | 15g             |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 1L<br>pH 7,4 |

### **3.2.3 Haltung und Anzucht**

#### **Lagerung**

Die in dieser Arbeit verwendeten *E.coli* Stämme werden auf LB Agar bei 37°C kultiviert und bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert und danach auf frischen Nährboden überführt.

#### **Konservierung von Bakterien**

Für die Konservierung von Bakterien wird Trypticase<sup>®</sup>-Sojabouillon (TSB, Becton Dickinson, USA) und Glycerin im Verhältnis 1:3 verwendet. 1µL dieser Lösung wird in ein mit Kunststoffkügelchen befülltes Kryoröhrchen (Corning, USA) überführt. Der zu konservierende Stamm wird über Nacht auf einer Agarplatte angezüchtet und anschließend wird mit einer Kunststoffimpföse die gesamte Koloniemasse in dem Konservierungsmedium resuspendiert. Es wird einige Minuten auf Eis inkubiert und der Überstand von den Kunststoffkügelchen dekantiert. Das Kryoröhrchen wird bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **Übernachtskultur**

Zur Herstellung von Übernachtskulturen werden mit einer Impföse entnommene Bakterien in LB Medium inokuliert und bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bei 180 Umdrehungen pro Minute (Upm) über Nacht inkubiert.

#### **Bestimmung der Bakterienzahl**

Die Gesamtzahl der Bakterienkulturen wird durch photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge  $A_{600nm}$  durchgeführt. Hierzu werden die Kulturen mit Aqua dest. im linearen Messbereich verdünnt und gegen LB Medium als Kontrolle

---

gemessen. Eine Absorption von 1,0 entspricht hierbei näherungsweise einer Gesamtkeimzahl von  $10^9$  *E.coli*-Zellen/mL (Sambrook *et al.*, 1989).

### **3.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.3.1 Proteinfällungen**

##### **Trichloressigsäure (TCA) -Fällung**

1mL der Probe wird mit TCA versetzt, so dass eine Endkonzentration von 10% TCA erreicht wird. Die Probe wird für mindestens eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 20000g 15min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet wird in 30µL Probenpuffer (20mM Tris-HCl) aufgenommen und anschließend mit 10µL SDS-Probenpuffer versetzt. Sollte nach Zugabe des SDS-Probenpuffers ein gelber Farbumschlag auftreten, wird durch die Zugabe geringer Mengen (1-3µL) gesättigter Tris-Lösung der pH-Wert so weit angehoben, bis die charakteristische Blaufärbung des Probenpuffers eintritt.

##### **Ammoniumsulfat-Fällung**

Für eine Proteinfällung unter milden Bedingungen, aus denen Proteine wieder renaturiert werden können, wird eine Ammoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Kalte, gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung wird solange zur Proteinlösung hinzugefügt, bis eine Trübung eintritt. Für die Fällung von EspP aus dem Kulturüberstand wird eine Konzentration von ca. 55% Ammoniumsulfat verwendet. Die Fällung wird für mind. 90 Minuten, oder über Nacht bei 4°C stehen gelassen, anschließend in Zentrifugenröhrchen (50mL, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und bei 20000g 30min abzentrifugiert. Der klare Überstand wird verworfen und die an der Gefäßwand niedergeschlagenen Proteine werden in Puffer aufgenommen.

#### **3.3.2 Herstellung von Thrombozytenlysaten**

Der Zentrifugation gereinigter Thrombozyten bzw. Zentrifugation von Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentraten (TK) bei 1500g für 10min folgt ein- bis zweimaliges Waschen mit PBS. Anschließend werden die Thrombozyten in RIPA-Puffer mit

---

Proteaseinhibitoren aufgenommen und 20 bis 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Abstand von 5 Minuten wird das Lysat mit der Pipette und dem Vortexer erneut gemischt.

#### Zusammensetzung des RIPA-Puffers

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Tris                | 50 mM  |
| NaCl                | 150 mM |
| SDS                 | 0,1 %  |
| Natriumdesoxycholat | 0,5 %  |
| Triton X-100        | 1 %    |

Lagerung des Puffers in Aliquots von 10mL bei -20°C . Vor der Verwendung des RIPA-Puffers wird ggf. 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail „*complete mini*“ (Roche Diagnostics, Mannheim) pro 10mL Puffer zugefügt.

### **3.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### **Herstellung von Polyacrylamidgelen und elektrophoretische Trennung**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Größe wird eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zunächst wird das Trenngel gemischt (s.Tabelle). Es werden 4mL des Trenngels zwischen die Glasscheiben der Gießapparatur (mini-Protean® 3 Cell, Biorad, München) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Ablauf von 30 Minuten ist das Trenngel auspolymerisiert und das Isopropanol kann abgegossen werden. Nach mehrmaligem Waschen mit destilliertem Wasser wird das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet (s.Tabelle) und ein Probenkamm wird eingesteckt. Auch das Sammelgel wird 30 Minuten lang zum Auspolymerisieren stehen gelassen. Die zu analysierenden Proben werden mit 4fach konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:4 gemischt und für 5 Minuten bei 99°C inkubiert, in die Kammer überführt und anschließend elektrophoretisch bei 10mA/Gel aufgetrennt. Zur anschließenden Größenabschätzung der Proteine wird ein Größenstandard (peqGold V, peqlab, Erlangen).

## Polyacrylamidgel

|                                  | Trenngel<br>10% | Trenngel<br>8% | Trenngel<br>15% | Sammelgel<br>5% |
|----------------------------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 0,25M Tris-HCl pH 6,8            |                 |                |                 | 0,375 mL        |
| 1,5M Tris-HCl, pH 8,8            | 2,5 mL          | 2,5 mL         | 2,5 mL          |                 |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | 4,8 mL          | 4,6 mL         | 2,3 mL          | 5,85 mL         |
| 10% SDS                          | 0,1 mL          | 0,1 mL         | 0,1 mL          | 0,75 mL         |
| Acrylamid (30%)                  | 3,32 mL         | 2,7 mL         | 5,0 mL          | 1,25 mL         |
| APS                              | 0,1 mL          | 0,1 mL         | 0,1 mL          | 0,02 mL         |
| TEMED                            | 0,01mL          | 0,01 mL        | 0,01 mL         | 0,01 mL         |

## 4-fach Ladepuffer

|                                  | Menge        | Konzentration |
|----------------------------------|--------------|---------------|
| 1M Tris-HCl pH 6,8               | 20 mL        | 200 mM        |
| β-Mercaptoethanol                | 5 mL         | 5 %           |
| SDS                              | 8 g          | 8 %           |
| Bromphenolblau                   | 400 mg       | 0,4 %         |
| Glycerol                         | 40 mL        | 40 %          |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 100<br>mL |               |

## Laufpuffer

|                                  | Menge  | Konzentration |
|----------------------------------|--------|---------------|
| SDS                              | 1 g    | 0,1 %         |
| Tris                             | 3 g    | 25 mM         |
| Glycin                           | 14,5 g | 192 mM        |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 1 L |               |

## **Proteinfärbung mit Coomassieblau**

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen werden die Gele in einer Färbelösung für 20-30 Minuten unter Umschwenken inkubiert und anschließend so lange unter Sicht mit Entfärber (50% Ethanol, 10% Eisessig) inkubiert, bis die Proteinbanden gut erkennbar sind.

---

## Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung und –Entfärbelösung

|                                  | Färbelösung | Entfärber |
|----------------------------------|-------------|-----------|
| Coomassie Brilliant Blau R-250   | 0,2 %       |           |
| Coomassie Brilliant Blau G-250   | 0,05 %      |           |
| Ethanol                          | 47,5 %      | 50 %      |
| Eisessig                         | 10 %        | 10 %      |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | 40 %        | 40 %      |

### **Proteinfärbung mit SyproRuby®**

Zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit dem Lumineszenzfarbstoff SyproRuby® (Invitrogen, Karlsruhe) werden die Gele 20 bis 30 Minuten in Coomassie-Entfärbelösung fixiert und 3 mal 10 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Färbung mit der gebrauchsfertigen SyproRuby®-Lösung erfolgt über Nacht im dunklen. Vor der Visualisierung mit dem Foto-Imager wird das Gel nochmals kurz gewaschen.

### **3.3.4 Western Blot**

#### **Transfer von Proteinen auf Membranen mittels „Semi-Dry“-Verfahren**

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE, erfolgt die Übertragung auf PVDF oder Nitrozellulose-Membranen. Wird eine PVDF-Membran verwendet, muss sie vor dem Proteintransfer im Methanol einige Minuten aktiviert werden. Beim „Semi-Dry“-Verfahren werden zwei mit Transferpuffer (s.Tabelle) getränkte Whatman-Papiere und die Membran unter Vermeidung der Bildung von Luftblasen auf die Anodenplatte gelegt. Anschließend wird das Polyacrylamidgel von den überstehenden Taschen des Sammelgels befreit und auf die Membran gelegt. Auf die Membran werden noch einmal zwei weitere mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Die so präparierte Membran wird mit der Kathodenplatte abgedeckt und die Blotkammer wird an die Stromversorgung angeschlossen. Der Proteintransfer erfolgt bei 1mA/cm<sup>2</sup> für 1 Stunde. Die Membran wird anschließend zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen in TBS-Tween (s.Tabelle) mit 5% Rinderserumalbumin (BSA) für mindestens 1 Stunde oder über Nacht geschwenkt.

---

## Transfer von Proteinen mittels „Tank-Blotting“

Das Prinzip des Proteintransfers mittels Tank-Blotting ist dasselbe wie beim „Semi-Dry“-Verfahren. Die Kunststoffkassette der Blotkammer wird geöffnet und der mit Blotpuffer getränkte Schwamm wird auf die Seite der Anode gelegt (durchsichtiger Kunststoff). Nacheinander folgend werden nun zwei getränkte Whatman-Papiere, die Membran (PVDF oder Nitrozellulose), das Polyacrylamidgel, zwei weitere getränkte Whatman-Papiere und der zweite, mit Blotpuffer getränkte Schwamm luftblasenfrei übereinander geschichtet. Die Kassette wird geschlossen und in die Halterung eingesetzt. Dabei ist zu beachten, dass die Anodenseite der Kassette, der Kathodenseite der Halterung gegenüberliegt. Zuletzt wird die Halterung mit der Blotkassette zusammen mit einem Kühlakku in den Tank eingesetzt und der Tank wird mit Blotpuffer aufgefüllt. Es wird mindestens 1 Stunde bei 25V geblottet. Nach dem Proteintransfer werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran wie bereits beschrieben abgesättigt.

### Tris-gepufferte Salzlösung

|                                  | TBS   | TBS-T  | TBS-T mit BSA |
|----------------------------------|-------|--------|---------------|
| Tris 50mM                        | 6,1 g |        |               |
| NaCl 150mM                       | 9 g   |        |               |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 1L |        |               |
| Tween-20 0,5%                    |       | 500 µL |               |
| BSA 5%                           |       |        | 50 g          |

### Blotpuffer

|                                  | Menge  | Konzentration |
|----------------------------------|--------|---------------|
| Glycin                           | 14,4 g | 192 mM        |
| Tris                             | 3,05 g | 25 mM         |
| Methanol                         | 200 mL | 20 %          |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 1 L |               |

### **Immunodetektion von Proteinen**

Für die Detektion von Proteinen auf einer Membran wird die blockierte Membran mit einem Primärantikörper in TBS-T und 5% BSA 2 Stunden bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Blot 3 mal 5 Minuten in TBS-T gewaschen und mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

### Verwendete Primärantikörper

| Antikörper                 | eingesetzte Verdünnung | Herkunft  | Konzentration | Hersteller       |
|----------------------------|------------------------|-----------|---------------|------------------|
| Anti-von Willebrand-Faktor | 1:4000                 | Kaninchen | 100 µL/mL     | Dako, Hamburg    |
| Anti-Fibronektin           | 1:1000                 | Maus      | 500 µg/mL     | R&D, Wiesbaden   |
| Anti-Thrombospondin-1      | 1:500                  | Maus      | 100 µg/mL     | Abcam, Cambridge |
| Anti-Fibrinogen            | 1:10000                | Ziege     | 10 mg/mL      | Abcam, Cambridge |
| Anti-Vitronectin           | 1:500                  | Ziege     | 500 µg/mL     | R&D, Wiesbaden   |
| Anti-P-Selektin            | 1:1000                 | Schaf     | 500 µg/mL     | R&D, Wiesbaden   |

### **Proteindetektion mittels Farbreaktion**

Die Detektion eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgt über eine Farbreaktion mit 5-Brom-4-Chloro-3'-Indolylphosphat p-Toluidinsalz (BCIP) und 4-Nitrotetrazolium-Chloridblau-Hydrat (NBT). Bei dieser Reaktion hydrolysiert die alkalische Phosphatase zunächst BCIP, das über einen intermediären Zustand dimerisiert und einen Indigo-Farbstoff bildet. Im Gegenzug wird NBT zum farbigen Formazan reduziert. Es werden 9 mL Substratpuffer mit 1 mL NBT-Lösung (100mg/100mL) und 100µL BCIP (50mg/ 10mL) zusammen mit der Membran inkubiert. Die Reaktion wird durch Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> abgestoppt, nachdem eine deutliche Blaufärbung einzelner Banden eintritt. Die Membran wird getrocknet und kann anschließend in Folie eingeschweißt gelagert werden.

### Verwendete Sekundärantikörper

| Antikörper     | eingesetzte Verdünnung | Herkunft  | Konzentration | Hersteller       |
|----------------|------------------------|-----------|---------------|------------------|
| Anti-Ziege     | 1:3000                 | Kaninchen | 1 mg/mL       | Dianova, Hamburg |
| Anti-Schaf     | 1:3000                 | Kaninchen | 1 mg/mL       | Dianova, Hamburg |
| Anti-Maus      | 1:3000                 | Ziege     | 1 mg/mL       | Dianova, Hamburg |
| Anti-Kaninchen | 1:3000                 | Ziege     | 1 mg/mL       | Dianova, Hamburg |

---

## 3.4 Herstellung und Reinigung von EspP $\alpha$

### 3.4.1 Anzucht der Bakterien

Mit einer Impföse entnommene Bakterien werden in 1L LB Medium mit 50 $\mu$ g/mL Kanamycin inokuliert und bei 37°C auf dem Schüttelinkubator bei 180 Umdrehungen pro Minute (Upm) bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 1,5 (9 bis 10 Stunden) angezogen.

### 3.4.2 Aufarbeitung des Bakterienüberstands

Die Bakterienkulturen werden bei 6500g 35 Minuten lang abzentrifugiert. Die EspP- bzw. S263A-enthaltenden Bakterienüberstände werden anschließend steril filtriert. Für die Filtration wird ein Bottle Top-Filter mit einer Porengröße von 0,2 $\mu$ m verwendet (Supor machV, Nalgene, Rochester, USA). Darauf folgend wird der sterile Bakterienüberstand durch eine Ultrafiltrationsmembran (Vivaflow PES 200, Vivascience-Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit einer Ausschlussgrenze bei 50kDa und einer Peristaltikpumpe (Cole Parmer, Vernon Hills, USA) ca. 20-fach aufkonzentriert. Anschließend erfolgt die Fällung der Proteine mittels Ammoniumsulfat. Das Pellet wird in 500 $\mu$ L HEPES-Puffer gelöst und mit Hilfe der Flüssigchromatographie (Äkta Prime FPLC, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) weiter aufgereinigt. Es werden HiTrap Benzamidinsäulen gemäß den Herstellerangaben verwendet (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Die EspP bzw. S263A enthaltenden Fraktionen werden mit Hilfe von Zentrifugenfiltern (10 kDa Vivaspin, Vivascience-Sartorius, Göttingen) gesammelt und aufkonzentriert.

#### HEPES-Puffer

| Konzentration |        |
|---------------|--------|
| HEPES         | 10 mM  |
| NaCl          | 150 mM |
|               | pH 7,4 |

---

### **3.4.3 Aktivitätstest**

Zur Überprüfung der Aktivität von EspP bzw. S263A wird 1 µg des Proteins 15 Stunden bei 37°C mit einer 2mM Lösung des p-Nitroanilin-konjugierten Oligopeptidsubstrats Alanin-Alanin-Prolin-Leucin (Ala-Ala-Pro-Leu-pNA) (Bachem, Weil am Rhein, Deutschland) in HEPES-Puffer (s. oben) inkubiert. Der Inkubationsansatz wird in 96-Well-Mikrotiterplatten überführt und auf ein Gesamtvolumen von 100µL eingestellt. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 405 nm im Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Proben werden bei einer Absorptionsdifferenz von  $\geq 0,03$  als „proteolytisch aktiv“ definiert. Als Kontrollen dienen S263A bzw. HEPES-Puffer.

## **3.5 Hämostaseologische und immunologische Methoden**

### **3.5.1 Gewinnung von humanem Plasma**

Für die Blutabnahme von einem freiwilligen gesunden Spender werden Citratröhrchen zur Antikoagulation verwendet. Anschließend wird das Citratblut (je nach verwendung 5 bis 20 mL) 20 Minuten bei 3000g und 4°C abzentrifugiert und entweder für den direkten Einsatz im Versuch nach entsprechender Verdünnung verwendet, oder bei -20°C eingefroren.

### **3.5.2 Gewinnung von Thrombozyten**

Nach der Blutentnahme (s.o.) wird das Blut mit einem Gesamtvolumen von 15mL (3 mal 5 mL Citratblut) in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und bei 150g 15 Minuten lang bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird die obere Phase in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Es wird 1/10 des Probenvolumens an ACD-Puffer (s.Tabelle) zugefügt und kurz gemischt. Anschließend werden die Thrombozyten 5 Minuten bei 900 g abzentrifugiert und der Überstand, der noch eine signifikante Menge an Thrombozyten enthält, wird eingefroren. Die Thrombozyten werden in 7mL HEPES-Tyrode`s-Puffer resuspendiert (s.Tabelle) und erneut abzentrifugiert. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt werden die Thrombozyten in 2mL HEPES-Tyrode`s-Puffer resuspendiert. Die so isolierten Thrombozyten müssen innerhalb von 2 Stunden verwendet werden.

---

### ACD-Puffer

| Menge                            |           |
|----------------------------------|-----------|
| Tri-Natriumcitrat-Dihydrat       | 2,5 g     |
| Zitronensäure-Anhydrat           | 1,24 g    |
| D-Glucose                        | 1,36 g    |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 100 mL |

### HEPES-Tyrode`s-Puffer

| Menge                            |           |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl                             | 1,95 g    |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 0,252 g   |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,05 g    |
| KCl                              | 0,01 g    |
| MgCl <sub>2</sub>                | 0,023 g   |
| HEPES                            | 0,3 g     |
| Glucose                          | 0,23 g    |
| H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> | ad 250 mL |
| pH 7,4 mit 25% HCl einstellen    |           |

### **3.5.3 Ristocetin-Kofaktor-Test**

Humanes Plasma wird 16 Stunden bei 37°C mit EspP, S 263A und PBS inkubiert. Anschließend werden die Plasmaproben 1:20 verdünnt. Die Proben werden mit Ristocetin und formalin-fixierten Thrombozyten versetzt und turbidometrisch mit Hilfe des BCS XP Analyzer<sup>®</sup> (Siemens, München) analysiert. Diese Analysen wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Münster durchgeführt.

### **3.5.4 vWF-Antigen-Test**

Humanes Plasma wird 16 Stunden bei 37°C mit EspP, S 263A und PBS inkubiert. Anschließend werden die Plasmaproben 1:20 verdünnt. Die Plasmaproben werden mit anti-vWF Antikörpern, die an Polystyrolpartikel gekoppelt sind, versetzt. Durch mechanische Mischung aggregieren die an vWF-gebundenen Antikörper, so dass die

---

Konzentration des vWF turbidimetrisch bestimmt werden kann. Die gemessene Trübung verhält sich direkt proportional zum vWF-Gehalt der Probe.

### **3.5.5 Kollagen-Bindeassay**

Humanes Plasma wird 16 Stunden bei 37°C mit EspP, S263A und PBS inkubiert. Anschließend werden die Plasmaproben 1:20 verdünnt. Aus Plasma aufgereinigter vWF (Loxo, Dossenheim) wird ebenfalls 16 Stunden bei 37°C mit EspP, S263A und PBS inkubiert. Die Proben werden dann mit einem Testkit (Haemochrom, Essen) gemäß Herstellerangaben analysiert. Dabei werden die Proben in unterschiedlichen Verdünnungsstufen in eine Kollagen-beschichtete 96-Well Mikrotiterplatte gefüllt. Es folgt die Inkubation mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen vWF. Nach Zugabe des Substrates kann die Intensität der entstehenden Farbe photometrisch mit dem Mikrotiterplatten-Leser bestimmt und mit dem mitgelieferten Standard verglichen werden.

## **3.6 Flusskammer-Experimente**

### **3.6.1 Aufbau der Flusskammern**

Ein Deckgläschen wird mit handelsüblichem Nagellack auf einem Objektträger fixiert. Die 12" Glaskapillaren (Vitrocom) werden auf 3 cm gekürzt und so auf das festgeklebte Deckgläschen gelegt, dass die Kapillare am vorderen Ende des Deckgläschens übersteht. Das zweite Deckgläschen wird mit Nagellack auf dem ersten festgeklebt und fixiert so die Kapillare. An das nicht überstehende Ende der Kapillare wird ein mit NaCl luftblasenfrei gefüllter PE-Schlauch angeschlossen und mit handelsüblichem Zwei-Komponenten-Kleber fixiert.

### **3.6.2 Beschichten der Kapillaren**

Für die Analyse der Thrombozytenadhäsion bzw. des Rollens von Leukozyten nach Inkubation mit EspP werden die Kapillaren mit unterschiedlichen Proteinen (s. Tabelle) für 2 Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Zur Beschichtung wird die Proteinlösung mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) aufgezogen und an das vordere

---

Ende der Kapillare gehalten. Gleichzeitig wird der mit NaCl gefüllte PE-Schlauch etwas tiefer gehängt, so dass die Proteinlösung in die Kapillare gesaugt werden kann.

| Protein                | Konzentration | Hersteller       |
|------------------------|---------------|------------------|
| von Willebrand-Faktor  | 10 µg/mL      | Loxo, Dossenheim |
| Fibrinogen             | 500 µg/mL     | Loxo, Dossenheim |
| Fibronektin            | 300 µg/mL     | Loxo, Dossenheim |
| Thrombospondin-1       | 10 µg/mL      | Loxo, Dossenheim |
| P-Selektin, Fc-Chimäre | 20 µg/mL      | R&D, Wiesbaden   |
| E-Selektin, Fc Chimäre | 5 µg/mL       | R&D, Wiesbaden   |

### 3.6.3 Blockieren der Kapillare

Nachdem die Kapillare beschichtet wurde, werden unspezifische Bindungen mit Casein in TBS (Blocker<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) für 1 Stunde bei Raumtemperatur blockiert.

### 3.6.4 Inkubation mit EspPα

Nach Blockade der unspezifischen Bindungen erfolgt die Inkubation mit EspP, mit der Negativkontrolle S263A und mit PBS für 16 Stunden bei 37°C. Hierzu werden ca. 5µL EspP in PBS mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) aufgezogen und an das vordere Ende der Kapillare gehalten. Gleichzeitig wird der mit NaCl gefüllte PE-Schlauch etwas tiefer gehängt, so dass die EspP-Lösung in die Kapillare gesaugt werden kann. Mit den Kontrollen mit PBS und S263A wird analog verfahren. Für jede Inkubationsbedingung werden mindestens drei Flusskammern verwendet. Damit die beschichteten Kapillaren nicht austrocknen, werden sie zur Inkubation für 16 Stunden bei 37°C in eine feuchte Kammer gesetzt.

### 3.6.5 Perfusion der Flusskammern mit Vollblut

Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wird einem freiwilligen Spender Blut entnommen und zur Antikoagulation mit Citrat oder Heparin versetzt. Das Antikoagulans wird in der Spritze sorgfältig mit dem Blut gemischt. Die Flusskammern werden auf ein kleines Podest, das sich auf dem Objektisch eines Mikroskops befindet, gesetzt. Die blutgefüllte Spritze wird vorsichtig über die Kapillare gestülpt und der Schlauch am

anderen Ende der Kapillare wird auf einer bestimmten Höhe fixiert. Durch die einwirkende Schwerkraft wird die Flusskammer perfundiert. Die Höhe auf welcher der Schlauch fixiert wird ist so gewählt, dass in der Flusskammer eine Scherspannung von 4-6 dyn herrscht (persönliche Kommunikation mit Dr. Alexander Zarbock, MPI für molekulare Biomedizin, Münster).

### 3.6.6 Visualisierung der Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion

Die Thrombusbildung und das Rollen der Leukozyten werden mit einem Durchlichtmikroskop und einer Digitalkamera (Pixelflight, PCO, Kelheim) dokumentiert. In bestimmten zeitlichen Abständen werden für 20 Sekunden die Thrombusbildung und das Rollen der Leukozyten mit der Software Camware (PCO, Kelheim) aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgt offline mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## 3.7 Zellbiologische Untersuchungen

### Verwendete Medien und Supplemente in der Zellkultur

| Bezeichnung                                      | Hersteller                     | Kennung   |
|--|--------------------------------|-----------|
| RPMI 1640  | Lonza, Köln                    | BE12-167F |
| PBS  | Lonza, Köln                    | EE17-516F |
| Fötales Kälberserum (FCS)                        | Lonza, Köln                    | DE14-801F |
| Nu-Serum™  | Becton                         | 355500    |
| L-Glutamin (100fach)                             | Lonza, Köln                    | BE17-605E |
| Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)<br>(100fach) | Lonza, Köln                    | BE13-114E |
| Vitamin-Mix (100fach)                            | Lonza, Köln                    | US13-607C |
| Trypsin EDTA                                     | PAA, Paschingen,<br>Österreich | L11-004   |
| Trypanblau                                       | Lonza, Köln                    | BE17-711E |

---

### 3.7.1 Verwendete Zelllinie

#### HBMEC

Herkunft: Humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen

Kulturmedium: RPMI 1640, hitzeinaktiviertes NU-Serum™ (10%), hitzeinaktiviertes FCS (10%), L-Glutamin (2mM), Na-Pyruvat (1mM), NEA (1%), Vitamin Mix (1%)

Ablösen der Zellen zur Passage in T75-Zellkulturflaschen (Fläche 75 cm<sup>2</sup>): Zugabe von 3mL Trypsin-EDTA für 5 Minuten bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>

### 3.7.2 Kultivierung der Zellen

HBMEC werden in T75-Zellkulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in supplementiertem RPMI angezüchtet. Eine Subkultivierung wird alle 3-4 Tage durchgeführt. Hierbei wird im ersten Schritt das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen werden mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Die Zellen werden mit Trypsin-EDTA abgelöst (s.o.). Die Reaktion wird durch Zugabe von 4mL, vorgewärmtem, serumhaltigem Kulturmedium gestoppt und die Zellen werden durch mehrmaliges Aufziehen in einer 5 mL-Pipette vereinzelt. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 mL-Spitzbodenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 230g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet wird in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und ein Aliquot in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

### 3.7.3 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wird aus der Einzelzellsuspension (s.o.) ein Aliquot entnommen, im Verhältnis 4:1 mit einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung versetzt und 5 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Während vitale Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und im Durchlichtmikroskop farblos erscheinen, kann der Trypanblau-Farbstoff in tote Zellen eindringen und sie blau färben. Die Gesamt- und Lebendzellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer (pro Großquadrat 1mm<sup>2</sup> und 0,1 mm Kammertiefe, Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen), durch Auszählen von mindestens 4 Großquadraten bestimmt. Die Berechnung der Zellzahlen erfolgt nach folgender

---

Formel: Zellzahl (Zellen/mL) = Anzahl der Zellen/ Großquadrate x 1,25 (Verdünnungsfaktor) x 10<sup>4</sup>.

### **3.7.4 Kryokonservierung von Zelllinien**

Die jeweiligen Zelllinien zur Herstellung von Kryokonserven in Kulturflaschen (150cm<sup>2</sup>) bis zur Ausbildung eines Monolayers kultiviert. Anschließend werden die Zellen in Einzelsuspension gebracht (s.o.) und in zwei 15mL-Spitzbodenröhrchen aufgeteilt. Die Zellen werden 5 Minuten bei 230g zentrifugiert und in einer Mischung aus 7mL Zellkulturmedium, 2mL FCS und 1mL Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert.

Je 1mL dieser Suspension wird in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt und für 24 Stunden bei -70°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgt anschließend im Kryotank.

### **3.7.5 Proliferationsassay**

Die Quantifizierung der Zellproliferation wird mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Assays (Cell, Proliferation Reagent WST-1, Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Test basiert auf der mitochondrialen Umsetzung eines Tetrazoliumsalzes in sein farbiges Formazanprodukt, das anschließend photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 450 nm quantifiziert wird. Alle Schritte werden in 96-Well Platten durchgeführt.

---

## 4. Ergebnisse

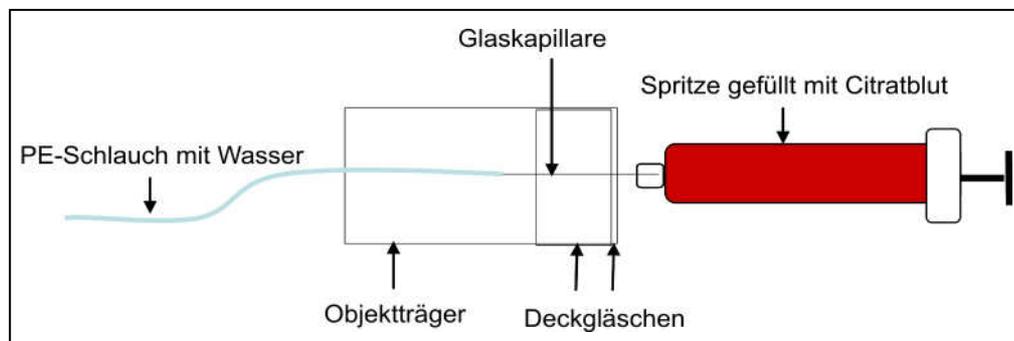
### 4.1 Funktionelle Überprüfung von P-Selektin in der Flusskammer

EspP spaltet P-Selektin mit hoher Substratspezifität bei gleichzeitiger Inaktivität gegenüber E-Selektin und L-Selektin. Diese Spezifität beruht auf funktionell relevanten Änderungen in der Aminosäuresequenz der möglichen Substraterkennungsregion (Brockmeyer, 2009). Bislang fehlten jedoch Daten über die möglichen funktionellen Auswirkungen, so dass dieser Fragestellung im Rahmen der Doktorarbeit nachgegangen wurde.

Eine der Aufgaben von P-Selektin ist die Vermittlung des Rollens von Leukozyten auf aktiviertem Endothel. Mit Hilfe einer Flusskammer kann genau diese Fähigkeit, Leukozyten an Adhäsionsmoleküle zu binden und auf ihnen zu rollen, unter *in vitro* Flussbedingungen untersucht werden. Hierzu werden Glaskapillaren mit den zu untersuchenden Proteinen beschichtet und anschließend mit frischem, heparinisierten Blut perfundiert. Die Blutflussgeschwindigkeit und damit die Scherkraft werden mit dem wassergefüllten PE-Schlauch am anderen Ende der Flusskammer kontrolliert (Abb. 4.1). Mit Hilfe eines Lichtmikroskops und einer Videokamera können die rollenden Leukozyten dokumentiert werden. Eine Kimura-Färbung der rollenden Leukozyten ergab, dass es sich hierbei vorwiegend um neutrophile Granulozyten handelt (persönliche Kommunikation mit Oliver Spelten, MPI Münster). Bei der Auswertung der Videoaufzeichnungen mit Hilfe der Software „ImageJ“ (Abramoff *et al.*, 2004) wird, nachdem rollende Leukozyten über einen Zeitraum von 20 Sekunden gezählt wurden, der „Rolling Flux“ bestimmt. Dieser repräsentiert den Anteil der rollenden Leukozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Leukozyten im Blut in einer Minute.

Bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden Flusskammern mit rekombinantem P-Selektin beschichtet und 16 Stunden bei 37°C mit PBS, der proteolytisch inaktiven EspP $\alpha$ -Mutante S263A und EspP $\alpha$  vor Perfusion der Flusskammer mit Vollblut inkubiert. Die Vorinkubation mit der Pufferkontrolle, bzw. S263A diente der Überprüfung protease-unabhängiger Nebeneffekte auf das Experiment. In weiteren Kontrollversuchen sollte gezeigt werden, dass auch nach Vorinkubation von P-Selektin mit EspP $\alpha$  und den entsprechenden Kontrollen das Rollen der Granulozyten ausschließlich über die Interaktion zwischen P-Selektin und seinem Liganden PSGL-1 erfolgt. Bei diesen Versuchen wurden sowohl blockierende Antikörper bzw. Fc-Fragmente als auch die entsprechenden Isotypkontrollen gegen

beide Proteine eingesetzt. Sowohl das rekombinante P-Selektin als auch das rekombinante E-Selektin bestehen nur aus ihren jeweiligen extrazellulären Domänen und sind mit einem Fc-Tag fusioniert. Da EspPα zwar P-Selektin, jedoch kein E-Selektin spalten kann (Brockmeyer, 2009), wurde zusätzlich das Rollen auf rekombinantem E-Selektin untersucht. Einerseits sollte hiermit eine funktionell relevante Spaltung in der Lektin-Domäne der Selektine ausgeschlossen werden, die möglicherweise bei vorangegangenen Experimenten nicht erkennbar war (Brockmeyer, 2009). Andererseits sollte eine Interaktion von EspP mit dem Fc-Segment der verwendeten Selektin-Chimären ausgeschlossen werden. Da die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist, wurde in weiteren Kontrollversuchen mit EDTA versetztes Vollblut in P- und E-Selektin beschichteten Flusskammern verwendet.



**Abb. 4.1: Schema einer Flusskammer.** Die Flusskammer besteht aus einer Kapillare, die mit Hilfe zweier Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert wird. Die blutgefüllte Spritze wird auf die Kapillare gesteckt. Der Schlauch am Ende der Kapillare ist mit Wasser gefüllt und dient zur Kontrolle der Flussgeschwindigkeit.

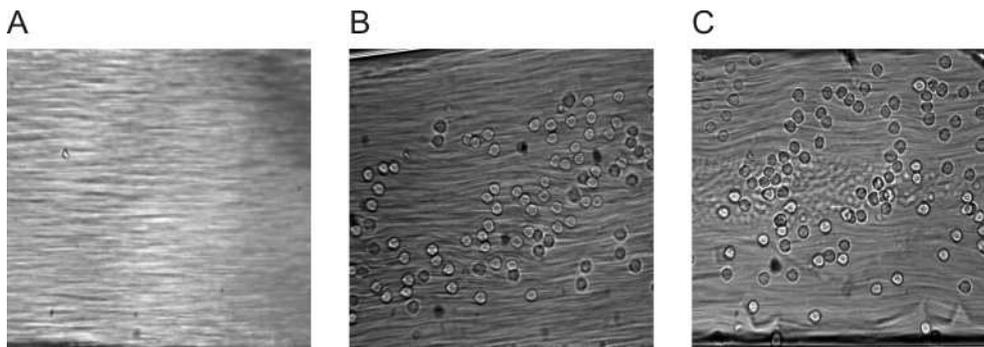
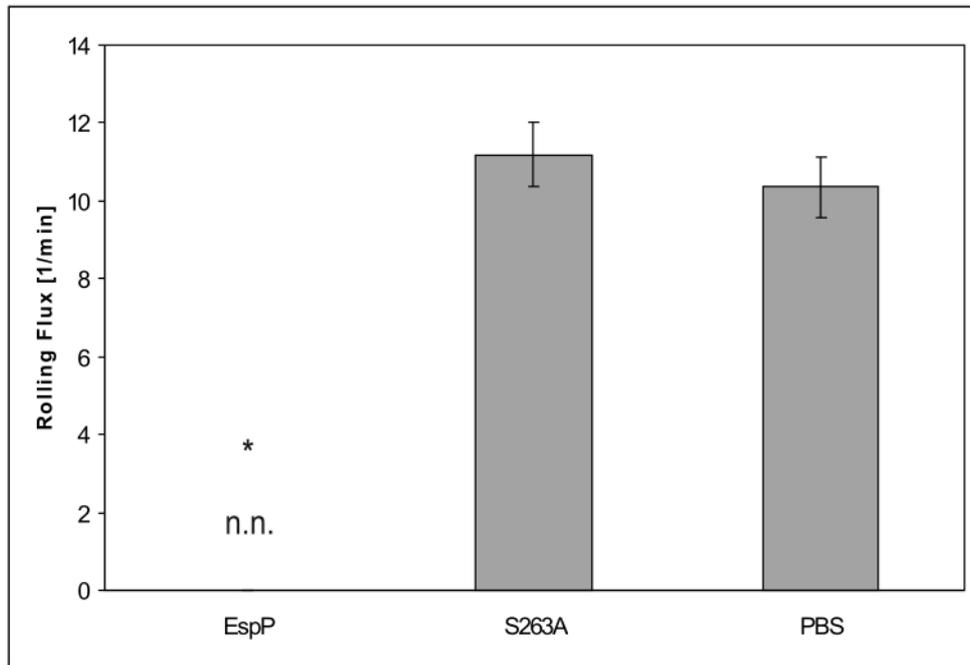
Die Berechnung des „*Rolling Flux*“ und die Videoausschnitte (Abb. 4.2) zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen Leukozyten auf P-Selektin-beschichteten Oberflächen rollen können. Auch die Inkubation mit der Negativkontrolle S263A zeigt, dass keine funktionelle Beeinträchtigung von P-Selektin vorliegt, da für beide Versuchsansätze mit 10,5/min bzw. 11/min ähnliche Werte für den „*Rolling Flux*“ erhalten werden, bzw. auch hier rollende Leukozyten beobachtet werden können. Im Gegensatz dazu sind in Anwesenheit von EspPα keine rollenden Leukozyten nachweisbar, so dass auch kein „*Rolling Flux*“ berechnet werden kann. Die Spaltung von P-Selektin durch EspPα führt offenbar zum Funktionsverlust.

Der Einsatz eines blockierenden anti-P-Selektin Antikörpers führt zu einer vollständigen Blockade des Rollens (Abb. 4.3), so dass auch hier kein „*Rolling Flux*“ berechnet

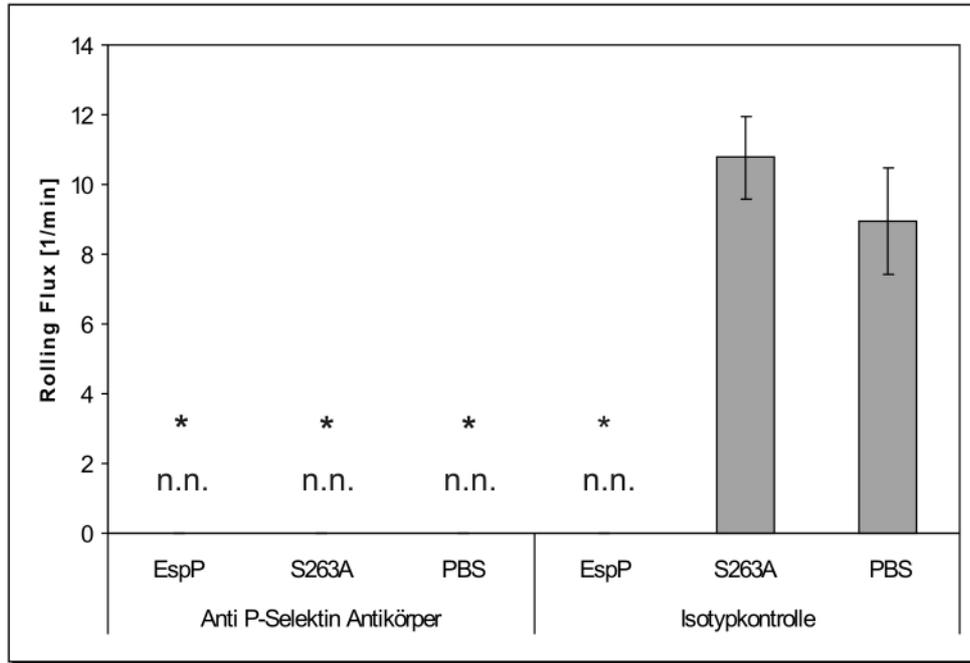
---

werden kann. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit der entsprechenden Isotypkontrolle nicht zu einer Beeinträchtigung des Rollens nach Vorinkubation mit S263A und PBS. Der „*Rolling Flux*“ liegt bei 9 /min bzw. 11/min. Wie erwartet führt die Vorinkubation mit EspP $\alpha$  auch in diesem Kontrollversuch zum Funktionsverlust von P-Selektin. Ähnliche Ergebnisse werden beobachtet, wenn PSGL-1 auf Leukozyten vor Perfusion der Flusskammer mit den entsprechenden PL-1 Fab-Fragmenten blockiert wird (Abb. 4.4). Auch hier zeigt sich nach Inkubation mit der Isotypkontrolle (ebenfalls Fab-Fragmente) ein messbarer „*Rolling Flux*“ nach Vorinkubation mit PBS und S263A (2,8/min bzw. 3/min) und kein Rollen der Granulozyten nach EspP $\alpha$ -Inkubation. Da die Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist, führt die Perfusion der Flusskammer mit EDTA-Blut dazu, dass kein Rollen von Leukozyten statt finden kann (Abb. 4.4.). Die Daten der Kontrolleexperimente zeigen demnach, dass die Vorinkubation mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS zu keiner unspezifischen Beeinträchtigung der Interaktion zwischen P-Selektin und PSGL-1 führt.

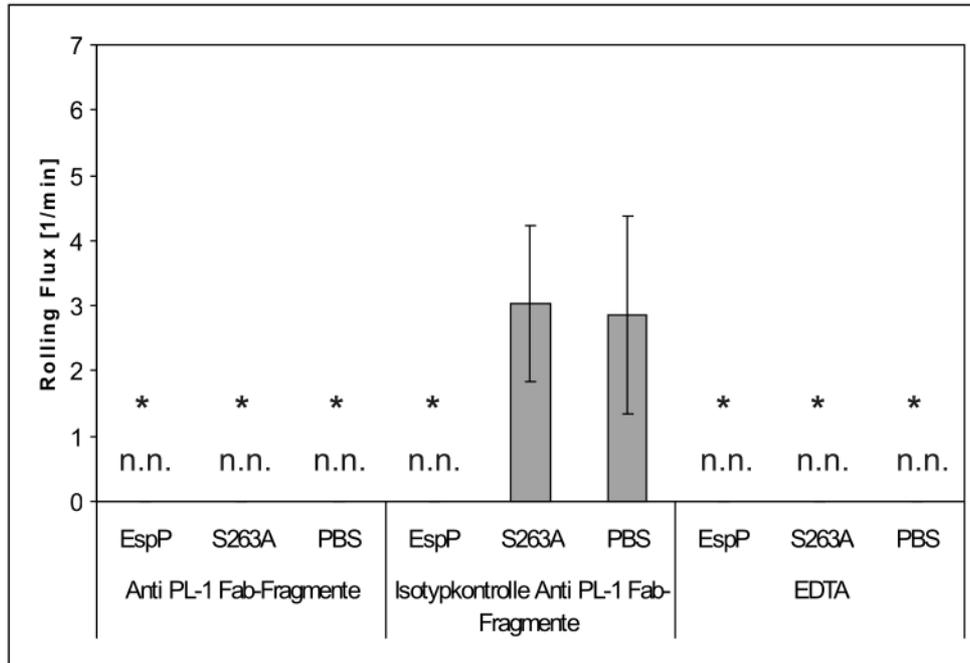
Die hier dargestellten Ergebnisse belegen also eine spezifische Spaltung von P-Selektin durch EspP $\alpha$ . Diese führt zum Funktionsverlust des Zelladhäsionsmoleküls im Hinblick auf das P-Selektin vermittelte Rollen von Leukozyten auf aktiviertem Endothel unter annähernd physiologischen Bedingungen.



**Abb. 4.2:** Oben: „Rolling Flux“ in einer P-Selektin beschichteten Flusskammer nach Vorinkubation mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) des Ergebnisses für den EspP $\alpha$ -Inkubationsansatz im Vergleich zur Puffer- und Negativkontrolle. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Parallelansätzen ausgedrückt. „n.n.“ (nicht nachweisbar) zeigt an, dass keine rollenden Leukozyten nachweisbar waren und dementsprechend kein „Rolling Flux“ berechnet werden konnte. Unten: Videobilder der unterschiedlichen Inkubationsansätze. A: Nach Vorinkubation mit EspP $\alpha$ . B: Nach Vorinkubation mit S263A. C: Nach Vorinkubation mit PBS.



**Abb. 4.3: Kontrolle 1: Blockade von P-Selektin.** P-Selektin beschichtete Flusskammern wurden 16 Stunden mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS vorinkubiert. Vor Perfusion der Flusskammer wurde P-Selektin mit einem Antikörper blockiert, bzw. mit der entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Ergebnisse im Vergleich zu den Isotypkontrollen. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Parallelansätzen angegeben. „n.a.“ (nicht anwendbar) zeigt an, dass keine rollenden Leukozyten auszählbar waren und dementsprechend kein „Rolling Flux“ berechnet werden konnte.

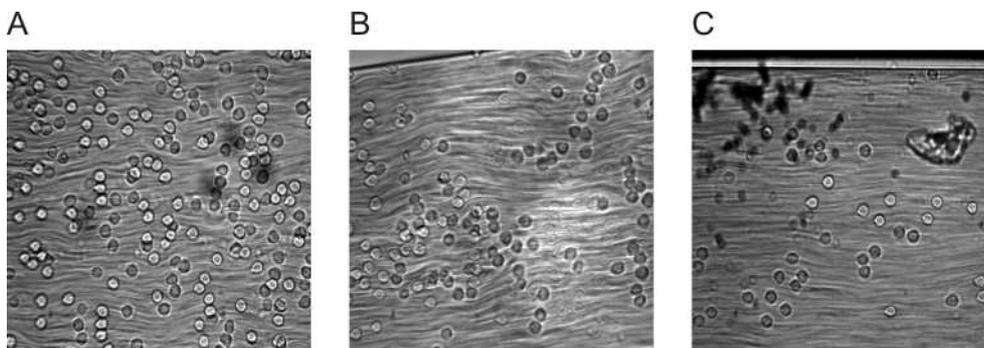
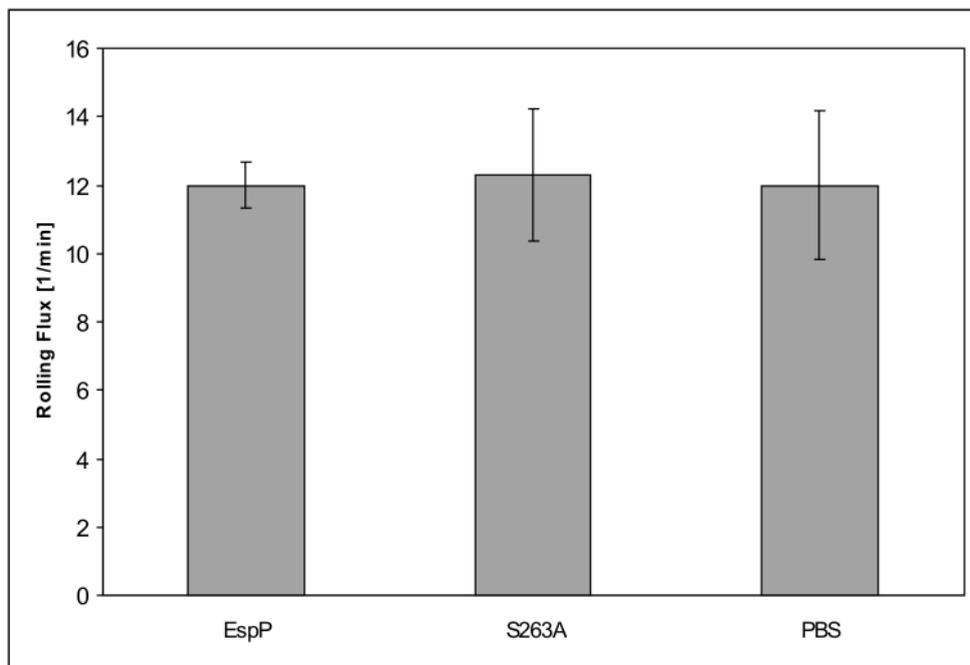


**Abb. 4.4: Kontrolle 2 und 3: Blockade von PSGL-1 und Perfusion der Flusskammer mit EDTA-Blut.**

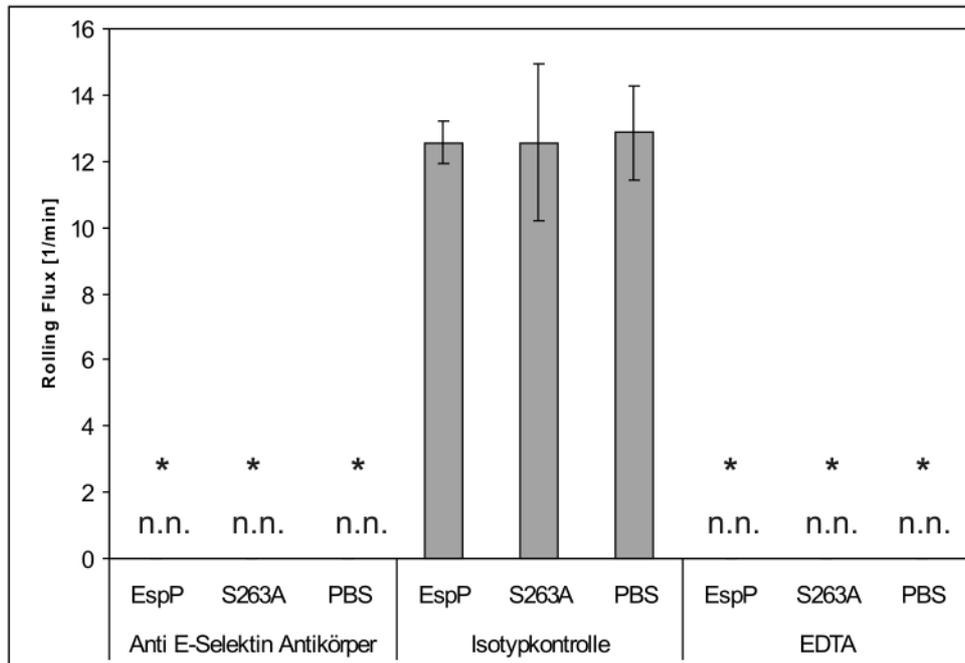
Eine P-Selektin beschichteten Flusskammer wurde 16 Stunden mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS vorinkubiert. Vor Perfusion der Flusskammer wurde das Blut mit PL-1 Fab-Fragmenten zur Blockade des Leukozytenrezeptors PSGL-1, bzw. mit der entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. In einem weiteren Kontrollversuch wurden die vorinkubierten Flusskammern mit EDTA-Blut perfundiert. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Ergebnisse im Vergleich zu den Isotypkontrollen. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Parallelansätzen. „n.n.“ (nicht nachweisbar) zeigt an, dass keine rollenden Leukozyten nachweisbar waren und dementsprechend kein „Rolling Flux“ berechnet werden konnte.

In Abb. 4.5 ist das Rollen von Leukozyten auf E-Selektin nach Vorinkubation mit PBS, S263A und EspP $\alpha$  dargestellt. Im Gegensatz zu den Experimenten mit P-Selektin können hier unter allen drei Bedingungen rollende Leukozyten nachgewiesen werden, somit führt die Inkubation mit EspP $\alpha$  nicht zum Funktionsverlust von E-Selektin. Der „Rolling Flux“ liegt bei ca. 12/min für alle drei Flusskammervarianten. Wie auch bei den Kontrollversuchen für P-Selektin führt die Zugabe eines blockierenden anti E-Selektin Antikörpers zur Verhinderung des Rollens, während die Zugabe der Isotypkontrolle keine Effekt verursacht (Abb. 4.6). Der „Rolling Flux“ liegt zwischen 12/min und 13/min. Von einer Blockade des entsprechenden Rezeptors auf Leukozyten wurde abgesehen, da das Rollen auf E-Selektin über unterschiedliche Leukozytenrezeptoren vermittelt wird. In einem weiteren Kontrollversuch führt die Anwesenheit von EDTA im Blut wie

erwartet dazu, dass das Rollen der Granulozyten auf E-Selektin verhindert wird (Abb. 4.6.). Insgesamt bestätigen die Daten, dass EspP $\alpha$  keinen proteolytischen Effekt auf E-Selektin ausübt und schließen darüber hinaus die Möglichkeit einer Interaktion von EspP $\alpha$  mit dem Fc-Teilbereich der Selektin-Chimären aus. Andernfalls wäre bei diesen Versuchen eine Beeinträchtigung des Rollens auf E-Selektin zu beobachten gewesen.



**Abb. 4.5:** Oben: „Rolling Flux“ in einer E-Selektin beschichteten Flusskammer nach Vorinkubation mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Parallelansätzen ausgedrückt. Unten: Videobilder der unterschiedlichen Inkubationsansätze. A: Nach Vorinkubation mit EspP $\alpha$ . B: Nach Vorinkubation mit S263A. C: Nach Vorinkubation mit PBS.



**Abb. 4.6: Kontrolle 1 und 2: Blockade von E-Selektin und Perfusion der Flusskammer mit EDTA-Blut.** Eine E-Selektin beschichteten Flusskammer wurde 16 Stunden mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS vorinkubiert. Vor Perfusion der Flusskammer wurde E-Selektin mit einem Antikörper blockiert, bzw. mit der entsprechenden Isotypkontrolle inkubiert. In einem weiteren Kontrollversuch wurden die vorinkubierten Flusskammern mit EDTA-Blut perfundiert. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Ergebnisse im Vergleich zu den Isotypkontrollen. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Parallelansätzen. „n.n.“ (nicht nachweisbar) zeigt an, dass keine rollenden Leukozyten nachweisbar waren und dementsprechend kein „Rolling Flux“ berechnet werden konnte.

## 4.2 Untersuchung von Proteinen der Hämostase als Substrate für EspP $\alpha$

Bisher wurden Faktor V, P-Selektin und von Willebrand-Faktor als Substrate für EspP $\alpha$  identifiziert. Da alle Proteine eine Rolle in der Hämostase und bei Entzündungsreaktionen spielen und sich darüber hinaus dasselbe Speicherkompartiment, die  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten, teilen, wurden weitere Proteine dieses Speicherkompartiments als mögliche EspP-Substrate untersucht. Die untersuchten Proteine kommen allerdings nicht ausschließlich in diesem Kompartiment vor, sondern sind beispielsweise auch im Blutplasma vorhanden.

---

#### 4.2.1 SDS-PAGE von gereinigtem vWF nach Inkubation mit EspP $\alpha$

Von Willebrand-Faktor ist ein Glykoprotein und bildet Multimere von bis zu 20 MDa Größe. Das einzelne Monomer hat eine Größe von ca. 250 kDa. Das Protein ist zentral an der Adhäsion von Plättchen an verletztes Endothel und der Thrombozytenaggregation unter Scherstress beteiligt (Reininger, 2008).

Aus humanem Plasma gereinigter vWF (kommerziell erworben) wurde mit PBS und nach Zugabe von EspP $\alpha$  und der Negativkontrolle S263A 16h bei 37°C inkubiert (Abb. 4.9). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt, zur Größenkontrolle von EspP $\alpha$  und S263A wurden beide Proteine zusätzlich isoliert aufgetragen (Bahn 5 und 6). Die zu erwartende Größe des vWF im SDS-Gel liegt bei 250 kDa (Bahn 2), die von EspP $\alpha$  bei ca. 90 kDa und die von S263A bei ca. 104 kDa.

Für den unbehandelten vWF sind im Gel 2 Banden mit einer Größe von ca. 250 und 240 kDa erkennbar (Bahn 1). Das Auftreten von zwei verschiedenen großen Banden ist möglicherweise das Resultat einer unterschiedlichen Glykosylierung von vWF. Durch Inkubation mit der proteolytisch inaktiven Mutante bleibt das Bandenmuster von vWF unverändert (Bahn 2). Die Bande bei 104 kDa entspricht der Negativkontrolle S263A. Durch die Inkubation mit EspP $\alpha$  verschwinden die ursprünglichen vWF-Banden und mehrere Abbruchbanden bei ca. 230 kDa, 205 kDa, 170 kDa und 110 kDa entstehen, so dass von einer Spaltung von vWF in mehreren, unterschiedlichen Bereichen Proteins ausgegangen werden kann (Bahn 3). Die Bande bei ca. 90 kDa entspricht EspP $\alpha$ . Obwohl S263A und EspP $\alpha$  bis auf einen Aminosäureaustausch identisch sind, zeigt sich bei beiden Proteinen ein deutlicher Größenunterschied (Bahn 4 und 5). Dieser resultiert aus der autoproteolytischen Spaltung innerhalb des C-Terminus von EspP $\alpha$ , bei der ein 18 kDa großes Abbruchfragment von EspP $\alpha$  entsteht (Brockmeyer, 2009). Die Autoproteolyse von EspP $\alpha$  führt nicht zu einer Inaktivierung der Protease (Daten nicht gezeigt).

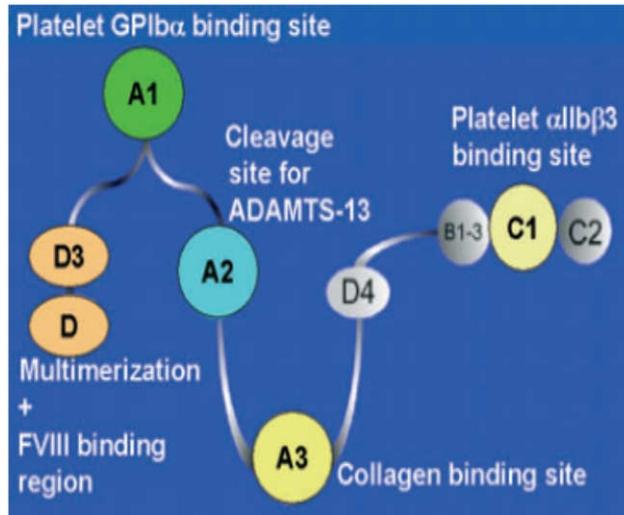


Abb. 4.7.: Schema einer VWF-Untereinheit mit den zugehörigen Bindungs- und Spaltstellen (Abbildung modifiziert nach Reininger, 2008).

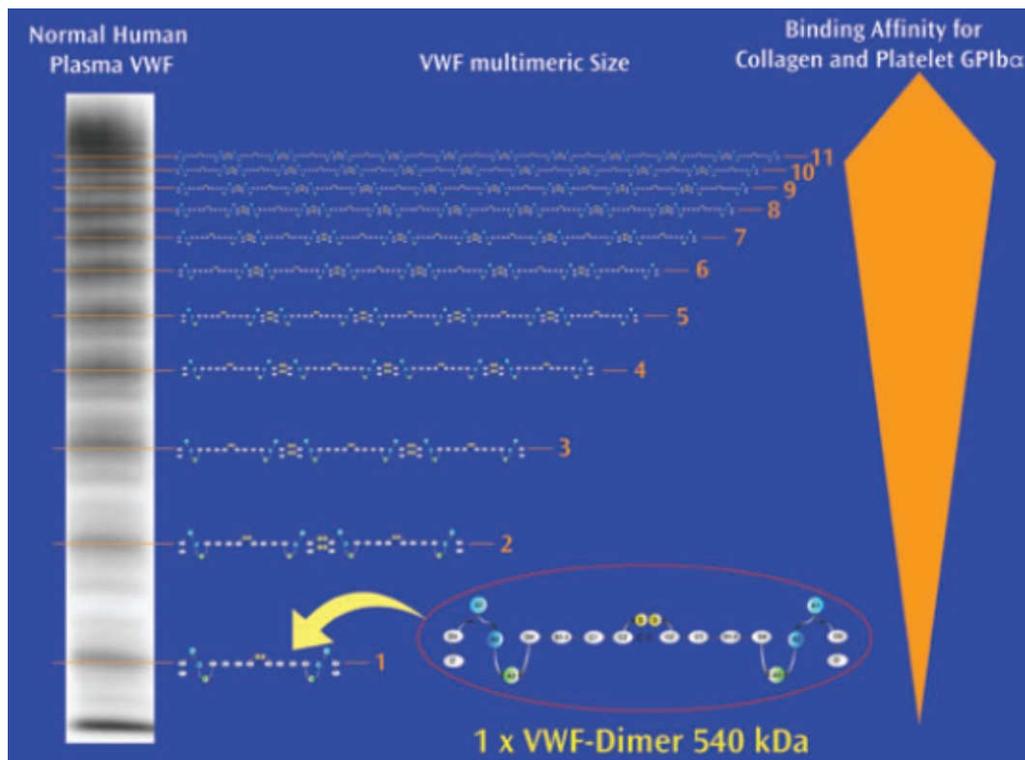
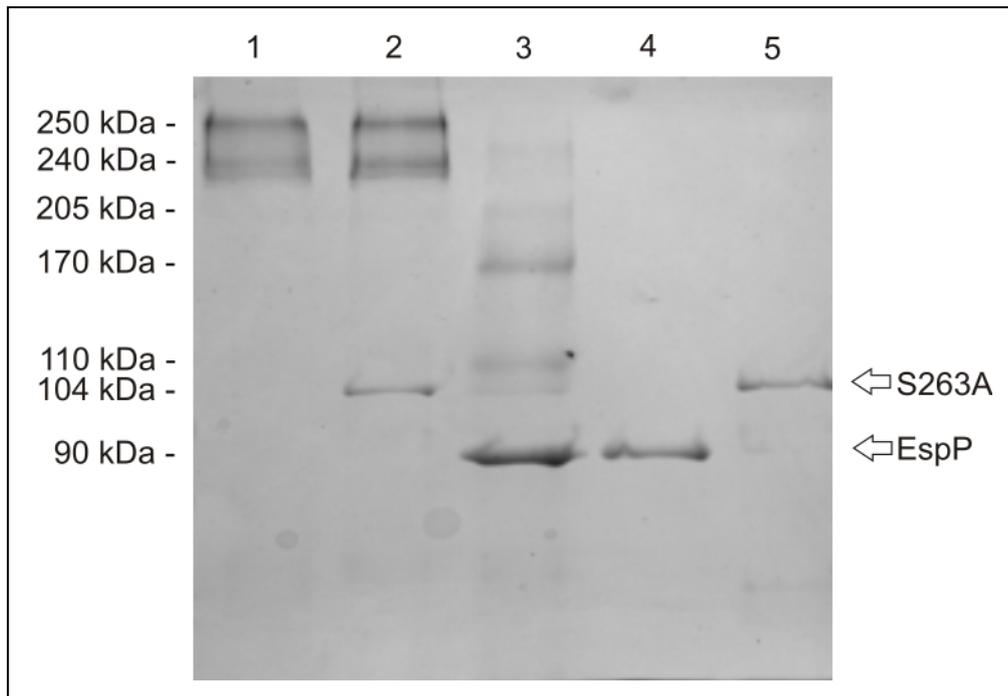


Abb. 4.8.: Elektrophoretisch getrennte vWF- Multimere unterschiedlicher Größe. Die Bindungsaffinität an GPIIb/IIIa ist abhängig von der Größe des Multimers (Abbildung modifiziert nach Reininger, 2008)



**Abb. 4.9: SDS-PAGE von unbehandeltem vWF und vWF in Anwesenheit von S263A und EspPα nach 16h Inkubation bei 37°C.** Bahn 1: vWF + PBS, Bahn 2: vWF + S263A, Bahn 3: vWF + EspPα, Bahn 4: EspPα, Bahn 5: S263A. Die Pfeile markieren die Banden von EspPα und S263A.

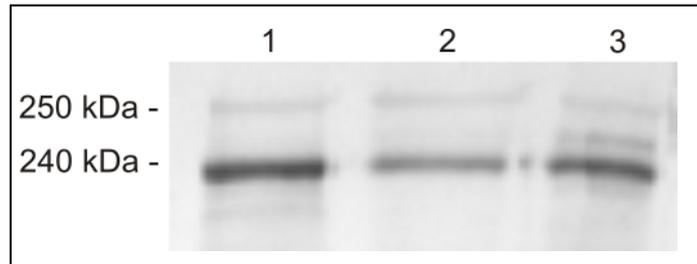
#### 4.2.2 Western Blot von humanem Plasma nach EspPα Inkubation

In einem weiteren Experiment sollte untersucht werden, ob vWF auch in weitgehend physiologischer Umgebung durch EspPα gespalten werden kann. Hierzu wurde humanes Plasma unbehandelt, bis auf die Zugabe von PBS (s.o.) und in Anwesenheit von EspPα bzw. der Negativkontrolle S263A, 16 Stunden bei 37°C inkubiert (Abb. 4.10). Der Ansatz mit PBS diente zusätzlich zur Kontrolle eines möglichen Einflusses von weiteren, im Plasma enthaltenen Faktoren während der Inkubation und wurde auch in den folgenden Inkubationsansätzen verwendet. Die Proteintrennung und Detektion erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot. Die vWF-Bande wurde mit Hilfe eines polyklonalen anti-vWF-Antikörpers und einem alkalische Phosphatase-konjugierten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP detektiert.

In Abb. 4.10 erkennt man die bereits beschriebene Doppelbande des vWF (s.o.) in der unbehandelten Probe (Bahn 1). Auch hier erfolgt keine Änderung im Bandenmuster durch S263A (Bahn 2). In Anwesenheit der aktiven Protease EspPα detektiert der

---

Antikörper jedoch eine zusätzliche Bande zwischen den beiden ursprünglichen vWF-Banden bei ca. 230 kDa. Das Ergebnis zeigt, dass vWF auch im Plasma durch EspP $\alpha$  gespalten werden kann. Allerdings liegt hier keine vollständige Spaltung vor, wie anhand der 250 kDa-Bande des ungespaltenen Proteins erkannt werden kann.



**Abb. 4.10: Western Blot von humanem Plasma.** Humanes Plasma wurde bei 37°C 16h in Anwesenheit von PBS, EspP $\alpha$  und S263A inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE getrennt und auf Nitrocellulose geblotet. Der Western Blot wurde mit einem polyklonalen anti-vWF-Antikörper und colorimetrisch entwickelt. Bahn 1: Plasma + PBS, Bahn 2: Plasma + S263A, Bahn 3: Plasma + EspP $\alpha$ .

#### 4.2.3 Überprüfung der Funktion von vWF nach Inkubation mit EspP $\alpha$

Um zu analysieren, ob die Spaltung von vWF zu funktionalen Defiziten führt, wurden zunächst Standardmethoden verwendet, die zur Diagnostik vWF-abhängiger Gerinnungsstörungen (von Willebrand-Jürgens-Syndrom) bei Patienten eingesetzt werden. Die verwendeten Tests sind der vWF-Antigentest, der Ristocetin-Kofaktor-Test und der Kollagen- Bindungsassay. Als Bezugsgröße wurde bei diesen Experimenten allerdings nicht der Durchschnittswert eines gesunden Patientenkollektivs gewählt, sondern mit PBS inkubiertes Plasma. So sollten Effekte der gewählten Versuchsbedingungen erfasst werden.

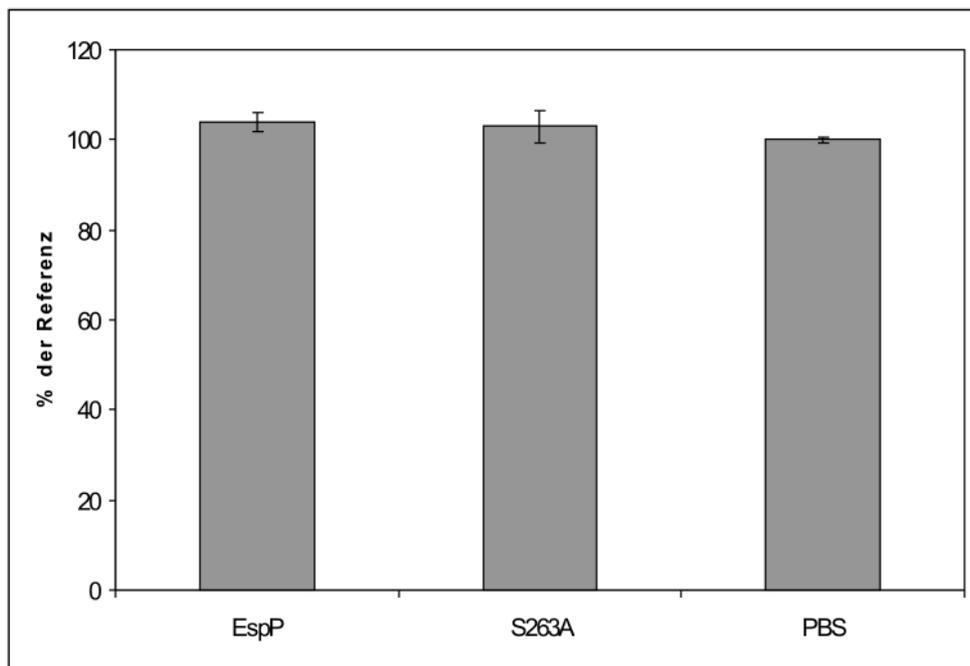
#### 4.2.4 vWF-Antigentest

Durch den vWF-Antigentest wurde die Konzentration des von Willebrand-Faktors in humanem Plasma bestimmt (Abb. 4.11). Durch den Einsatz von anti-vWF Antikörpern, die an Polystyrolpartikel gekoppelt sind und durch mechanische Mischung aggregieren, wurde die Konzentration des vWF turbidimetrisch bestimmt. Die gemessene Trübung verhält sich direkt proportional zum vWF-Gehalt der Probe (Ramshorn 2004). vWF wurde zunächst als „vWF assoziiertes Antigen“ identifiziert, so dass die Bezeichnung auch heute noch für vWF verwendet wird. Die Versuchsergebnisse sind als

---

prozentualer Anteil eines Referenzwertes ausgedrückt. Als Referenz wurde die vWF-Konzentration des mit PBS inkubierten Plasmas verwendet (s.u.).

Für die Analyse wurde humanes Plasma mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS (s.o.) 16h bei 37°C inkubiert. Wie Abb. 4.11 verdeutlicht, besteht bei den Proben kein signifikanter Unterschied in der vWF-Konzentration, so dass quantitative Effekte, die einen möglichen funktionalen Defekt überlagern könnten, auszuschließen sind (ANOVA, Post-Hoc-Analyse; Dunnett's Test; 95% Konfidenzintervall).



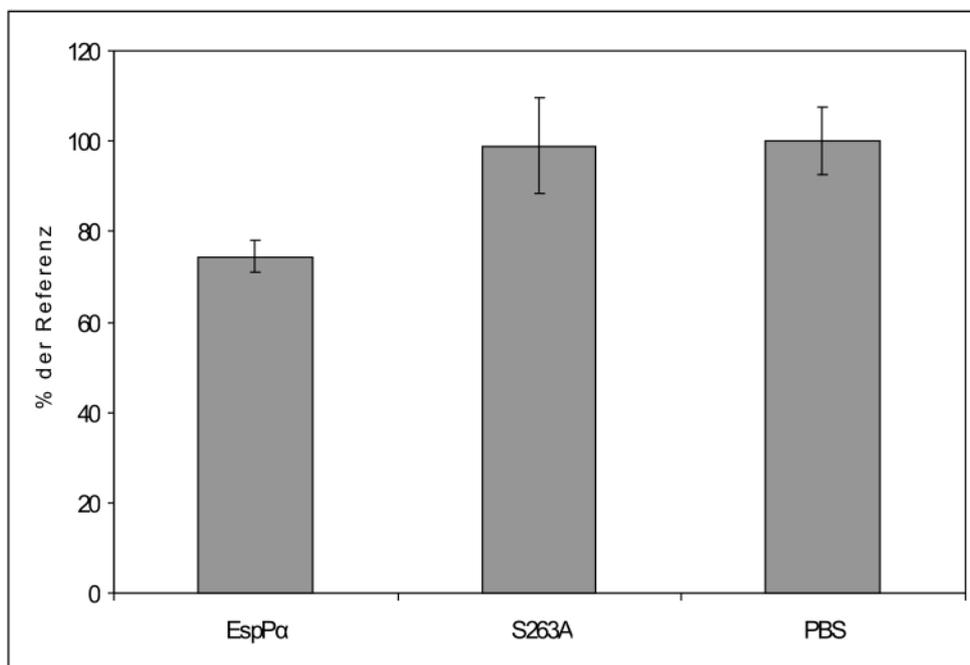
**Abb. 4.11: vWF-Antigen-Test zur quantitativen Bestimmung von vWF.** Humanes Plasma wurde mit EspP $\alpha$  und S263A 16h inkubiert. Die Referenz besteht aus Plasma in Anwesenheit von PBS und wurde ebenfalls 16h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem BCS XP Analyzer® von Behring.

#### 4.2.5 Ristocetin-Kofaktor-Test

Beim Ristocetin-Kofaktor-Test verursacht vWF in Anwesenheit des Antibiotikums Ristocetin die Agglutination von formalin-fixierten Plättchen indem es die Bindung zwischen dem Thrombozytenrezeptor GPIb und vWF vermittelt (Abb. 4.12) (Ruggeri, 2003). Es wird angenommen, dass im Besonderen die hochmolekularen Multimere des vWF diese Bindung vermitteln (Rodeghiero und Castaman, 1990). Die Messung erfolgt auch bei diesem Test turbidimetrisch.

---

Für die Analyse wurden dieselben Proben und dieselbe Referenz wie für den vWF-Antigen-Test eingesetzt. Die Ergebnisse des Ristocetin-Kofaktor-Tests zeigen eine signifikante Verringerung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit in Anwesenheit des mit EspP $\alpha$  inkubierten vWF auf 80% (ANOVA, Post-Hoc-Analyse; Dunnett`s Test; 95% Konfidenzintervall). Da der Kontrollansatz mit der proteolytisch inaktiven Mutante S263A keine signifikante Änderung aufweist (100%), zeigen diese Daten, dass die Spaltung von vWF zu einer Beeinträchtigung der Interaktionsfähigkeit mit Thrombozyten führt. Möglicherweise erfolgt eine Spaltung in der A1-Domäne des Proteins, innerhalb der die Bindung des Thrombozytenrezeptors GPIIb erfolgt.



**Abb. 4.12: Ristocetin-Kofaktor-Test zur Bestimmung der Plättchenaggregationsfähigkeit.** Humanes Plasma wurde mit EspP $\alpha$  und S263A 16h inkubiert. Die Referenz besteht aus Plasma in Anwesenheit von PBS und wurde ebenfalls 16h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der Proben erfolgte mit dem BCS XP Analyzer® von Behring. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) des Ergebnisses für den EspP $\alpha$ -Inkubationsansatz im Vergleich zur Negativkontrolle. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten ausgedrückt.

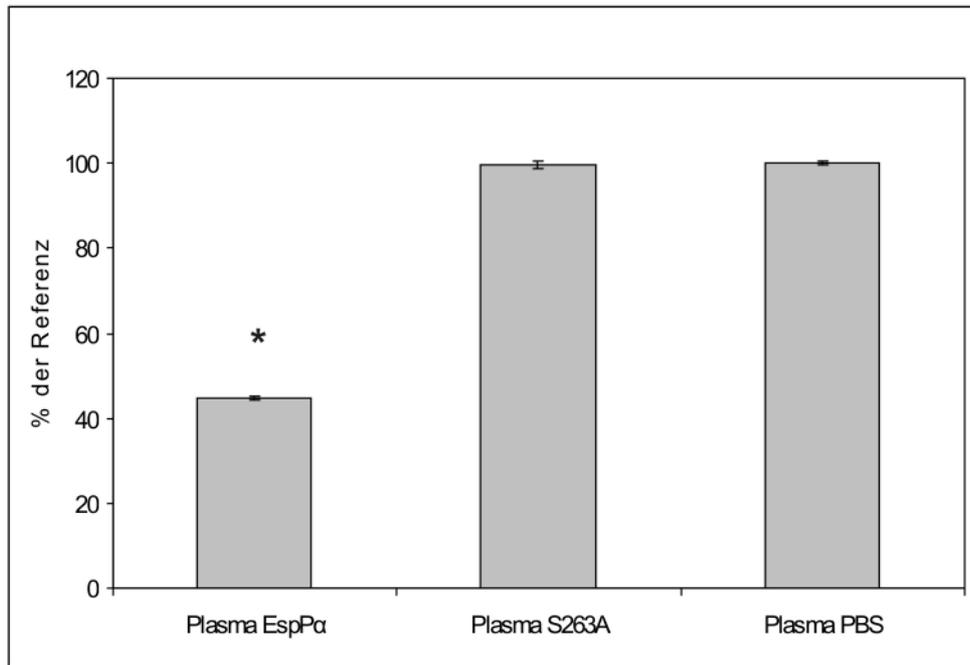
---

#### 4.2.6 Kollagen-Bindungsassay

Der Kollagen-Bindeassay basiert auf einem ELISA-Verfahren und wird zusammen mit weiteren Testverfahren, wie z.B dem Ristocetin-Kofaktor-Test (s.o.), zur Bestimmung der vWF-Funktion in Humanplasma eingesetzt. Die Bindung von vWF an Kollagen ist von zentraler Bedeutung bei der Adhäsion von Thrombozyten an die geschädigte Gefäßwand. Bei diesem Prozess nehmen insbesondere die hochmolekularen vWF-Multimere die Vermittlerrolle der Bindung zwischen Kollagen und dem Glykoproteinrezeptor GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche ein (Reininger, 2008).

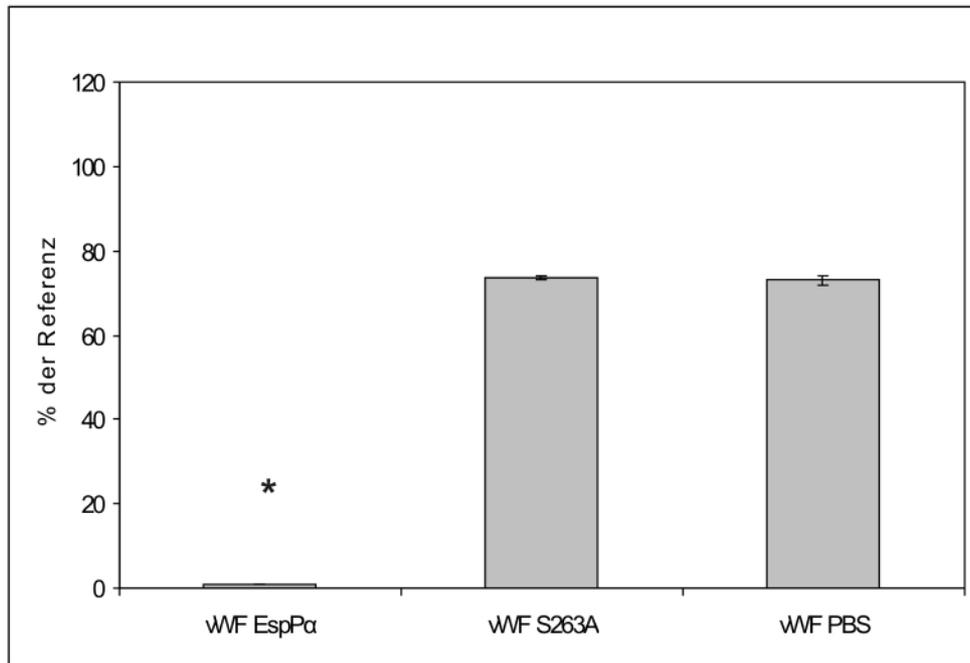
Für die Analyse wurden dieselben Proben und dieselbe Referenz wie für den vWF-Antigen-Test und den Ristocetin-Kofaktor-Test eingesetzt. Der verwendete Antikörper bindet nach Angaben des Herstellers (Life Therapeutics, Frenchs Forest, Australien) an den vWF-Kollagen-Komplex. Die Auswertung erfolgte analog zum vWF-Antigen-Test und zum Ristocetin-Kofaktor-Test. Darüber hinaus wurde der Test mit gereinigtem vWF durchgeführt. Analog wurde der gereinigte vWF mit EspPα und S263A versetzt und 16h bei 37°C inkubiert. Als Referenz diente gereinigter vWF mit PBS, der ebenfalls 16h bei 37°C inkubiert wurde.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass die Kollagenbindungsaktivität des vWF in Anwesenheit der Negativkontrolle unbeeinflusst ist (Abb. 4.13). In Anwesenheit von EspPα wird die Aktivität jedoch signifikant auf 40% reduziert (ANOVA, Post-Hoc-Analyse; Dunnett's Test; 95% Konfidenzintervall). Dieses Ergebnis zeigt, dass EspPα die Kollagenbindungsfähigkeit von vWF beeinträchtigt. Naheliegender ist eine Spaltung innerhalb der A3-Domäne des vWF-Faktors, da diese Region für die Bindung an Kollagen verantwortlich ist. Darüber zeigt dieses Experiment, dass EspPα offenbar Einfluss auf den Multimerisierungsgrad des vWF nimmt, da insbesondere die hochmolekularen Multimere die Kollagenbindung vermitteln.



**Abb. 4.13: Kollagen-Bindeassay zur Bestimmung der Bindung von vWF aus Humanplasma an Kollagen.** Humanes Plasma wurde mit EspPα und S263A 16h inkubiert. Die Referenz besteht aus Plasma in Anwesenheit von PBS und wurde ebenfalls 16h bei 37°C inkubiert. \* markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) des Ergebnisses für den EspPα-Inkubationsansatz im Vergleich zur Negativkontrolle. Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei Experimenten ausgedrückt.

Abb. 4.14 zeigt die Ergebnisse für den Versuchsansatz mit gereinigtem vWF. Der Effekt ist im Vergleich zum Versuchsansatz mit Plasma hier noch wesentlich deutlicher (Test auf Signifikanz mittels ANOVA, Post-Hoc-Analyse; Dunnett's Test; 95% Konfidenzintervall). Nach Inkubation von vWF mit EspPα kann dieser überhaupt nicht mehr an Kollagen binden, die Aktivität liegt bei 0%. Auch hier liegt keine Beeinträchtigung der Bindung an Kollagen nach Inkubation mit der Negativkontrolle vor, die Aktivität liegt bei nahezu 100%. Eine mögliche Ursache für den deutlich stärkeren Aktivitätsverlust bei diesem Versuchsansatz im Gegensatz zu dem mit humanem Plasma ist die Anwesenheit weiterer Faktoren im Plasma wie z.B. Serpine (*serine protease inhibitors*), welche die Aktivität von Serinproteasen hemmen können (Law *et al.*, 2006).



**Abb. 4.14: Kollagen-Bindeassay zur Bestimmung der Bindung von gereinigtem vWF an Kollagen.** vWF wurde mit EspPα und S263A 16h inkubiert. Die Referenz besteht aus vWF in Anwesenheit von PBS und wurde ebenfalls 16h bei 37°C inkubiert. \* markiert einen signifikanten Unterschied des Ergebnisses für den EspPα-Inkubationsansatz im Vergleich zur Negativkontrolle. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung von drei Experimenten ausgedrückt.

#### 4.2.7 Überprüfung der Funktion von vWF anhand eines Flusskammer-Modellsystems

Die Fähigkeit von vWF unter Scherstress Thrombozyten aus humanem Blut zu adhären wurde unter *in vitro*-Flussbedingungen untersucht. Zu diesem Zweck wurde das bereits für P-Selektin beschriebene Flusskammersystem verwendet. Im Unterschied zum Flusskammersystem mit P-Selektin wurde bei diesen Experimenten Citrat statt Heparin als Anticoagulans verwendet, da Heparin die Interaktion zwischen vWF und Thrombozyten inhibiert (Ya-Ping et al., 1996). Die Adhäsion der Thrombozyten wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten lichtmikroskopisch gemessen. Nach 1, 3 und 5 Minuten wurden Zeitintervalle der Thrombozytenadhäsion von 20 Sekunden Länge mit einer Videokamera dokumentiert (Abb. 4.15 bis Abb. 4.17). Eine Glaskapillare wurde mit vWF beschichtet und 16h mit EspPα und den Kontrollen S263A und PBS inkubiert.

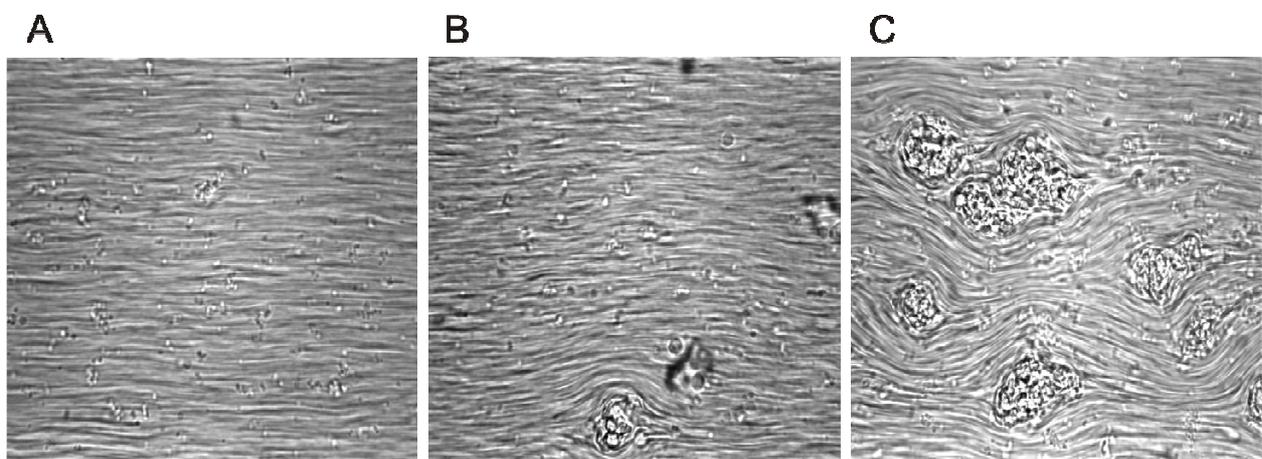
---

Um auszuschließen, dass Thrombozyten unspezifisch an die Kapillare binden, wurde eine unbeschichtete Kapillare eingesetzt. Es zeigte sich bei dieser Kontrolle keine unspezifische Bindung der Thrombozyten an die Glaskapillare (Daten nicht gezeigt).

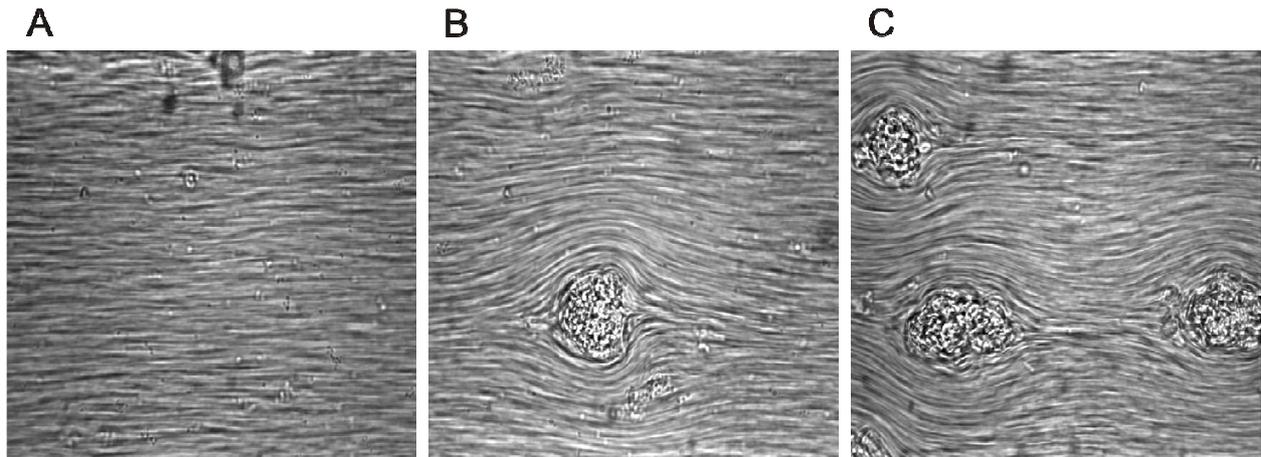
Abb. 4.15 zeigt die Thrombusbildung nach PBS-Inkubation. Bereits nach 1 Minute sind viele einzelne Thrombozyten aus dem Blutstrom abgefangen worden und haben an die mit vWF beschichtete Kapillare adhärirt. Im weiteren Zeitverlauf erkennt man nach 3 und 5 Minuten eine Größenzunahme der Thrombozytenaggregate. Die Inkubation mit S263A

Abb. 4.16) zeigt keinen negativen Einfluss auf die Aggregatbildung der Thrombozyten. Auch hier ist nach einer Minute das Anheften einzelner Thrombozyten erkennbar, welche nach 3 Minuten bereits große Aggregate bilden. Nach 5 Minuten haben sich in der Flusskammer mehrere große Thromben gebildet.

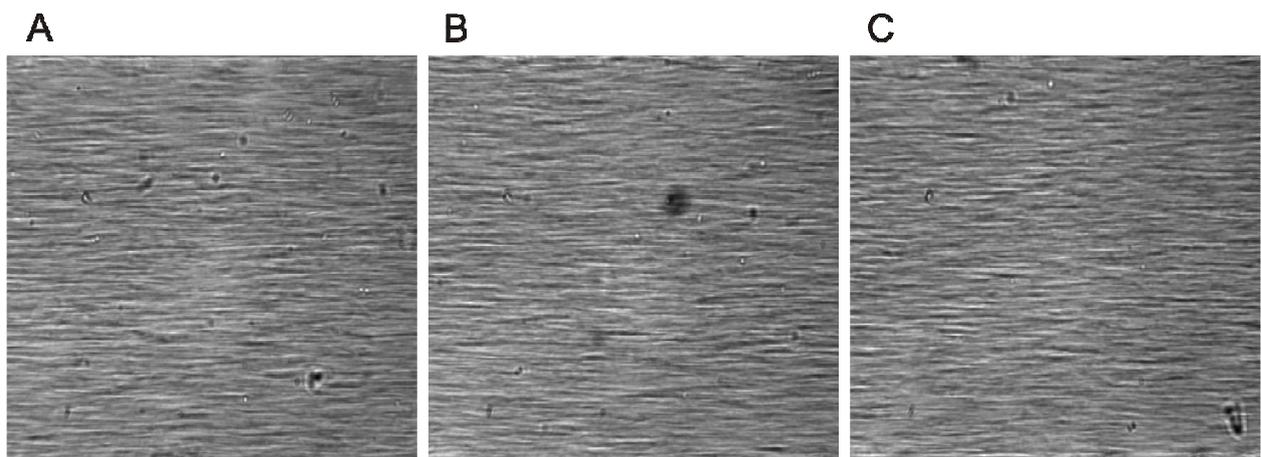
Im Gegensatz dazu ist nach der Inkubation von vWF mit EspP $\alpha$  in der Flusskammer keine Thrombozytenaggregat-Bildung mehr möglich (Abb. 4.17). Zwar werden vereinzelt Thrombozyten aus dem Blutstrom abgefangen, jedoch können diese nicht fest an die Kapillare binden und auch keine größeren Thromben bilden. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass die Funktion der Thrombozytenrekrutierung durch vWF nach einer Interaktion mit EspP $\alpha$  nahezu vollständig verloren geht.



**Abb. 4.15: vWF-beschichtete Flusskammer inkubiert mit PBS.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.16: vWF-beschichtete Flusskammer inkubiert mit S263A.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.17: vWF-beschichtete Flusskammer inkubiert mit EspPa.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.

### 4.3 Interaktion von Fibronektin mit EspPa

Fibronektin (FN) ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 220 kDa, wird wie auch vWF von aktivierten Thrombozyten aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzt und ist für die Adhäsion von Plättchen an geschädigtes Endothel relevant (Cho und Mosher, 2006). Darüber hinaus ist Fibronektin wichtig für die Stabilisierung von Plättchenaggregaten. Es

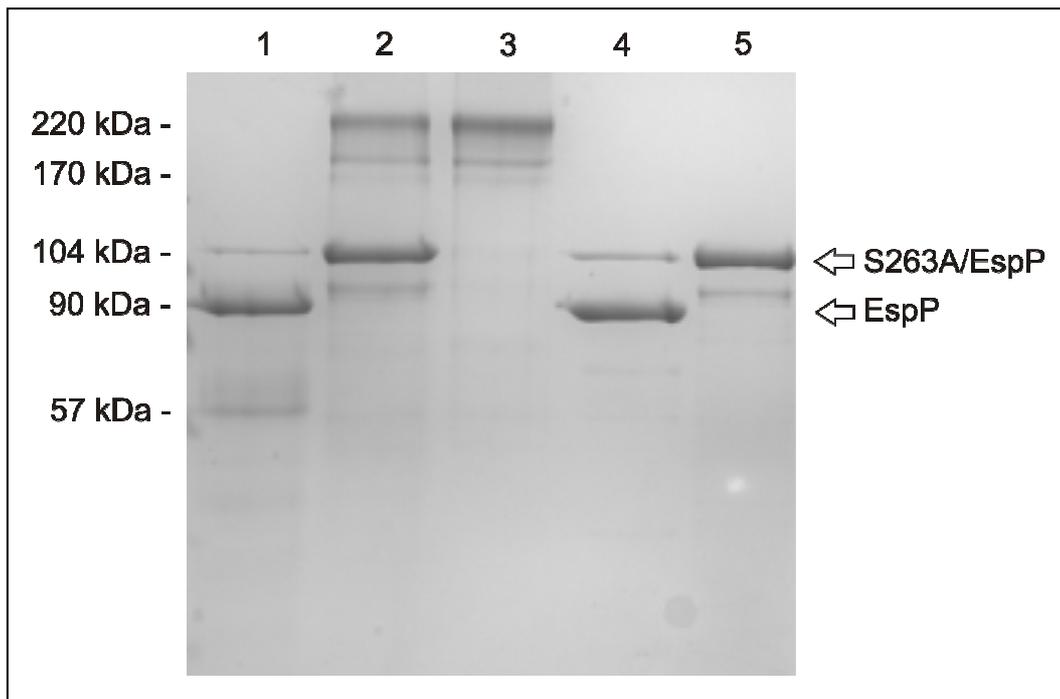
---

existieren drei homologe Formen des Proteins mit alternativen Spleißregionen (Cho und Mosher, 2006).

#### **4.3.1 SDS-PAGE von gereinigtem Fibronectin nach EspP $\alpha$ -Inkubation**

Gereinigtes Fibronectin wurde mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS 16h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurden S263A und EspP $\alpha$  als Größenkontrollen mitgeführt. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.18).

Das gereinigte Protein stellt sich in zwei Banden mit einer Größe von 220 und 180 kDa dar (Bahn 3). Nach Inkubation mit S263A (Bahn 2) zeigt sich keine Veränderung im Bandenmuster, die zusätzliche Bande bei 104 kDa entspricht S263A. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit EspP $\alpha$  zur Spaltung von Fibronectin. Die ursprünglichen Banden fehlen vollständig, stattdessen ist eine schwache Bande bei 57 kDa sichtbar. Bei 104 kDa und 90 kDa liegen die Banden von EspP $\alpha$  und die Abbruchbande der Protease. In diesem Zusammenhang fällt auf, dass auf Bahn 2 bzw. Bahn 5 eine weitere Bande unterhalb von S263A auftaucht. Da allerdings ein Aktivitätstest mit der verwendeten Charge von S263A negativ wahr (Daten nicht gezeigt) und auch kein von der PBS-Kontrolle abweichendes Fibronectin-Bandenmuster erkennbar ist, handelt es sich nicht um eine Abbruchbande aufgrund unerwünschter proteolytischer Aktivität der Mutante, sondern um Reste anderer Proteine, die mit den verwendeten Methoden bei der Reinigung von S263A bzw. EspP $\alpha$  nicht zu entfernen waren. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, dass gereinigtes Fibronectin durch EspP $\alpha$  vollständig gespalten werden kann und dass Fibronectin bei der elektrophoretischen Trennung zwei unterschiedlich große Banden liefert. Da es sich bei Fibronectin um ein Glykoprotein mit mehreren Spleißvarianten handelt (s.o.), könnte dies eine Erklärung für das Auftreten unterschiedlich großer Banden eines Proteins sein.



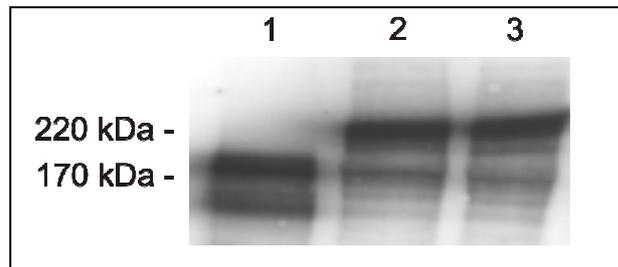
**Abb. 4.18: SDS-PAGE von gereinigtem Fibronectin (FN).** Fibronectin wurde bei 37°C 16h in Anwesenheit von EspP $\alpha$  S263A und PBS inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Bahn 1: FN + EspP $\alpha$ , Bahn 2: FN + S263A, Bahn 3: FN + PBS, Bahn 4: EspP $\alpha$ , Bahn 5: S263A.

#### 4.3.2 Western Blot von Thrombozytenüberständen nach EspP $\alpha$ -Inkubation

Für den Einsatz im Western Blot wurden Thrombozytenüberstände analog zum gereinigten Protein mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS inkubiert und für die Westernblot Analyse verwendet. Zur Detektion wurden ein monoklonaler anti-Fibronectin-Antikörper und ein alkalischer Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper eingesetzt. Als Substrat wurde NBT/BCIP verwendet (Abb. 4.19). Auf Bahn 2 und Bahn 3 wurden die Inkubationsansätze mit PBS bzw. S263A aufgetragen und man erkennt bei 220 kDa und 180 kDa die erwarteten Proteinbanden. Daneben sind weitere weniger stark ausgeprägten Banden erkennbar, welche vermutlich auch in diesem Fall auf das Vorhandensein unterschiedlicher Glykosylierungsformen oder alternativer Spleißvarianten des Proteins zurückzuführen sind. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Bahn 3) ist im Ansatz mit EspP $\alpha$  die Bande bei 220 kDa verschwunden und man erkennt ein mögliches Abbruchfragment bei 150 kDa. Darüber hinaus spricht die Intensitätszunahme der Bande bei 180 kDa für das Auftreten eines weiteren Abbruchfragments mit dieser Größe. Ob die ursprüngliche Bande bei 180 kDa noch vorhanden ist, lässt sich nicht zweifelsfrei feststellen. Dennoch lässt dieses Experiment

---

vermuten, dass Fibronektin auch aus Thrombozytenüberständen teilweise durch EspP $\alpha$  gespalten werden kann.



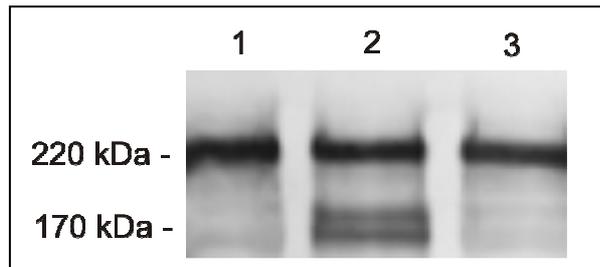
**Abb. 4.19: Western Blot von Thrombozytenüberständen (TÜ).** Thrombozytenüberstände wurden bei 37°C 16h in Anwesenheit von EspP $\alpha$  und S263A inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen anti-Fibronektin-Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: TÜ + EspP $\alpha$ , Bahn 2: TÜ + PBS, Bahn 3: TÜ + S263A.

#### 4.3.3 Western Blot von humanem Plasma nach EspP $\alpha$ -Inkubation

Fibronektin (FN) aus Plasma unterscheidet sich von Fibronektin aus Thrombozyten in Bezug auf Molekulargewicht und Zusammensetzung der Fibronektin-Isoformen (Schick *et al.*, 1996). Neben der Überprüfung ob in Plasma vorkommendes natives FN überhaupt gespalten werden kann, wurde auch aus diesem Grund aus Plasma stammendes FN als mögliches Substrat für EspP $\alpha$  untersucht.

Für diesen Versuch wurden, wie bereits vorher beschrieben, Inkubationsansätze mit frischem Plasma hergestellt.

Das Ergebnis des Western Blots (Abb. 4.20) zeigt, dass FN in humanem Plasma durch EspP $\alpha$  gespalten werden kann. Als Spaltprodukt entsteht eine Doppelbande bei ca. 180 kDa (vgl. Bahn 2 und 3). In der Kontrolle mit PBS (Bahn 1) und in der Negativkontrolle (Bahn 3) ist nur eine Bande bei 220 kDa erkennbar. Da die Bande bei 220 kDa im Inkubationsansatz mit der aktiven Protease erhalten bleibt, ist die Spaltung von humanem Fibronektin aus humanem Plasma, möglicherweise aufgrund der Anwesenheit von Serpinen, unvollständig.



**Abb. 4.20: Western Blot von humanem Plasma. Plasma wurde bei 37°C 16h in Anwesenheit von EspP $\alpha$ , S263A und PBS inkubiert.** Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: Plasma + PBS, Bahn 2: Plasma + EspP $\alpha$ , Bahn 3: Plasma + S263A.

#### 4.3.4 Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Fibronektin anhand von Flusskammer-Experimenten

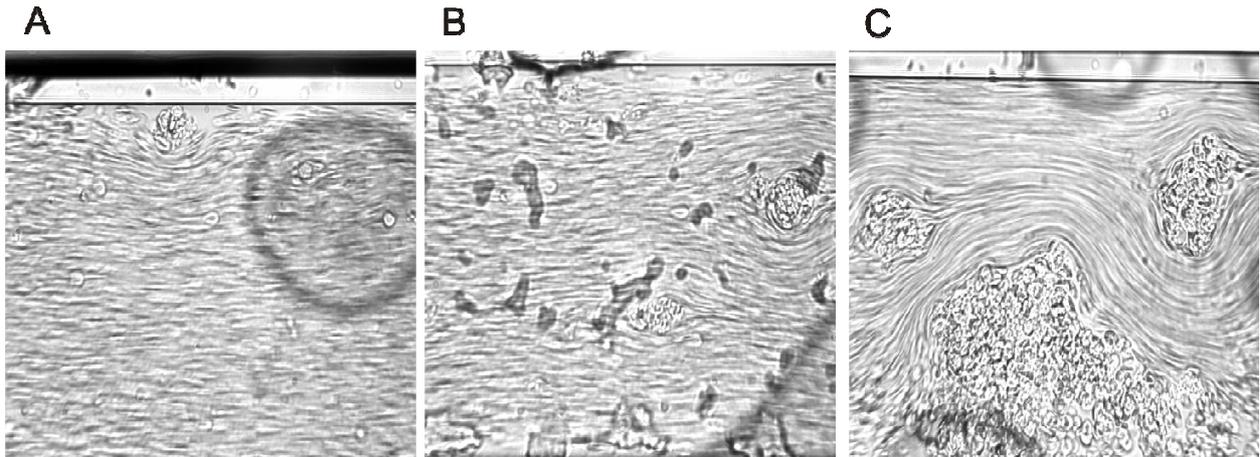
Eine Glaskapillare wurde mit FN beschichtet und 16h mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS inkubiert (Abb. 4.21 bis Abb. 4.23). Anschließend wurde die Flusskammer mit frischem Citratblut perfundiert. Die Versuchsdokumentation erfolgte analog zu den Flusskammer-Experimenten mit vWF.

Abb. 4.21 zeigt die Thrombusbildung auf FN. Über einen Zeitraum von 3 Minuten erkennt man eine rapide Zunahme der Größe und Anzahl der Plättchenaggregate. Zusätzlich erkennt man Erythrozyten und Leukozyten die auf den Plättchen haften oder über diese hinweg rollen (C).

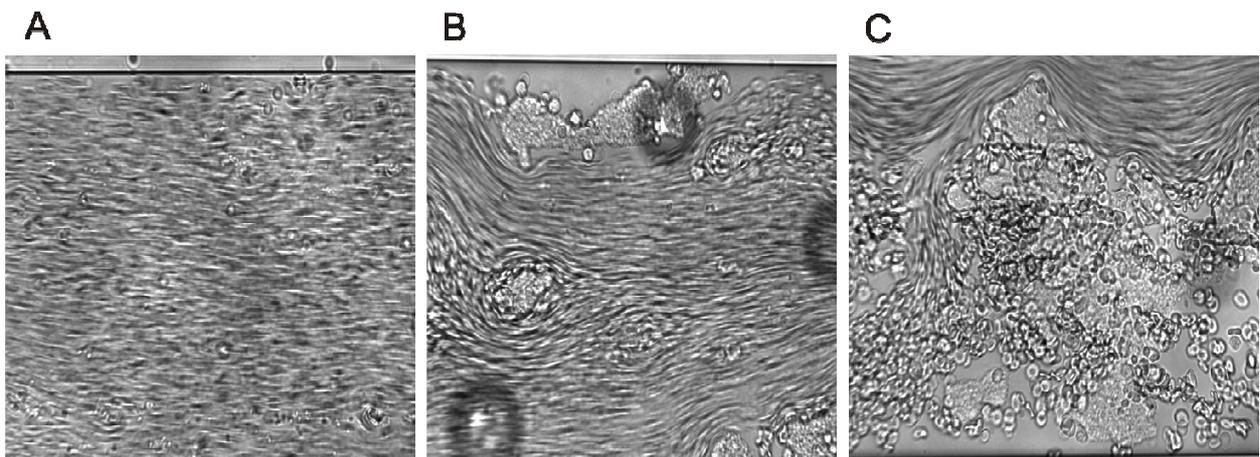
Die Negativkontrolle (Abb. 4.22) zeigt ein ähnliches Bild, allerdings ist die Größenzunahme der einzelnen Thromben noch wesentlich stärker. Nach Inkubation der Flusskammer mit EspP $\alpha$  ist keine ausgeprägte Plättchenaggregation möglich (Abb. 4.23). Nach 2 Minuten hat sich eine kleine Ansammlung von Plättchen gebildet, die jedoch zu instabil ist um den ausgeübten Scherkräften Stand zu halten und daher mit dem Blutstrom mitgerissen wird (C).

Eine unspezifische Bindung der Thrombozyten an die Kapillare kann ausgeschlossen werden, da in Kontrollversuchen mit unbeschichteten Kapillaren keine Adhäsion erfolgte (Daten nicht gezeigt).

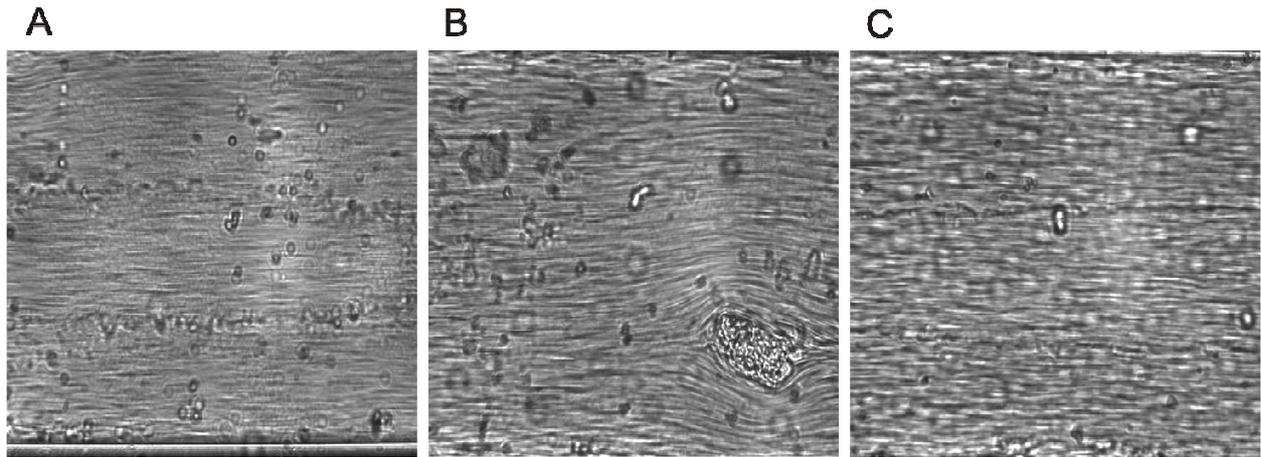
Durch dieses Experiment wird gezeigt, dass FN in seinen funktionellen Eigenschaften durch die Inkubation mit EspP $\alpha$  sehr stark beeinträchtigt wird.



**Abb. 4.21: FN-beschichtete Flusskammer nach PBS-Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 2 Minuten, C: 3 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.22: FN-beschichtete Flusskammer nach S263A-Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 2 Minuten, C: 3 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.23: FN-beschichtete Flusskammer nach EspP $\alpha$ -Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen zeigen Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 2 Minuten, C: 3 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.

#### 4.3.5 Interaktion von Fibrinogen und EspP $\alpha$

Fibrinogen (FG) wird von Hepatozyten gebildet und ist vor allem im Plasma, aber auch den  $\alpha$ -Granula von Plättchen vorhanden. Da auch dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Hämostase spielt, wurde es als mögliches Zielprotein von EspP $\alpha$  untersucht. Fibrinogen ist ein Heterohexamer bestehend aus zwei symmetrischen Hälften, die aus je einer  $\alpha$ -Kette,  $\beta$ -Kette und einer  $\gamma$ -Kette bestehen. Über Disulfidbrücken sind beide Hälften miteinander verknüpft. Fibrinogen existiert im menschlichen Plasma in mehr als 100 verschiedenen Formen aufgrund von alternativen Spleißregionen, extensiven posttranslationalen Modifikationen und Polymorphismen der Polypeptidketten (Herrick *et al.*, 1999). Fibrinogen ist unter anderem ein Adhäsionsprotein für Thrombozyten und Leukozyten (Herrick *et al.*, 1999).

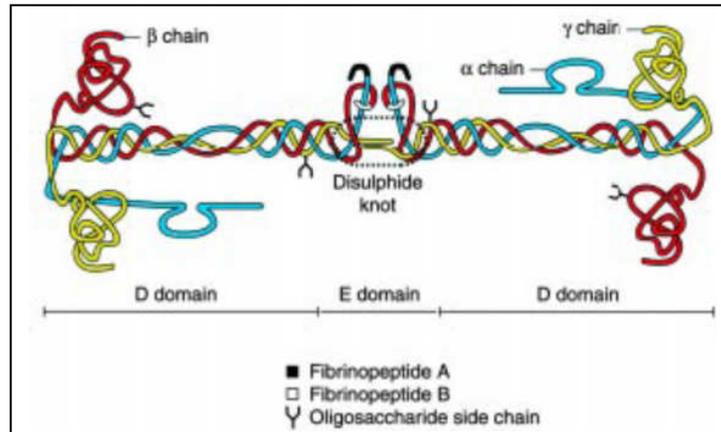
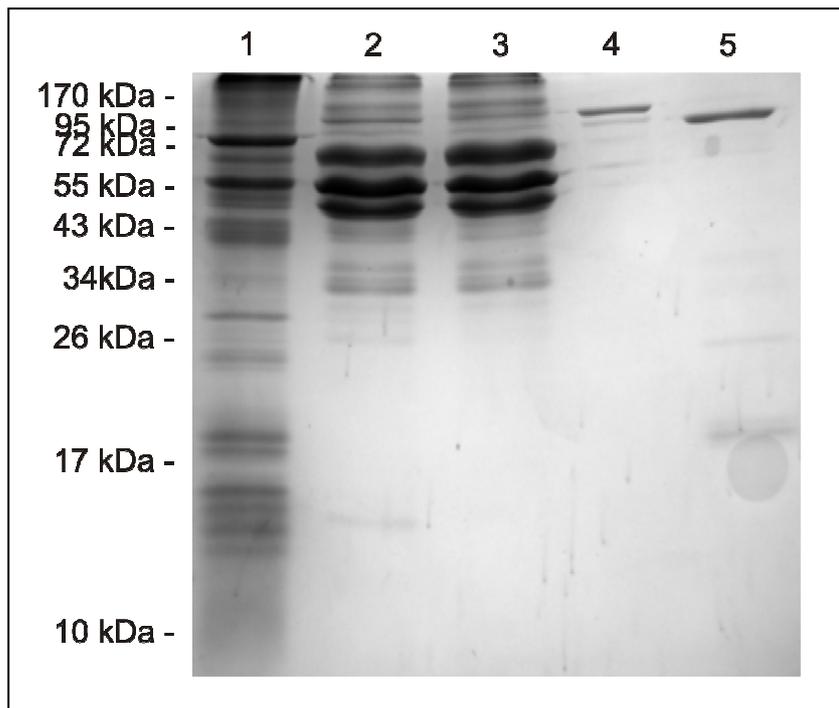


Abb. 4.24: Schematische Darstellung der Fibrinogen-Struktur aus Herrick *et al.*, 1999

#### 4.3.6 SDS-PAGE von gereinigtem Fibrinogen nach EspP $\alpha$ -Inkubation

Aus Plasma gereinigtes Fibrinogen wurde wie zuvor beschrieben mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS 16h bei 37°C inkubiert (Abb. 4.25). Zusätzlich wurden S263A (Bahn 4) und EspP $\alpha$  (Bahn 5) als Größenkontrollen mitgeführt. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Auf den ersten Blick erkennt man, dass Fibrinogen im Polyacrylamidgel eine Vielzahl von Banden liefert (Abb. 4.25), welche durch die bereits beschriebenen Formenvarianten erklärt werden können. In der Kontrolle mit PBS (Bahn 3) treten jedoch drei Banden bei ca. 70, 55 und 47 kDa deutlich hervor. Die weiteren Banden könnten, bis auf die des EspP $\alpha$  bzw. der Negativkontrolle, alternative Formen des Fibrinogens darstellen (s.o.). Die Negativkontrolle (Bahn 2) liefert kein anderes Bandenmuster als die mit PBS, ganz im Gegenteil zum Inkubationsansatz mit EspP $\alpha$  (Bahn 1). Hier fällt zunächst eine starke Bande bei ca. 250 kDa auf. Ebenso deutlich ist die Bandenabschwächung der potentiellen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette und die Entstehung zahlreicher Banden mit niedrigerem Molekulargewicht im Bereich zwischen 25 und 13 kDa, so dass vermutet werden kann, dass die Polypeptidketten durch EspP $\alpha$  zumindest teilweise gespalten werden können. Das Ergebnis dieses Experiments liefert einen starken Hinweis auf die Spaltung von Fibrinogen durch EspP $\alpha$  und sollte mittels Western Blot-Analysen der hier eingesetzten Proben bestätigt werden.

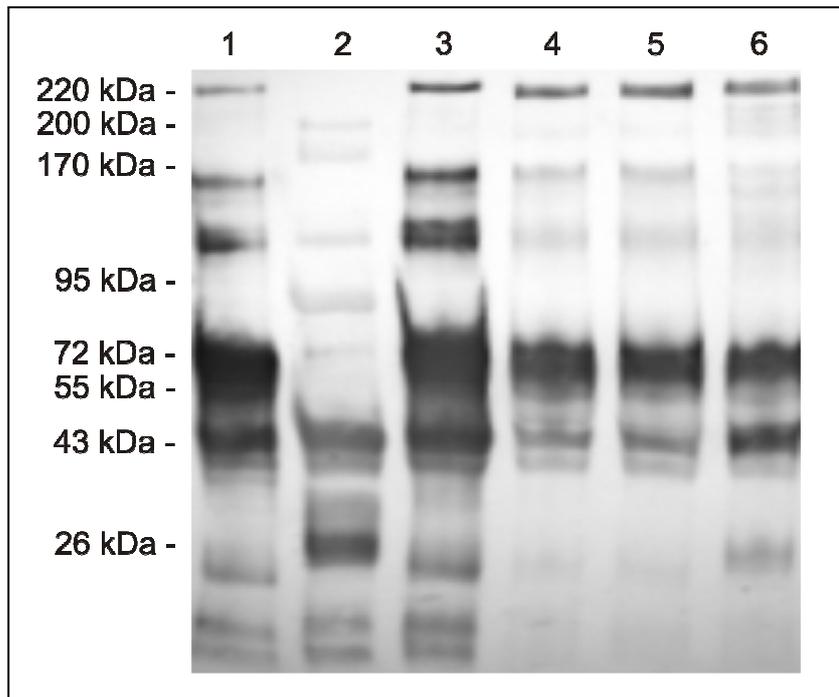


**Abb. 4.25: SDS-PAGE von unbehandeltem Fibrinogen und Fibrinogen in Anwesenheit von S263A und EspPα 16h bei 37°C.** Bahn 1: FG + EspPα, Bahn 2: FG + S263A, Bahn 3: FG + PBS, Bahn 4: S263A, Bahn 5: EspPα. Western Blot von gereinigtem Fibrinogen und von humanem Plasma nach EspPα-Inkubation

Die oben beschriebenen Proben wurden mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein polyklonaler anti-Fibrinogen-Antikörper und ein alkalische Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper mit dem Substrat NBT/BCIP verwendet (Abb. 4.26). Zusätzlich wurde eine Western Blot Analyse von Plasma durchgeführt, da Fibrinogen (FG) in hoher Konzentration im Plasma enthalten ist.

Im Polyacrylamidgel fallen deutliche Unterschiede im Bandenmuster der PBS-Kontrolle (Bahn 1) und Negativkontrolle (Bahn 3) im Vergleich zum Inkubationsansatz mit EspPα (Bahn 2) auf. Man erkennt, dass sowohl die Bande bei 220 kDa, als auch bei 160 kDa verschwunden sind, stattdessen entstehen neue Banden bei ca. 200, 180, 80 und 60 kDa. Die Bande bei 120 kDa ist stark abgeschwächt. Eine Abgrenzung zwischen 70, 60 und 50 kDa ist bei den Kontrollen durch die Bandendicke nicht möglich. Hier liegt genau der Größenbereich der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette. Auch lässt die Stärke der Banden vermuten, dass es sich um die drei Polypeptide handelt. Im EspPα-Inkubationsansatz sind die Banden in diesem Größenbereich deutlich abgeschwächt. Zusätzlich erkennt man eine weitere Bande im niedermolekularen Bereich.

Der Versuchsansatz mit humanem Plasma weist nicht so deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollen und dem EspP $\alpha$ -Inkubationsansatz auf, dennoch erkennt man auch hier eine zusätzliche Bande bei ca. 200 kDa und eine leichte Abschwächung der Banden bei 160 und 120 kDa (Bahn 6). Auffallend ist jedoch, dass im Bereich um 60 kDa keine Abschwächung der Bandenstärke im Inkubationsansatz mit EspP $\alpha$  erkennbar ist. Durch die Ergebnisse wird die Hypothese unterstützt, dass EspP $\alpha$  Fibrinogen spalten kann, obwohl diese Fähigkeit im Plasma geringer zu sein scheint.



**Abb. 4.26: Western Blot von gereinigtem Fibrinogen (Fg) und humanem Plasma.** Fibrinogen und Plasma wurden 16h bei 37°C mit EspP  $\alpha$ , S263A und PBS inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen anti-Fg Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: Fg + PBS, Bahn 2: Fg + EspP $\alpha$ , Bahn 3: Fg + S263A, Bahn 4: Plasma + PBS, Bahn 5: Plasma + S263A, Bahn 6: Plasma + EspP $\alpha$ .

#### 4.3.7 Einsatz von Fibrinogen in der Flusskammer

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit von FG bot sich auch hier der Einsatz von Flusskammern an.

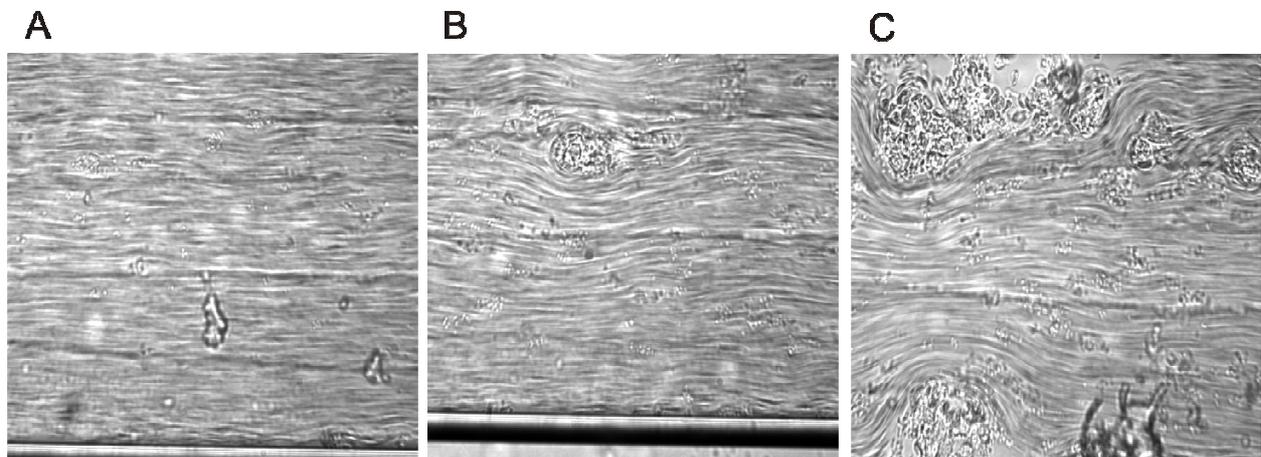
Glaskapillaren wurden mit Fibrinogen beschichtet und 16h mit EspP $\alpha$  und den üblichen Kontrollen S263A und PBS inkubiert. Die Versuchsdurchführung und Dokumentation erfolgte analog zu den Flusskammer-Experimenten mit vWF und Fibronectin.

---

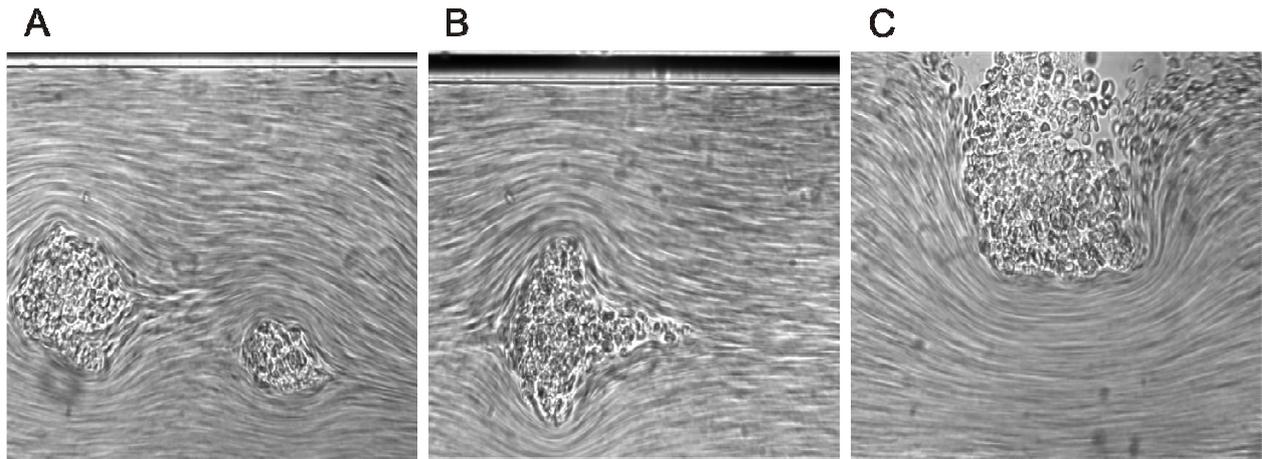
Um auszuschließen, dass Thrombozyten unspezifisch an die Kapillare binden, wurde eine unbeschichtete Kapillare eingesetzt. Es zeigte sich bei dieser Kontrolle keine unspezifische Bindung der Thrombozyten an die Glaskapillare (Daten nicht gezeigt).

Abb. 4.27 bis Abb. 4.29 zeigt die Plättchenaggregation in Anwesenheit von FG in der Flusskammer. In den einzelnen Ausschnitten erkennt man eine starke Zunahme von Anzahl und Größe der Thrombozytenaggregate. Die Negativkontrolle (Abb. 4.27) zeigt ein ähnliches Bild.

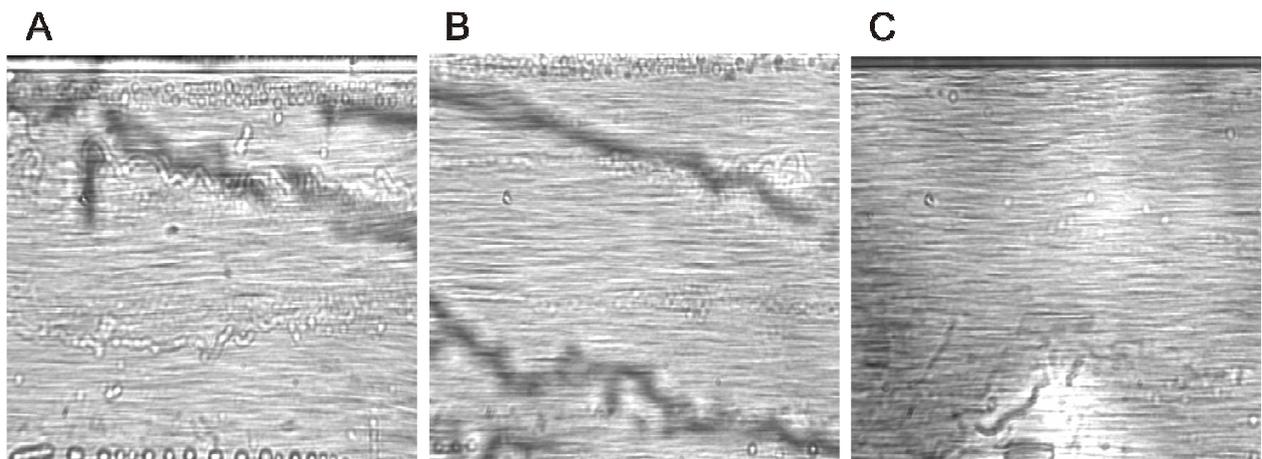
Nach Inkubation der Flusskammer mit EspP $\alpha$  ist keine Plättchenaggregation über den gesamten Zeitraum von 4 Minuten erkennbar. So bewirkt EspP $\alpha$  auch hier eine funktionelle Beeinträchtigung des Proteins



**Abb. 4.27: FG-beschichtete Flusskammer nach PBS-Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen repräsentieren Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.28: FG-beschichtete Flusskammer nach S263A-Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen repräsentieren Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.



**Abb. 4.29: FG-beschichtete Flusskammer nach EspPα-Inkubation.** Die einzelnen Abbildungen repräsentieren Videoaufzeichnungen zu definierten Zeitpunkten. A: 1 Minute, B: 3 Minuten, C: 5 Minuten. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Versuche mit je 3 Parallelansätzen.

#### 4.4 Interaktion von Thrombospondin-1 und EspPα

Thrombospondin-1 (TSP-1) ist Teil der aus 5 Mitgliedern bestehenden Thrombospondin-Familie (Bonney *et al.*, 2008). Es ist ein trimeres Glykoprotein mit einer Monomergröße von ca. 180 kDa und kommt in großen Mengen in den  $\alpha$ -Granula von Plättchen vor (Bonney *et al.*, 2008), ebenso ist es im Blutplasma enthalten. TSP-1

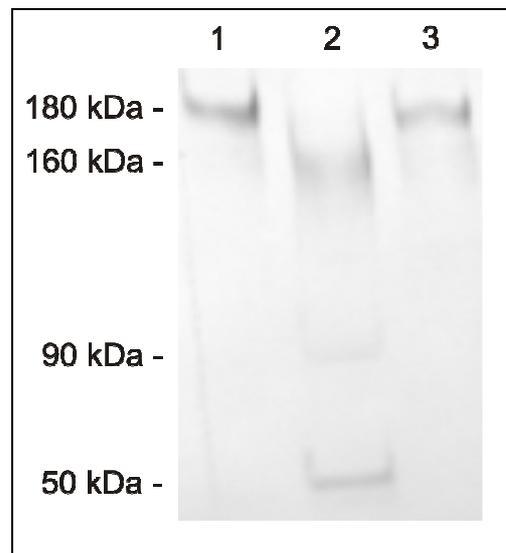
---

ist ein multifunktionales Protein mit Aufgaben im Bereich der Zelladhäsion, Angiogenese, Entzündung und vielen weiteren Bereichen. Von besonderem Interesse ist hier seine Funktion der Plättchenaggregation (Bonney *et al.*, 2008) und Plättchenadhäsion (Jurk *et al.*, 2003).

#### 4.4.1 Western Blot von gereinigtem TSP-1 nach EspP $\alpha$ -Inkubation

Für den Versuch wurde gereinigtes TSP-1 aus humanem Plasma mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS 16h bei 37°C inkubiert (Abb. 4.30). Zur Detektion wurde ein monoklonaler anti-TSP-1 Antikörper und ein alkalische Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper mit dem Substrat NBT/BCIP verwendet

In Abb. 4.30 ist die Spaltung von TSP-1 durch EspP $\alpha$  deutlich zu sehen (Bahn 2). Auf der Höhe von ca 180 kDa ist in der Kontrolle mit PBS und in der Negativkontrolle die Bande des TSP-1 erkennbar (Bahn 1 und 3). Im EspP $\alpha$ -Ansatz fehlt diese Bande und es sind drei Banden bei ca 160, 90 und 50 kDa zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt, dass TSP-1 durch EspP $\alpha$  gespalten werden kann und dass aus dieser Spaltung drei Abbruchfragmente des TSP-1 entstehen, die vom Primärantikörper erkannt werden.



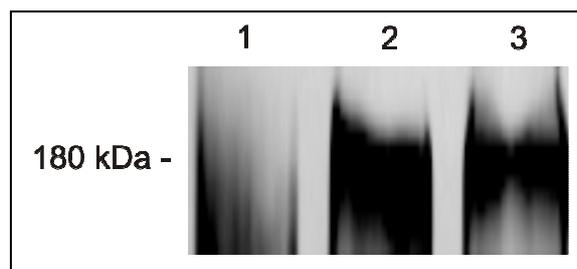
**Abb. 4.30: Western Blot von gereinigtem Thrombospondin-1 (TSP-1).** TSP-1 wurde bei 37°C 16h in Anwesenheit von EspP $\alpha$  und S263A inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen anti-TSP-1 Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: TSP-1 + S263A, Bahn 2: TSP-1 + EspP $\alpha$ , Bahn 3: TSP-1 + PBS.

---

#### 4.4.2 Western Blot von Thrombozytenüberständen und humanem Plasma nach EspP $\alpha$ -Inkubation

Für den Einsatz im Western Blot wurden die mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS- inkubierten Thrombozytenüberstände verwendet (Abb. 4.31). Die Durchführung der Western Blot Analyse erfolgte Analog zum Versuch mit gereinigtem TSP-1. Die Bande im Kontrollansatz (Bahn 3) liegt bei einer Größe von etwa 180 kDa und entspricht somit der erwarteten Größe für das TSP-1 Monomer. Der Vergleich der Negativkontrolle (Bahn 2) mit dem Ansatz der aktiven Protease zeigt, dass die Bande bei 180 kDa nach EspP $\alpha$ -Inkubation verschwunden ist. Dieses Ergebnis deutet auf die Spaltung von TSP-1 aus Thrombozytenüberständen durch EspP $\alpha$  hin.

Der Versuch wurde auch mit humanem Plasma durchgeführt. Allerdings war in mehrfach wiederholten Versuchsansätzen keine Detektion von TSP-1 möglich (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.31: Western Blot von Thrombozytenüberständen (TÜ).** Thrombozytenüberstände wurden bei 37°C 16h in Anwesenheit von PBS, EspP $\alpha$  und S263A inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose geblottet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen anti-TSP-1-Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: TÜ + EspP $\alpha$ , Bahn 2: TÜ + S263A, Bahn 3: TÜ+ PBS.

#### 4.4.3 Überprüfung der Funktionsfähigkeit von Thrombospondin-1

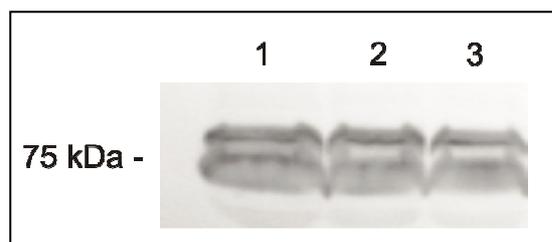
Auch TSP-1 sollte mit Hilfe der bereits beschriebenen Flusskammern bezüglich seiner Funktionalität getestet werden. Im Blickpunkt stand hier die Fähigkeit der Thrombozyten, unter Scherstress an TSP-1 zu binden. Auch hierfür wurden Flusskammern mit TSP-1 beschichtet und 16h mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS bei 37°C inkubiert. Da sich jedoch trotz mehrfacher Wiederholung weder in der Testkontrolle noch in der Negativkontrolle Thrombozyten in der Flusskammer an TSP-1 anlagerten, konnte mit diesem Experiment keine valide Aussage zur Funktionsfähigkeit von TSP-1 getroffen werden.

---

#### 4.5 Keine Spaltung von Vitronektin durch EspP $\alpha$

Vitronectin (Vn) hat ein Molekulargewicht von etwa 75 kDa und liegt in ähnlich hohen Konzentrationen wie Fibrinogen (7 $\mu$ M) im Blutplasma vor. Es ist genau wie von Willebrand-Faktor, Fibronectin, Thrombospondin-1 und Fibrinogen ein Glykoprotein, welches nicht nur regulative Funktionen innerhalb des Komplementsystems hat, sondern auch die Adhäsion von Plättchen vermitteln kann (Asch und Podack, 1990). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob EspP $\alpha$  Vitronectin spalten kann. Es wurden analoge Versuchsansätze und Kontrollen wie bei vWF, FN, FG und TSP-1 gewählt (Abb. 4.32).

In diesem Blot werden zwei Banden für Vitronectin dargestellt, jedoch entsteht nach EspP $\alpha$ -Inkubation kein verändertes Bandenmuster so dass davon ausgegangen werden muss, dass EspP $\alpha$  Vitronectin nicht spalten kann.



**Abb. 4.32: Western Blot von humanem Plasma. Plasma wurde 16h bei 37°C mit EspP  $\alpha$ , S263A und PBS inkubiert.** Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose gebロットet. Der Western Blot wurde mit einem monoklonalen anti-Vitronectin-Primärantikörper und einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper mit NBT/BCIP entwickelt. Bahn 1: Vn + PBS, Bahn 2: Vn + EspP $\alpha$ , Bahn 3: Vn + S263A.

#### 4.6 Beurteilung der Zytotoxizität von EspP $\alpha$

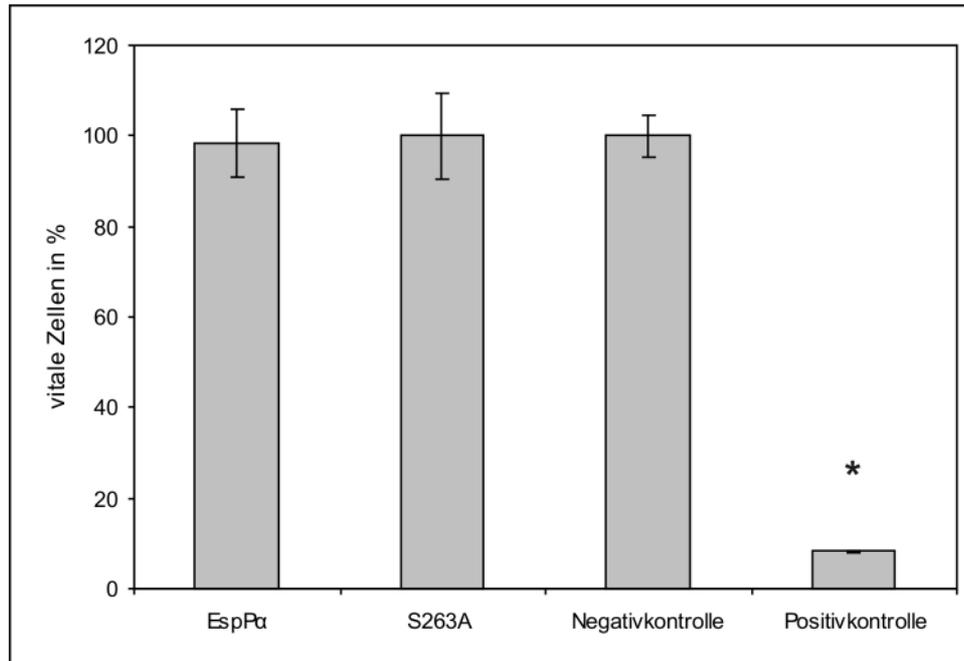
Bezüglich der Zytotoxizität von EspP $\alpha$  existieren widersprüchliche Daten. Djafari und Mitarbeiter (1997) beschreiben einen zytotoxischen Effekt von EspP $\alpha$  auf Vero-Zellen. Sie beobachteten den Verlust von Stressfasern und das Ablösen der Zellen vom Untergrund. Dutta und Mitarbeiter (2002) konnten hingegen keine zytopathischen Effekte von EspP $\alpha$  nachweisen. In der Studie wurden mehrere Autotransporter an Hep-G2-Zellen getestet und es konnte kein zytotoxischer Effekt für EspP $\alpha$  nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde hier die potentielle zytotoxische Wirkung von EspP $\alpha$  in einem Zellproliferationstest untersucht.

---

#### 4.6.1 Zellproliferationstest mit HBMEC in Anwesenheit von EspPα

Bei diesem Experiment wurden HBMEC in Anwesenheit von ca. 50 µg/mL EspPα sowie der EspPα-bezogenen Negativkontrolle S263A inkubiert. Als weitere Kontrollen diente nur Endothelzellmedium (Negativkontrolle) und Triton X-100 in Medium als Positivkontrolle. Es wurde bei 37°C über verschiedene Zeiträume hinweg inkubiert (1 Stunde bis 30 Stunden). Durch mitochondriale Dehydrogenasen erfolgt die Spaltung der Tetrazoliumsalze zu Formazan. Die Menge des gebildeten Formazan korreliert mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Die Quantifizierung der Farbstoffmenge erfolgt mittels ELISA. Repräsentativ für alle Ergebnisse wurde ein Inkubationsversuch über 30 Stunden dargestellt (Abb. 4.33).

Es zeigt sich, dass die Positivkontrolle mit einem Wert von ca. 8% einen signifikant niedrigeren Wert für die Absorption aufweist als die Negativkontrolle (100%) (ANOVA, Post-Hoc-Analyse; Dunnett; 95% Konfidenzintervall). Sowohl der Inkubationsansatz mit EspPα als auch der mit S263A zeigen mit ca. 98% bzw. ca. 100% keine signifikant unterschiedlichen Werte und liegen sehr nah beim Wert für die Negativkontrolle mit Endothelzellmedium. Dementsprechend wird von keiner zytotoxischen Wirkung des EspPα ausgegangen.



**Abb. 4.33: Zellproliferationstest mit HBMEC in Endothelzellmedium in Anwesenheit von EspPα, S263A, PBS (Negativkontrolle) und 1% Triton X-100 (Positivkontrolle).** Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung von drei Experimenten ausgedrückt. \*markiert einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Positivkontrolle gegenüber EspPα und den entsprechenden Kontrollen.

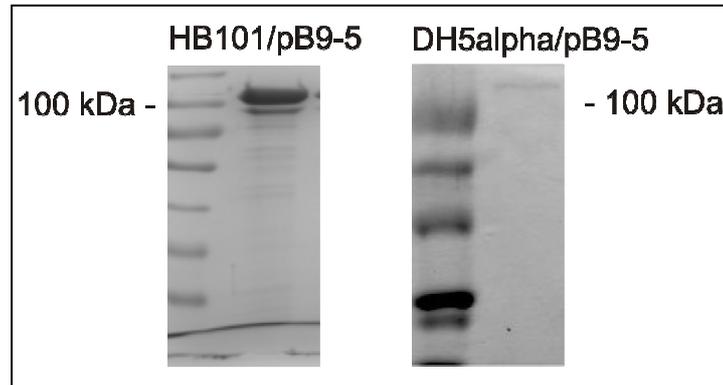
#### 4.7 Addendum: Herstellung und Reinigung von EspPα

Bereits in den Arbeiten von Brunder (1997) wurde ein EspPα- tragendes rekombinantes Plasmid (pB9-5) in *E.coli* K-12 Dh5α transformiert und für die weitere Analyse und Charakterisierung von EspPα genutzt (Brunder *et al.*, 1997). Da sowohl EspPα-Produktion und Reinigung aus O157:H7 EDL933 als auch die Handhabbarkeit des Wildtypstamms Nachteile mit sich bringen, sollte auch in dieser Arbeit *E.coli* K-12 Dh5α/pB9-5 verwendet werden. Für einen Adhäsionstest (Daten nicht gezeigt) war es notwendig, das Plasmid in den Laborstamm *E.coli* K-12 HB101 zu transformieren. Da die EspPα-Produktion durch *E.coli* K-12 HB101/ pB9-5 jedoch deutlich stärker als durch *E.coli* K-12 Dh5α/pB9-5 war (Abb. 4.34), wurde dieser Stamm zur EspPα-Produktion für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche verwendet.

Die hier beschriebenen Ergebnisse wurden mit den von Brockmeyer (2009) entwickelten Methoden zur Herstellung, Aufarbeitung und die Bestimmung des Proteingehalts von EspPα erarbeitet.

---

Die Anzucht der Bakterien erfolgte über einen Zeitraum von ca. 16 Stunden. Anschließend wurden die Proteine aus dem Bakterienüberstand mittels Trichloressigsäure gefällt. Die weitere Reinigung des Proteins erfolgte mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*). Eine ausführliche Beschreibung der Proteinaufarbeitung steht in Kap. 2.



**Abb. 4.34: Vergleich der produzierten EspP $\alpha$ -Mengen von *E.coli* K-12 DH5 $\alpha$ /pB9-5 und *E.coli* K.12 HB101/pB9-5.** Der Proteingehalt von zwei Aufarbeitungen der unterschiedlichen Laborstämme wurde mittels SDS-PAGE miteinander verglichen.

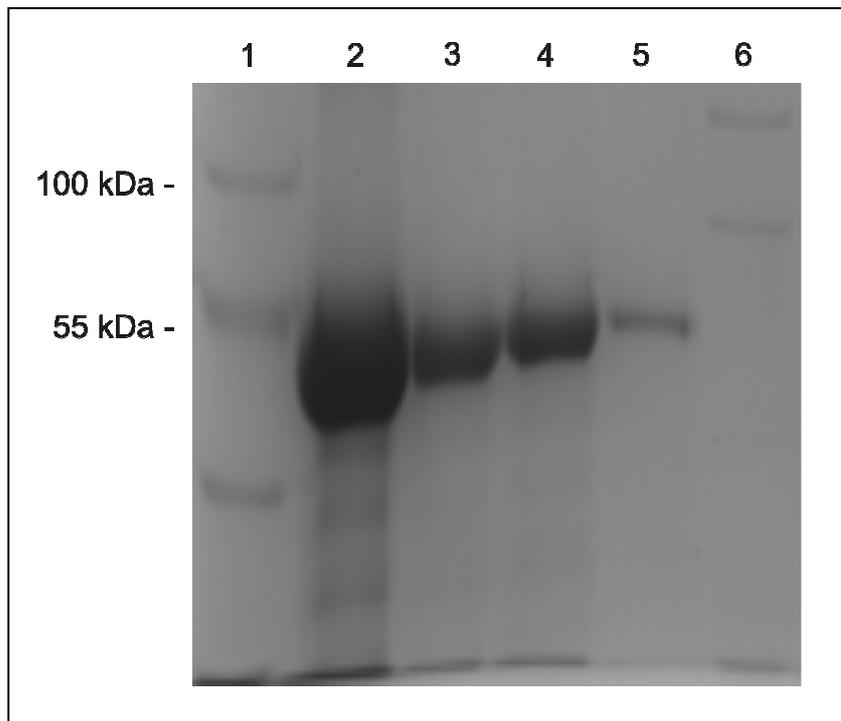
#### 4.7.1 Proteingehaltsbestimmung von EspP $\alpha$

Die Proteingehaltsbestimmung mittels des Bicinchonin-Tests oder des Bradford-Assays ist im Falle von EspP $\alpha$  nicht möglich, da Proteinreste die bei der Reinigung nicht entfernt werden konnten, die Messung stark verfälschen (Daten nicht gezeigt). Außerdem ist EspP $\alpha$  in HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethansulfonsäure)-Puffer gelöst, welcher mit den Quantifizierungsmethoden interagiert (Daten nicht gezeigt). Der Proteingehalt der Aufarbeitung wird daher mittels SDS-PAGE abgeschätzt. Hierfür wird ein Referenzprotein, in diesem Fall Rinderserumalbumin (BSA) (ca. 55 kDa) in definierter Konzentration gemeinsam mit der EspP $\alpha$ -Probe auf das Gel aufgetragen. Durch den Vergleich der Bandenstärken von EspP $\alpha$  und BSA kann der Proteingehalt der Probe abgeschätzt werden.

Abb. 4.35 zeigt beispielhaft die Proteingehaltsbestimmung einer EspP $\alpha$ -Probe nach der Reinigung. Die aufgetragene EspP $\alpha$ -Menge entspricht in ihrer Bandenstärke ungefähr der Bandenstärke von BSA bei einer Proteinmenge von 1,16 $\mu$ g. Bei einem aufgetragenen Probenvolumen von 2 $\mu$ L entspricht das einer ungefähren EspP $\alpha$ -Konzentration von 580 $\mu$ g/mL. Der so ermittelte EspP $\alpha$ -Gehalt der Aufarbeitung ist

---

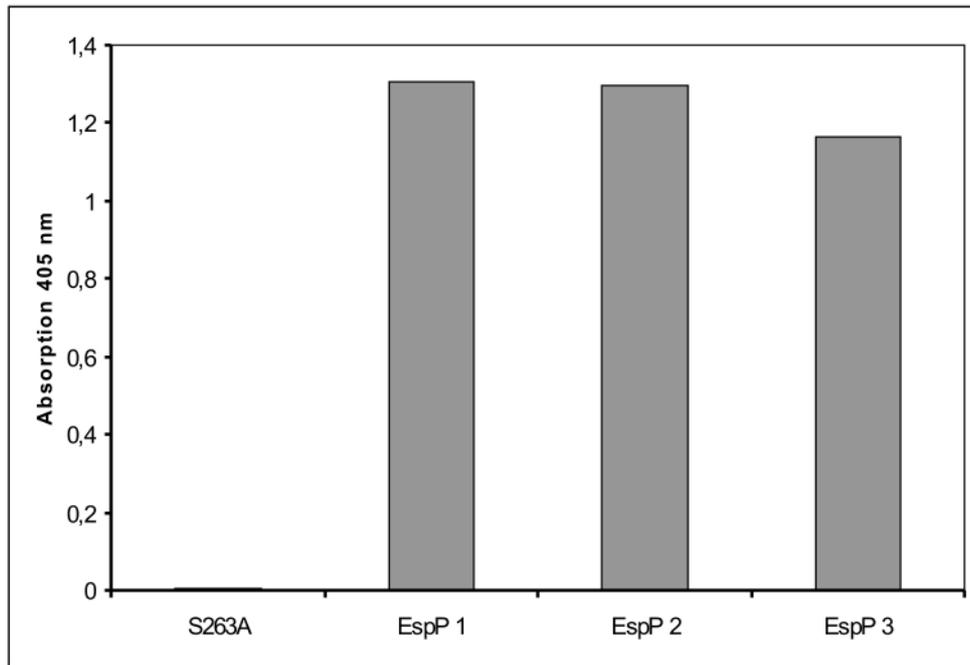
repräsentativ für die weiteren Proteinaufarbeitungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.35: Proteingehaltsbestimmung von EspPα mittels SDS-PAGE.** Zur Abschätzung der Proteinmenge in der EspPα-Probe wurde Rinderserumalbumin in genau definierten Proteinmengen zusammen mit der EspPα enthaltenden Proteinlösung aufgetragen. Durch den Vergleich der Bandenstärke wurde die EspPα-Menge in der Probe abgeschätzt. Bahn 1: Marker, Bahn 2: 11,6µg BSA, Bahn 3: 6µg BSA, Bahn 4: 2,4µg BSA, Bahn 5: 1,16µg BSA, Bahn 6: 2µL EspPα-Lösung mit unbekannter EspPα-Menge.

#### 4.7.2 Bestimmung der proteolytischen Aktivität von EspPα

Die proteolytische Aktivität von EspPα aus HB101 wird mit Hilfe des chromogenen para-Nitroanilin-konjugierten Oligopeptid-Substrats bestimmt (s.Kap.2). Die durch die Spaltung freigesetzte Menge an para-Nitroanilin wird photometrisch bestimmt (s.Kap.2). In Abb. 4.36 ist das Ergebnis eines Aktivitätstests von drei Aufarbeitungen repräsentativ dargestellt. Es ist ein deutlicher Anstieg der Absorption bei 405 nm nach der Inkubation mit EspPα erkennbar. Die Inkubation mit der zur Kontrolle mitgeführten proteolytisch inaktiven Mutante führt nicht zu einem Anstieg der Absorption.



**Abb. 4.36: Aktivitätstest mit EspP $\alpha$ .** Drei EspP $\alpha$ -Aufarbeitungen wurden 16h bei 37°C mit dem para-Nitroanilin-konjugierten Oligopeptid-Substrats inkubiert. Durch die Spaltung wird para-Nitroanilin freigesetzt, welches photometrisch bei der Absorption von 405nm bestimmt werden kann. Als Negativkontrolle dient die proteolytisch inaktive Mutante S263A.

---

## 5. Diskussion

### 5.1 P-Selektin

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass von den drei eng miteinander verwandten Selektinen L-Selektin, E-Selektin und P-Selektin nur P-Selektin durch EspP $\alpha$  hochspezifisch gespalten werden kann wie Untersuchungen mittels MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight) - Massenspektrometrie, Edman-Abbau und Deglykosylierungsexperimente belegen (Brockmeyer, 2009).

Über mögliche funktionelle Auswirkungen dieser Spaltung ist bislang jedoch nichts bekannt, so dass dieser Fragestellung mit Hilfe von Flusskammer-Experimenten nachgegangen wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass EspP $\alpha$  in der Lage ist, auf der Glasoberfläche immobilisiertes P-Selektin zu spalten und dass diese Spaltung zum Funktionsverlust des Proteins führt. Demgegenüber führt die Vorinkubation von E-Selektin mit EspP $\alpha$  und den entsprechenden Kontrollen nicht zum Funktionsverlust, da E-Selektin nicht gespalten wird. Es erfolgt somit keine unspezifische Spaltung z.B. der Fc-Domäne der chimären Selektine. Dies kann als weiterer Beleg für die Spezifität der beobachteten Spaltung von P-Selektin gedeutet werden. Darüber hinaus belegen die Kontrollexperimente mit blockierenden Antikörpern bzw. Fab-Fragmenten, sowie der Einsatz von EDTA-Blut in der Flusskammer, dass die gewählten Versuchsbedingungen nicht zu unspezifischem Rollen der Leukozyten in der Flusskammer führen.

Die Untersuchung der Leukozytenrekrutierung durch P-Selektin unter *in vitro* Flussbedingungen ermöglicht eine isolierte Betrachtung funktioneller Effekte unter der Berücksichtigung wichtiger physiologischer Parameter, wie z.B. dem Scherstress. Außerdem kann die Interaktion der Leukozyten mit P-Selektin ohne weitere Aufarbeitungsschritte der Leukozyten untersucht werden, da die Flusskammer mit Vollblut perfundiert wird. Somit ist die Flusskammer ein gut geeignetes Modellsystem für die Erforschung der grundlegenden Effekte von EspP. Wenn die funktionellen Mechanismen von EspP genauer verstanden sind, wäre es eventuell möglich ein geeignetes Tiermodell hinzuzuziehen um die Ergebnisse weiter zu überprüfen und auch *in vivo* zu untermauern.

Ein Aspekt, der bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss, ist die Tatsache, dass die Vorinkubation von P-Selektin mit EspP $\alpha$ , S263A und PBS in der

---

Flusskammer versuchsbedingt nur unter statischen Bedingungen erfolgen kann. Somit liefern die Ergebnisse dieser Experimente nur Informationen über den funktionellen Effekt der Spaltung. Ob eine Spaltung von P-Selektin auch unter Scherstress oder sogar während des Infektionsprozesses in ähnlicher Weise erfolgt, kann durch Experimente dieser Art bisher nicht belegt werden. Im Allgemeinen existieren bislang nur wenige Daten zur Expression von EspP $\alpha$  im Verlauf einer EHEC-Infektion. In Seren von Patienten, die mit EHEC-Infektionen wurden allerdings Antikörper gegen EspP $\alpha$  gefunden, zudem wurde beschrieben, dass EspP $\alpha$  in den hochvirulenten Serotypen besonders verbreitet ist (Brunder *et al.*, 1997). Zusätzlich wurde mit dem Blutgerinnungsfaktor V ein weiteres, physiologisch relevantes Substrat für EspP $\alpha$  gefunden. Faktor V ist an der Bildung des Prothrombinase- Komplexes beteiligt und somit essentiell für die Blutgerinnung. Dies kann als Hinweis für eine Rolle von EspP im Krankheitsverlauf gesehen werden. Die vorhandenen Literaturdaten sprechen somit für eine Expression des Proteins während des Infektionsprozesses. Zeitpunkt, Menge und Expressionsort von EspP $\alpha$  bleiben allerdings unbekannt.

P-Selektin spielt eine bedeutende Rolle beim Rollen von Leukozyten auf Endothelzellen und ist zentral an der Leukozytenrekutierung bei inflammatorischen Prozessen beteiligt (Cambien *et al.*, 2004; Dole *et al.*, 2005). Die Spaltung von P-Selektin durch eine bakterielle Protease könnte somit lokal zu einer verminderten Leukozytenrekutierung und somit zu einer abgeschwächten Immunantwort führen.

Zusätzlich mehren sich Hinweise, dass hämostatische und inflammatorische Prozesse eng miteinander verknüpft sind und dass diese Verknüpfung zum Teil P-Selektin zugeschrieben werden kann (André, 2004). P-Selektin kann die Fibrinsynthese beeinflussen und ist somit an Thrombuswachstum und Stabilisierung beteiligt (Palabrica *et al.*, 1992). Die Generierung von Fibrin ist von der Bindung der Leukozyten an aktivierte Plättchen über P-Selektin abhängig (Palabrica *et al.*, 1992). P-Selektindefiziente Mäuse zeigen aufgrund verlängerter Blutungszeiten ausgedehnte Blutungen (André, 2004). Bei Patienten, die während einer EHEC-Infektion eine hämorrhagische Kolitis entwickeln, führt die lokale Zerstörung der kapillaren Blutgefäße der Darmmukosa zu Schleimhautblutungen (Karmali, 2004). Dieser Effekt kann möglicherweise durch die Interaktion von EspP $\alpha$  mit P-Selektin und Faktor V durch Beeinträchtigung der Blutgerinnung lokal verstärkt werden.

Aufgrund der bereits beschriebenen Abwesenheit eines geeigneten Tiermodells existieren keine Informationen über die Rolle von P-Selektin bei akuten EHEC-

---

Infektionen *in vivo*. Allerdings wurde in einem Mausmodell mit *Salmonella typhimurium* bei Mäusen ohne funktionelles P-Selektin bzw. PSGL-1 eine signifikant höhere Mortalität als bei Mäusen ohne funktionelles E- oder L-Selektin beobachtet, deren Mortalität keinen Unterschied zu den Wildtypmäusen zeigte (Kum *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten P-Selektin-defiziente Mäuse eine signifikant höhere Kolonisierung mit *S.typhimurium* als die Wildtypen (Kum *et al.*, 2009). Obwohl die Ergebnisse keineswegs direkt auf die Situation einer humanen EHEC-Infektion übertragen werden dürfen, lassen diese Ergebnisse doch auf eine besondere Bedeutung von P-Selektin bei der Abwehr intestinaler Infektionen schließen.

## 5.2 Von Willebrand-Faktor

Die Spaltung des von Willebrand-Faktors (vWF) durch EspP $\alpha$  in seiner monomeren Form und die Spaltung von der Oberfläche endothelialer Zellen (Brockmeyer, 2009) wurde bereits beschrieben. Mit Hilfe der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollte die Spaltung des monomeren vWF im Hinblick auf Anzahl und Größe der entstehenden Abbruchfragmente genauer betrachtet werden. Weiterhin wurde untersucht, ob eine Spaltung des Proteins im Blutplasma erfolgen kann und ob die Proteolyse von vWF zur Funktionsstörung des Proteins führt. Die Inkubation von EspP $\alpha$  mit humanem Plasma wurde durchgeführt, um zu prüfen, ob vWF in weitgehend physiologischer Umgebung gespalten werden kann. Natürlich muss dabei beachtet werden, dass dieses Experiment nur eine Annäherung an *in vivo*-Bedingungen darstellen kann, da z.B. zelluläre Bestandteile fehlen und die Inkubation nur unter statischen Bedingungen durchgeführt werden kann.

Die Versuche bestätigen die bereits beschriebene Spaltung von vWF und zeigen darüber hinaus, dass vWF in humanem Plasma gespalten werden kann. Die Spaltung von vWF in weitgehend physiologischer Umgebung führt allerdings zu einem abweichenden Bandenmuster. Möglicherweise ist dies durch die Anwesenheit von Serin-Protease-Inhibitoren, wie z.B der Proteinfamilie der Serpine, erklärbar. Der Begriff Serpin ist ein Akronym und steht für die große Familie der Serin-Protease-Inhibitoren. Serpine machen ca. 10% des Gesamtproteingehalts von menschlichem Blutplasma aus (Rawlings *et al.*, 2008).

Die funktionellen Tests belegen, dass die Inkubation des vWF mit EspP $\alpha$  zu einer Beeinträchtigung wichtiger Eigenschaften bzw. zum vollständigen Funktionsverlust führt.

---

Für weitere *in vitro*-Untersuchungen zur Spaltung von vWF wurden klinische Standardmethoden zur Diagnostik vWF-abhängiger Gerinnungsstörungen verwendet. Für die Auswahl dieser Methoden war ihre allgemein anerkannte Aussagekraft in Bezug auf quantitative und qualitative Defekte des vWF maßgeblich. Darüber hinaus wurde mit Hilfe derselben Kombination aus Kollagen-Bindungstest, vWF-Antigen-Test und Ristocetin-Kofaktor-Test die Spaltung von vWF und ADAMTS13 durch eine sezernierte Metalloprotease von *Bacillus anthracis* nachgewiesen (Chung *et al.*, 2008).

Die Vermittlung der Thrombozytenaggregation, die mit Hilfe des Ristocetin-Kofaktor-Tests untersucht wurde, ist nach der Inkubation mit EspPα signifikant eingeschränkt.

Es wurde beschrieben, dass vor allem hochmolekulare vWF-Multimere, die Bindung an Thrombozyten in Anwesenheit von Ristocetin induzieren (Sixma *et al.*, 1984; Brown und Bosack, 1986). Da die Spaltung von vWF in jedem Fall zu einer Reduktion des Multimerisierungsgrades führt, ist diese Ursache für eine schlechtere Bindung von Thrombozyten am wahrscheinlichsten.

Der zentrale Bereich zur Adhäsion von vWF an den Glykoproteinrezeptor Iba befindet sich in der A1 Domäne des vWF (Reininger, 2008). Weitere Bindungsstellen befinden sich in den Domänen B1-3, C2 und C1 (Reininger, 2008). Die C1 Domäne trägt eine RGD-Sequenz, die an das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  bindet. Eine Bindung an  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erfordert eine vorherige Aktivierung des Integrins über „*inside-out-Signaling*“ (Varga-Szabo *et al.*, 2008). Da aber für den Test Formalin-fixierte Plättchen verwendet werden, ist eine Bindung an diesen Rezeptor eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus ist in der Literatur beschrieben, dass beim Ristocetin-Kofaktor-Test die Bindung von vWF an Thrombozyten über den Glykoproteinrezeptor Iba auf der Plättchenoberfläche erfolgt (Ruggeri, 2003). Vor dem Hintergrund der Spaltung des monomeren vWF kann vermutet werden, dass die A1-Domäne des vWF bei der Spaltung durch EspPα betroffen sein könnte.

Die Fähigkeit des Proteins an Kollagen zu binden wird ebenfalls stark eingeschränkt bzw. entfällt vollständig. Nur die hochmolekularen Formen des vWF haben eine hohe Bindungsaffinität für Kollagen (Furlan, 1996) und können an die mit Kollagen beschichtete Mikrotiterplatte binden (Brown *et al.*, 1986; Favalaro *et al.*, 1991). Eine Abnahme der Kollagen-Bindungsaffinität lässt auf das Vorhandensein niedermolekularer, hämostatisch weniger effizienter Multimere bzw. Monomere im Plasma zurückschließen. Wichtig ist hierbei, dass mittels des vWF-Antigen-Tests quantitative Unterschiede, die einer reduzierten Kollagenbindungsaffinität zugrunde liegen, ausgeschlossen werden konnten. Die Versuchsergebnisse legen daher die

---

Vermutung nahe, dass die Inkubation mit EspP $\alpha$  zu einer Abnahme der hochmolekularen Multimere führt, wie es auch schon die Ergebnisse des Ristocetin-Kofaktor-Tests vermuten lassen. Da allerdings der Multimerisierungsgrad von vWF durch eine Spaltung an jeder beliebigen Stelle verringert sein kann, ist an dieser Stelle keine Aussage über die genaue Spaltstelle möglich. Diese könnte mittels Massenspektrometrie oder Edman-Abbau bestimmt werden. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss auch berücksichtigt werden, dass eine Spaltung in der Bindedomäne des anti-vWF Antikörpers nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Da allerdings ein polyklonaler Antikörper verwendet wurde, ist eine „falsch positive“ Signalabschwächung sehr unwahrscheinlich. Auffällig ist auch bei diesem Test, dass der funktionelle Defekt beim gereinigten vWF deutlich stärker ausgeprägt ist. Bei diesem Versuchsansatz kommt es sogar zu einem vollständigen Verlust der Kollagen-Bindungsaktivität. Auch hier wäre die Anwesenheit von Serin-Protease-Inhibitoren im Plasma, die unter Umständen die Aktivität von EspP $\alpha$  beeinflussen können, als Ursache eine mögliche Erklärung.

Sowohl der Ristocetin-Kofaktor-Test als auch der Kollagen-Bindungsassay belegen zwar eine EspP $\alpha$ -abhängige Einschränkung in unterschiedlichen Bereichen der Proteinfunktion, ermöglichen aber keine Beurteilung der funktionellen Eigenschaften unter dem Einfluss wichtiger Parameter, wie z.B. der Flussgeschwindigkeit des Blutes oder der physiologischen Umgebung von Thrombozyten. Um diesen Rahmenbedingungen Rechnung zu tragen, wurde eine Flusskammermethode zur Beurteilung der funktionellen Eigenschaften von vWF entwickelt. Auch bei diesen Experimenten gelten die bereits für P-Selektin beschriebenen Limitierungen des Testsystems. Die Flusskammern wurden mit vWF beschichtet und die Inkubation erfolgte analog zu P-Selektin. Der untersuchte funktionelle Parameter war die Fähigkeit des Proteins, Thrombozyten aus dem Blutstrom zu rekrutieren. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass gereinigter vWF an Glasskapillaren adhärieren kann und dass dadurch keine strukturellen oder funktionellen Veränderungen im Vergleich zu normalem vWF entstehen (Olson *et al.*, 1989). Darüber hinaus ist die Verwendung von beschichteten Oberflächen zur Untersuchung der Plättchenadhäsion unter Scherstress in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (Kuwahara *et al.*, 1999, Wu *et al.*, 1996; Chandy *et al.*, 1998). Die Adhäsion von Thrombozyten an vWF ist entscheidend von den herrschenden Flussbedingungen abhängig. Obwohl über die Rolle des vWF unter niedrigem Scherstress weitaus weniger bekannt ist als über die Rolle unter hohem Scherstress, belegen einige Studien, dass vWF sowohl unter *in vitro*-Bedingungen als

---

auch *in vivo* absolut essentiell für die Thrombusbildung unter niedrigem Scherstress ist (Chauhan *et al.*, 2007; Badimon *et al.*, 1989; Mazzucato *et al.*, 1999).

In vWF-defizienten Mäusen konnte unter niedrigem Scherstress kein okklusiver Thrombus gebildet werden (Chauhan *et al.*, 2007). Während der initiale Kontakt zwischen Thrombozyten und vWF unter hohem Scherstress allerdings strikt von der Interaktion zwischen GPIIb/IIIa und vWF abhängig ist (Reininger 2008; Ruggeri, 2003; Furlan 1996), konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Scherraten nur vWF und nicht GPIIb/IIIa essentiell für die Thrombusbildung ist (Chauhan *et al.*, Savage *et al.*, 1998). Wie auch beim P-Selektin existieren keine *in vivo* Daten über die Rolle des vWF im Verlauf einer EHEC-Infektion. Allerdings ist der Übersicht der hier gezeigten Ergebnisse und unter der Voraussetzung, dass EspPα während der Infektion exprimiert wird, folgendes Szenario denkbar: EspPα verstärkt allein oder in Synergie mit weiteren Virulenzfaktoren die auftretenden vaskulären Schäden durch Störung der Thrombusbildung. Dabei würde sich die Beeinträchtigung der Thrombozytenadhäsion bei den Schädigungen kleiner Blutgefäße besonders stark auswirken, da unter niedrigen Scherraten allein vWF entscheidend notwendig für die Thrombozytenadhäsion ist (siehe oben). Weiterhin wäre dieser Effekt wahrscheinlich auf den Gastrointestinaltrakt begrenzt, da es keine Anhaltspunkte über einen möglichen Transport von EspPα in andere Organsysteme gibt.

### 5.3 Fibronektin

Fibronektin befindet sich ebenfalls in den α-Granula von Thrombozyten und vermittelt zahlreiche wichtige Funktionen, z.B. die Zelladhäsion. In der Literatur sind alternative Formen des Fibronektins beschrieben (Cho und Mosher 2006). Da sich die Zusammensetzung der Fibronektin-Isoformen, je nachdem ob sie beispielsweise durch Hepatozyten oder Megakaryozyten synthetisiert wurden, unterscheiden kann (Schick *et al.*, 1996), wurde neben gereinigtem Fibronektin Fibronektin aus Thrombozytenüberständen und humanem Plasma untersucht. Zusätzlich sollte wie bei vWF überprüft werden, ob sich Fibronektin in weitgehend physiologischer Umgebung spalten lässt. Darüber hinaus wurde analog zu vWF die Funktion von Fibronektin nach EspPα Inkubation mit Hilfe von Flusskammer-Experimenten untersucht.

Die Western Blot und SDS-PAGE Analysen zeigen, dass Fibronektin von EspPα gespalten wird.

---

Bei den Versuchen zur Proteolyse von Fibronectin fällt auf, dass nur beim gereinigten Fibronectin eine vollständige Spaltung der beiden Fibronectinbanden auftritt. Ob eine vollständige Spaltung aus Thrombozytenüberständen erfolgt, kann mit Hilfe der Western Blot Analyse nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Zwar verschwindet die Bande bei 220 kDa, die Bandenintensität bei 180 kDa wird jedoch stärker. Dies könnte auf ein Abbruchfragment hindeuten, welches dieselbe Größe wie die ursprüngliche Fibronectin-Bande hat und die 180 kDa-Bande überdecken würde. Im Inkubationsansatz mit humanem Plasma bleibt die Bande bei 220 kDa zum Teil erhalten. Als proteolytisches Abbruchfragment entsteht ein Doppelbande bei ca. 180 bzw. 160 kDa. Somit ist anzunehmen, dass Fibronectin ähnlich wie bei vWF in Plasma nur unvollständig gespalten werden kann. Die Anwesenheit inhibitorischer Moleküle ist auch hier als eine mögliche Ursache neben der Anwesenheit weiterer Substrate von EspP $\alpha$  in Betracht zu ziehen. Weiterhin stellt sowohl Fibronectin aus Thrombozytenüberständen als auch Fibronectin aus Plasma ein Substrat für EspP $\alpha$  dar. Allerdings existieren über 20 verschiedene Isoformen des Proteins (Pankov *et al.*, 2002) und mit Hilfe der durchgeführten Versuche kann nicht geklärt werden, welche Spleißvarianten im Einzelnen durch EspP $\alpha$  gespalten werden. Hierzu wäre z.B. eine massenspektrometrische Analyse nötig.

Die Flusskammer-Experimente belegen, dass gereinigtes, an Glaskapillaren gebundenes Fibronectin, nach EspP $\alpha$ -Inkubation keine Thrombozyten mehr binden kann. Die Spaltung von Fibronectin führt offenbar zu einem Funktionsverlust des Proteins. In der Literatur sind Flusskammer-Experimente mit immobilisiertem Fibronectin beschrieben und diese belegen, dass Fibronectin die Anheftung und Ausbreitung von Thrombozyten *in vitro* hauptsächlich unter niedrigem Scherstress unterstützt (Beumer *et al.*, 1994). In weiteren Flusskammermodellen konnte gezeigt werden, dass Plasma-Fibronectin nicht nur bei der Adhäsion von Thrombozyten sondern auch für das Thrombuswachstum von Bedeutung ist (Bastida *et al.*, 1987).

Im Rahmen dieser Untersuchungen ist nur eine eingeschränkte Aussage über eine mögliche physiologische Bedeutung der Spaltung von Fibronectin durch EspP $\alpha$  möglich. So wäre es denkbar, dass EspP $\alpha$  auch hier allein oder in Synergie mit weiteren Virulenzfaktoren die auftretenden vaskulären Schäden forciert, da Fibronectin insbesondere bei niedrigen Scherraten die Thrombozytenadhäsion und die Ausbreitung der Thrombozyten unterstützt und für das Thrombuswachstum wichtig ist. Vermutlich würden vaskuläre Schäden sogar noch weiter verstärkt werden, da sowohl vWF als auch Fibronectin bei der Rekrutierung von Thrombozyten zu Stellen vaskulärer

---

Läsionen eine wichtige Rolle spielen und beide Proteine durch EspP $\alpha$  in ihrer Funktion zumindest eingeschränkt sind. So wären auch hier besonders die kleineren Blutgefäße, in denen die Scherraten niedriger sind, betroffen. Genau wie bei vWF wäre dieser Effekt auf den Gastrointestinaltrakt begrenzt, da keine Anhaltspunkte über einen möglichen Transport von EspP $\alpha$  in andere Organsysteme vorliegen (siehe oben).

#### 5.4 Fibrinogen

Wie Fibronectin befindet sich Fibrinogen in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten und vermittelt unter anderem die Zelladhäsion und Fibrinbildung. Es ist ein Heterohexamer bestehend aus zwei symmetrischen Teilen, die aus je einer  $\alpha$ -Kette,  $\beta$ -Kette und einer  $\gamma$ -Kette bestehen. Über Disulfidbrücken sind beide Teile miteinander verknüpft.

Genau wie bei den SDS-PAGE und Western Blot Analysen von Fibronectin erkennt man im Polyacrylamidgel zahlreiche Banden des gereinigten Fibrinogens und es werden mehrere unterschiedliche Banden vom polyklonalen anti-Fibrinogen Antikörper erkannt. Analog zum Fibronectin existieren zahlreiche Isoformen des Proteins. Im menschlichen Plasma konnten sogar weit über 100 Isoformen nachgewiesen werden, die auf alternativen Spleißregionen, extensiven posttranslationalen Modifikationen und Polymorphismen der Polypeptidketten (Herrick *et al.*, 1999) beruhen. Dies würde das Auftreten der vielen unterschiedlichen Banden desselben Proteins erklären und erschwert gleichzeitig die Untersuchung der proteolytischen Spaltung durch EspP $\alpha$ . Es ist keine zweifelsfreie Bestimmung von Anzahl und Größe der Abbruchfragmente möglich. Da sich jedoch das Bandenmuster von Fibrinogen nach EspP $\alpha$ -Inkubation deutlich von den Kontrollen unterscheidet, zeigen die Ergebnisse, dass gereinigtes und im Plasma befindliches Fibrinogen durch EspP $\alpha$  gespalten werden können. Von besonderem Interesse ist die deutliche Bandenabschwächung bei 50 und 70 kDa, da es sich hierbei um den Größenbereich der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, den Monomeren des Fibrinogens, handelt.

Die funktionelle Überprüfung von Fibrinogen erfolgte ebenfalls mit Hilfe der bereits beschriebenen Flusskammer-Experimente. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation von immobilisiertem Fibrinogen mit EspP $\alpha$  dazu führt, dass keine Thrombozyten aus dem Blutstrom an das Protein binden können. Für die Thrombozytenadhäsion sind im Wesentlichen bestimmte Sequenzen in der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Domäne verantwortlich (Bennett *et al.*, 2001). Dementsprechend würden diese Daten mit den Ergebnissen des Western

---

Blots korrelieren, da EspP $\alpha$  vermutlicherweise in Bereichen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten spalten kann. *In vitro*-Flusskammer-Experimente zur Rolle des Fibrinogens bei der Thrombozytenadhäsion unter niedrigem Scherstress sind in ähnlicher Weise bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Zaidi *et al.*, 1996; Loncar *et al.*, 2006 und 2007). Darüber hinaus konnte in einem *in vitro*-Flusskammermodell gezeigt werden, dass unter niedrigem bis moderatem Scherstress die Adhäsion von Thrombozyten an Fibrinogen stärker als bei hohen Scherraten ist (Zaidi *et al.*, 1996). Über die Bedeutung von Fibrinogen als Thrombozytenrezeptor unter niedrigem Scherstress *in vivo* existieren bislang keine Informationen. Wie schon bei von Willebrand-Faktor und bei Fibronectin kann bei der derzeitigen Datenlage keine Aussage über die möglichen Auswirkungen einer Spaltung von Fibrinogen durch EspP $\alpha$  unter *in vivo*-Bedingungen getroffen werden. Die bisher veröffentlichten Experimente in der Literatur dokumentieren allerdings einen Beitrag von Fibrinogen zur Thrombozytenadhäsion.

## 5.5 Thrombospondin-1

Das trimere, 450 kDa große Glykoprotein Thrombospondin-1 findet sich sowohl in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten als auch in humanem Plasma. Die Ähnlichkeit zu den bisher identifizierten Substraten für EspP $\alpha$  in Bezug auf Speicherort und Funktion waren das Auswahlkriterium für die Untersuchung von TSP-1 als Substrat. TSP-1 erfüllt zahlreiche Aufgaben z.B. der Zelladhäsion, Angiogenese und Entzündung. Von besonderem Interesse ist hier seine Funktion der Plättchenaggregation (Bonney *et al.*, 2008) und Plättchenadhäsion (Jurk *et al.*, 2003).

Die Versuchsergebnisse zur Western Blot-Analyse mit TSP-1 belegen die Spaltung des gereinigten Proteins durch EspP $\alpha$ . Der Nachweis einer Spaltung von TSP-1 in humanem Plasma gelang wie erwartet nicht, da die Konzentration von TSP-1 mit 60 bis 300 ng/mL im Plasma sehr niedrig ist. Da für die Inkubation unter den gegebenen Versuchsbedingungen mit EspP $\alpha$  nur 1 mL Plasma eingesetzt werden konnte und wiederum davon nur ein geringer Anteil für den Western Blot eingesetzt werden kann, ist TSP-1 mit dem angewendeten Detektionssystem nicht nachweisbar. So gelang nur der Nachweis einer Spaltung von TSP-1 aus Thrombozytenüberständen. Dementsprechend war zwar keine Inkubation mit EspP $\alpha$  in weitgehend physiologischer Umgebung des Substrates möglich, aber die Spaltung von sezerniertem TSP-1 aus den  $\alpha$ -Granula belegt eine Spaltung von nativem TSP-1.

---

Eine funktionelle Beeinträchtigung von TSP-1 mit Hilfe von Flusskammer-Experimenten konnte nicht überprüft werden, da bereits in mehrfach wiederholten Flusskammer-Experimenten, bei denen nur mit PBS vorinkubiert wurde, keine Thrombozytenadhäsion gemessen werden konnte. Für das Versagen des Tests kommen unterschiedliche Ursachen in Betracht. Es wurde berichtet, dass in  $\text{Ca}^{2+}$ -armer Umgebung wie Citratplasma die Adhäsion von Thrombozyten bis zu 70% inhibiert wird (Agbanyo *et al.*, 1993). Allerdings wurde bei den hier durchgeführten Flusskammer-Experimenten überhaupt keine Adhäsion von Thrombozyten an TSP-1 beobachtet. Zusätzlich wurde der Versuch auch mit heparinisiertem Blut durchgeführt wobei ebenfalls keine Thrombozytenadhäsion beobachtet werden konnte. Abgesehen von dem Mangel an Calcium wäre es denkbar, dass die Beschichtung mit TSP-1 nicht funktioniert hat. Da allerdings die Immobilisierung von TSP-1 auf Glasoberflächen in sehr ähnlicher Weise und mit gleichen Konzentrationen für Versuche zur Thrombozytenadhäsion bereits mehrfach in der Literatur beschrieben wurde (Onitsuka *et al.*, 2001; Jurk *et al.*, 2003) erscheint diese Möglichkeit als eher unwahrscheinlich. Darüber hinaus handelt es sich bei Thrombospondin-1 um ein Protein, welches besonders gut an Glasoberflächen haften kann. Es musste für die Versuche in silylierten Glasgefäßen aufbewahrt werden, da die Lagerung in normalen Glas- bzw. Kunststoffbehältern zu hohen Proteinverlusten führte. Es wäre allerdings denkbar, dass Thrombospondin-1 an andere Materialien adhärert hat, bevor es in die Flusskammer gelangt ist. Inadäquate Versuchsbedingungen wie z.B. zu hoher Scherstress können ausgeschlossen werden, da die Adhäsion von Plättchen an Thrombospondin-1 als „extrem fest“ beschrieben wird und auch bei einer Scherrate von 4000  $\text{s}^{-1}$  keine Ablösung der Thrombozyten erkennbar ist (Jurk *et al.*, 2003).

## 5.6 Vitronektin

Vitronektin befindet sich in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten sowie in humanem Plasma in einer Konzentration von 200 bis 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Barnes *et al.*, 1983) und ist unter anderem an der Adhäsion von Plättchen beteiligt. Das Protein existiert in 2 Varianten, der einzelkettigen Form mit einer Größe von 75 kDa und einer „clipped“ Form, die aus zwei Ketten von 65 kDa und 10 kDa besteht.

Die Western Blot-Analyse von humanem Plasma zeigt, dass EspP $\alpha$  Vitronektin nicht spalten kann. Es sind lediglich beide Formen des Proteins anhand ihrer unterschiedlichen Größe im Western Blot identifizierbar. Bei allen zuvor untersuchten

---

Proteinen zeigte sich, dass die Spaltung des jeweiligen Proteins in Plasma unvollständig bzw. deutlich geringer ausgeprägt war, so dass dieser Aspekt auch bei Vitronektin nicht außer Acht gelassen werden darf. Allerdings wäre im Fall einer Spaltung zumindest eine zusätzliche Abbruchbande zu erwarten. Somit ist es wahrscheinlicher, dass Vitronektin aufgrund spezifischer Proteineigenschaften nicht gespalten werden kann.

## 5.7 Zytotoxizität von EspP $\alpha$

Djafari und Mitarbeiter beschreiben eine zytotoxische Wirkung von EspP auf Vero-Zellen. Sie berichten von einem Verlust der Stressfasern, defekten Zell-Zellkontakten und sogar von der Ablösung der Zellen vom Substrat nach 10- stündiger Inkubationszeit mit EspP bzw. pssA, wie EspP in dieser Arbeit bezeichnet wurde (Djafari *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu konnte von Dutta und Mitarbeitern (2002) keine zytotoxische Wirkung von EspP auf HEP-2-Zellen beobachtet werden. Die Beurteilung der Zytotoxizität erfolgte ebenfalls über die morphologische Begutachtung der Zellen nach 5-stündiger Inkubation mit verschiedenen Autotransportern. Es konnte keine Ablösung der Zellen vom Substrat nach EspP-Inkubation beobachtet werden (Dutta *et al.*, 2002). Übereinstimmend mit den Daten von Dutta und Mitarbeitern zeigt EspP $\alpha$  mit Hilfe des durchgeführten Zellproliferationstests mit HBMECS (*Human brain microvascular endothelial cells*) und ähnlichen eingesetzten EspP-Konzentrationen (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) keine zytotoxische Wirkung. Im Unterschied zu den bereits zitierten Arbeiten wurde die Zytotoxizität von EspP $\alpha$  mit Hilfe der metabolischen Aktivität der Endothelzellen und nicht morphologisch mittels Immunfluoreszenz beurteilt. Allerdings konnte auch nach 30 Stunden und somit einer dreifach längeren Inkubationszeit als bei Djafari und Mitarbeitern lichtmikroskopisch keine Ablösung der Endothelzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist unbekannt, in welcher Konzentration bei Djafari *et al.* EspP bzw., pssA eingesetzt wurde, da mit dem gefällten Gesamtproteingehalt aus Bakterienüberständen gearbeitet wurde. Ebenfalls ist zu beachten, dass sowohl bei allen Tests unterschiedliche Zellen, nämlich Vero-Zellen, HEP-2 und HBMEC eingesetzt wurden, was möglicherweise zu der Entstehung widersprüchlicher Ergebnisse beitragen kann.

---

## 5.8 Schlussbemerkungen und Ausblick

In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse und Literaturdaten kann vermutet werden, dass EHEC, die in der Lage sind P-Selektin und Faktoren der humanen Blutgerinnung zu spalten, in Bezug auf ihre Virulenz Vorteile haben können. Hierzu würden dann die verbesserte Eisenaufnahme durch die Bakterien bei anhaltenden Blutungen oder eine mögliche Schwächung der Immunabwehr gehören. In der Literatur ist zunehmend die Verknüpfung von Hämostase und Entzündung belegt (van Gils *et al.*, 2009) und eine denkbare Schwächung dieser Prozesse würde diesen EHEC möglicherweise einen Selektionsvorteil bieten. Die mögliche Interaktion mit der Hämostase und der Immunabwehr könnte demnach auf diejenigen Serotypen beschränkt sein, die aktives EspP $\alpha$  sezernieren.

In der frühen Phase eines HUS kommt es zu einer umfassenden prothrombotischen Aktivierung (Chandler *et al.*, 2002) und es konnten erhöhte Spiegel proinflammatorischer Zytokine bei Patienten mit hämorrhagischer Kolitits gemessen werden (Fitzpatrick *et al.*, 1992; Westerholt *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu existierten *in vitro*-Daten, welche eine verminderte Immunantwort bei einer EHEC-Infektion belegen (Hauf *et al.*, 2003; Ceponis *et al.*, 2003). Diese Literaturdaten zeigen, dass die mögliche Interaktion von EspP $\alpha$  allein oder im Zusammenspiel mit weiteren Virulenzfaktoren mit der Entzündungsantwort und der Hämostase stark in Bezug auf Zeit und Ort variieren können. Aus diesem Grund ist es notwendig, in komplexeren Modellsystemen die Interaktion von EspP $\alpha$  mit den bereits identifizierten Substraten und potentielle Interaktionen von Virulenzfaktoren der STEC zu untersuchen. Damit einhergehend ist es notwendig, die Regulation und Expression von EspP $\alpha$  während der Pathogenese einer STEC Infektion zu analysieren. Von besonderer Bedeutung wäre in diesem Zusammenhang, ob bestimmte Stimuli der Hämostase und Entzündungsantwort des Wirtes Einfluss auf die Expression von EspP $\alpha$  haben, welches die Bedeutung von EspP $\alpha$  im Infektionsprozess bekräftigen würde.

Ein besseres Verständnis über die genaue Bedeutung der Virulenzfaktoren allein oder im Zusammenwirken miteinander könnte möglicherweise die Entwicklung neuer präventiver und therapeutische Ansätze ermöglichen.

---

## 6. Verzeichnis der Abkürzungen

|                  |  |
|------------------|--|
| µL               | Mikroliter   |
| µM               | Mikromolar   |
| A/E              | <i>Attaching/Effacing</i>  |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat   |
| BCIP             | 5-Brom-4-Chloro-3`-Indolylphosphat p-Toluidinsalz                |
| bp               | Basenpaar  |
| BSA              | Rinderserumalbumin   |
| CDT              | <i>Cytolethal Distending Toxin</i>                               |
| cm               | Zentimeter   |
| Da               | Dalton   |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid   |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure   |
| eae <i>e.col</i> | <i>attaching and effacing</i> Strukturgen                        |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat   |
| EfaI EHEC        | <i>factor for adherence</i>                                      |
| EHEC-Hly         | EHEC-Hämolyisin  |
| ehc-hly          | EHEC-Hämolyisin Strukturgen                                      |
| ELISA            | <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>                         |
| esp              | <i>e.coli secreted protein</i> Strukturgen                       |
| EspP             | <i>Extracellular serine protease Plasmid encoded</i>             |
| espp             | <i>extracellular serine protease plasmid encoded</i> Strukturgen |
| FN               | Fibronektin  |
| FPLC             | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>                        |
| g                | Gramm  |
| <i>g</i>         | <i>g</i> -Zahl   |
| Gb3              | Globotriaosylceramid   |
| HBMEC            | <i>Human Brain Microvascular Endothelial Cells</i>               |
| HC               | Hämorrhagische Colitis   |
| HEPES            | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-Ethansulfonsäure                  |
| HUS              | Hämolytisch urämisches Syndrom                                   |
| IfSG             | Infektionsschutzgesetz   |
| Iha              | <i>IrgA homologue adhesin</i>                                    |

---

|              |   |
|--------------|---|
| kDa          | Kilodalton  |
| L            | Liter   |
| LB           | Luria Bertani   |
| LEE          | <i>Locus of Enterocyte Effacement</i>                                       |
| lpf          | <i>long polar fimbriae</i> Strukturgen                                      |
| Lpf          | <i>Long polar fimbriae</i>  |
| LPS          | Lipopolysaccharid   |
| M            | Molar   |
| mA           | Milliampere   |
| MALDI-TOF-MS | Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Time of Flight-Massspectrometry |
| MDa          | Megadalton  |
| mg           | Milligramm  |
| Min          | Minute  |
| mL           | Milliliter  |
| NBT          | 4-Nitrotetrazolium-Chloridblau-Hydrat                                       |
| OmpA         | <i>Outer membrane Protein A</i>   |
| ORF          | <i>Open Reading Frame</i>   |
| PAI-1        | <i>Plasminogen Activator Inhibitor</i>                                      |
| PAI          | <i>Pathogenicity Island</i>   |
| PBS          | <i>Phosphate Buffered Saline</i>  |
| PCR          | <i>Polymerase Chain Reaction</i>  |
| PMSF         | Phenylmethysulfonyl-Fluorid   |
| PSGL-1       | <i>P-Selectin Glycoprotein Ligand</i>                                       |
| PssA         | <i>Protease secreted by STEC</i>  |
| PVDF         | Polyvinylidifluorid   |
| RIPA         | <i>Radioimmunoprecipitation</i>   |
| RNA          | Ribonucleinsäure  |
| RTX          | <i>Repeat-in-Toxin</i>  |
| Saa STEC     | Autoagglutinin Adhäsın  |
| SDS          | Natriumdodecylsulfat  |
| sfa          | <i>s fimbriae major subunit</i> Strukturgen                                 |
| sfp          | <i>sorbitol fermenting ehec O157 fimbriae plasmid encoded</i> Strukturgen   |
| Sfp          | <i>Sorbitol Fermenting EHEC O157 fimbriae plasmid encoded</i>               |

---

|               |   |
|---------------|---|
| SMAC          | Sorbitol McConckey  |
| SPATE         | <i>Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae</i> |
| STEC          | Shiga Toxin-produzierende <i>Escherichia Coli</i>             |
| Stx           | Shiga Toxin   |
| stx           | Shiga Toxin Strukturgen                                       |
| TBS           | <i>Tris Buffered Saline</i>                                   |
| TBS-T         | <i>Tris Buffered Saline-Tween</i>                             |
| TCA           | Trichloressigsäure  |
| TEMED         | Tetramethylethlendiamin                                       |
| Tir           | <i>Translocated intimin receptor</i>                          |
| TK            | Thrombozytenkonzentrat  |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor alpha                                      |
| ToxB          | Toxin B   |
| Tris          | Trishydroxymethylaminomethan                                  |
| TSP-1         | Thrombospondin-1  |
| UPM           | Umdrehungen pro Minute  |
| VN            | Vitronektin   |
| vWF           | von Willebrand-Faktor   |

---

## 7. Literaturverzeichnis

- Agbanyo FR, Sixma JJ, de Groot PG, Languino LR, Plow EF. Thrombospondin-platelet interactions. Role of divalent cations, wall shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *J Clin Invest.* 1993;92:288-296
- Aldick T, Bielaszewska M, Zhang W, Brockmeyer J, Schmidt H, Friedrich AW, Kim KS, Schmidt MA, Karch H. Hemolysin from Shiga toxin-negative Escherichia coli O26 strains injures microvascular endothelium. *Microbes Infect.* 2007;9:282-290
- Aldick T, Bielaszewska M, Uhlin BE, Humpf HU, Wai SN, Karch H. Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic Escherichia coli haemolysin. *Mol Microbiol.* 2009;71:1496-1508
- Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004;126:298-306
- Andreoli SP, Trachtman H, Acheson DW, Siegler RL, Obrig TG. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. *Pediatr Nephrol.* 2002;17:293-298
- Asch AS, Nachman RL. Thrombospondin: phenomenology to function. *Prog Hemost Thromb.* 1989;9:157-176
- Asch E, Podack E. Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1990;85:1372-1378
- Badimon L, Badimon JJ, Turitto VT, Fuster V. Role of von Willebrand factor in mediating platelet-vessel wall interaction at low shear rate; the importance of perfusion conditions. *Blood.* 1989;73:961-967
- Barnard TJ, Dautin N, Lukacik P, Bernstein HD, Buchanan SK. Autotransporter structure reveals intra-barrel cleavage followed by conformational changes. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:1214-1220
- Barnes DW, Silnutzer J, See C, Shaffer M. Characterization of human serum spreading factor with monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:1362-1366

- 
- Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Sixma JJ. Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood*. 1987;70:1437-1442
- Bastida E, Escolar G, Ordinas A, Sixma JJ. Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood*. 1987;70:1437-1442
- Bauer ME, Welch RA. Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1996;64:167-175
- Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, Bartleson CA, Lewis JH, Barrett TJ, Wells JG, *et al*. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *The Washington experience*. *Jama*. 1994;272:1349-1353
- Bereczky Z, Katona E, Muszbek L. Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33:430-437
- Bettelheim KA. The non-O157 shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. *Crit Rev Microbiol*. 2007;33:67-87
- Beumer S, MJ IJ, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood*. 1994;84:3724-3733
- Beumer S, Heijnen HF, MJ IJ, Orlando E, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood*. 1995;86:3452-3460
- Beutin L, Prada J, Zimmermann S, Stephan R, Orskov I, Orskov F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *E. coli* (EPEC). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 1988;267:576-588
- Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheutz F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven

- 
- different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol.* 1993;31:2483-2488
- Beutin L, Stroehler UH, Manning PA. Isolation of enterohemolysin (Ehly2)-associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene.* 1993;132:95-99
- Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989;243:1160-1165
- Bielaszewska M, Clarke I, Karmali MA, Petric M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun.* 1997;65:2509-2516
- Bielaszewska M, Fell M, Greune L, Prager R, Fruth A, Tschape H, Schmidt MA, Karch H. Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. *Infect Immun.* 2004;72:1812-1816
- Bielaszewska M, Karch H. Consequences of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infection for the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 2005;94:312-318
- Bielaszewska M, Friedrich AW, Aldick T, Schurk-Bulgrin R, Karch H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1160-1167
- Bielaszewska M, Kock R, Friedrich AW, von Eiff C, Zimmerhackl LB, Karch H, Mellmann A. Shiga toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? *PLoS One.* 2007;2:e1024
- Bielaszewska M, Prager R, Vandivinit L, Musken A, Mellmann A, Holt NJ, Tarr PI, Karch H, Zhang W. Detection and characterization of the fimbrial sfp cluster in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O165:H25/NM isolates from humans and cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:64-71

- 
- Bitzan M, Karch H. Serological methods for the detection of STEC infections. *Methods Mol Med.* 2003;73:27-43
- Board PG, Losowsky MS, Miloszewski KJ. Factor XIII: inherited and acquired deficiency. *Blood Rev.* 1993;7:229-242
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha v beta 3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med.* 1998;187:329-339
- Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood.* 1989;73:1109-1112
- Bonnefoy A, Hantgan R, Legrand C, Frojmovic MM. A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. *J Biol Chem.* 2001;276:5605-5612
- Bonnefoy A, Moura R, Hoylaerts MF. The evolving role of thrombospondin-1 in hemostasis and vascular biology. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65:713-727
- Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 1989;51:207-210
- Brockmeyer J, Bielaszewska M, Fruth A, Bonn ML, Mellmann A, Humpf HU, Karch H. Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: distribution, secretion, and proteolytic activity. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:6351-6359
- Brown JE, Bosak JO. An ELISA test for the binding of von Willebrand antigen to collagen. *Thromb Res.* 1986;43:303-311
- Brunder W, Khan AS, Hacker J, Karch H. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun.* 2001;69:4447-4457

- 
- Cambien B, Wagner DD. A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med.* 2004;10:179-186
- Caprioli A, Nigrelli A, Gatti R, Zavanella M, Blando AM, Minelli F, Donelli G. Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in northern Italy. *Vet Rec.* 1993;133:323-324
- Ceponis PJ, McKay DM, Ching JC, Pereira P, Sherman PM. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 disrupts Stat1-mediated gamma interferon signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun.* 2003;71:1396-1404
- Chandler WL, Jelacic S, Boster DR, Ciol MA, Williams GD, Watkins SL, Igarashi T, Tarr PI. Prothrombotic coagulation abnormalities preceding the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2002;346:23-32
- Chandy T, Mooradian DL, Rao GH. Platelet adhesion and spreading on protein-coated surfaces: variations in behavior in washed cells, PRP, and whole blood. *J Biomater Appl.* 1998;13:46-65
- Chauhan AK, Goerge T, Schneider SW, Wagner DD. Formation of platelet strings and microthrombi in the presence of ADAMTS-13 inhibitor does not require P-selectin or beta3 integrin. *J Thromb Haemost.* 2007;5:583-589
- Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG. Identification of cdtB homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol.* 2000;49:525-534
- Cho J, Mosher DF. Role of fibronectin assembly in platelet thrombus formation. *J Thromb Haemost.* 2006;4:1461-1469
- Chong DC, Paton JC, Thorpe CM, Paton AW. Clathrin-dependent trafficking of subtilase cytotoxin, a novel AB5 toxin that targets the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Cell Microbiol.* 2008;10:795-806
- Chung MC, Popova TG, Jorgensen SC, Dong L, Chandhoke V, Bailey CL, Popov SG. Degradation of circulating von Willebrand factor and its regulator ADAMTS13

- 
- implicates secreted *Bacillus anthracis* metalloproteases in anthrax consumptive coagulopathy. *J Biol Chem.* 2008;283:9531-9542
- da Costa Martins P, Garcia-Vallejo JJ, van Thienen JV, Fernandez-Borja M, van Gils JM, Beckers C, Horrevoets AJ, Hordijk PL, Zwaginga JJ. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1023-1029
- Dautin N, Barnard TJ, Anderson DE, Bernstein HD. Cleavage of a bacterial autotransporter by an evolutionarily convergent autocatalytic mechanism. *Embo J.* 2007;26:1942-1952
- Dautin N, Bernstein HD. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol.* 2007;61:89-112
- Dixit VM, Haverstick DM, O'Rourke K, Hennessy SW, Broekelmann TJ, McDonald JA, Grant GA, Santoro SA, Frazier WA. Inhibition of platelet aggregation by a monoclonal antibody against human fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82:3844-3848
- Djafari S, Ebel F, Deibel C, Kramer S, Hudel M, Chakraborty T. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1997;25:771-784
- Dole VS, Bergmeier W, Mitchell HA, Eichenberger SC, Wagner DD. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling *in vivo*: role of P-selectin. *Blood.* 2005;106:2334-2339
- Donadelli R, Orje JN, Capoferri C, Remuzzi G, Ruggeri ZM. Size regulation of von Willebrand factor-mediated platelet thrombi by ADAMTS13 in flowing blood. *Blood.* 2006;107:1943-1950
- Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling *in vivo*. *Blood.* 1993;82:1308-1316
- Doughty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in

- 
- locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002;70:6761-6769
- Dutta PR, Cappello R, Navarro-Garcia F, Nataro JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun*. 2002;70:7105-7113
- Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem*. 1988;171:45-50
- Evangelista V, Manarini S, Sideri R, Rotondo S, Martelli N, Piccoli A, Totani L, Piccardoni P, Vestweber D, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b/CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*. 1999;93:876-885
- Falguieres T, Mallard F, Baron C, Hanau D, Lingwood C, Goud B, Salamero J, Johannes L. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2453-2468
- Favaloro EJ, Grispo L, Exner T, Koutts J. Development of a simple collagen based ELISA assay aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II, von Willebrand's disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1991;2:285-291
- Fitzpatrick MM, Shah V, Trompeter RS, Dillon MJ, Barratt TM. Interleukin-8 and polymorphoneutrophil leucocyte activation in hemolytic uremic syndrome of childhood. *Kidney Int*. 1992;42:951-956
- Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M, Deng MY. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2188-2191

- 
- Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Platelets roll on stimulated endothelium *in vivo*: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7450-7454
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, Karch H. Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis*. 2002;185:74-84
- Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, Xu JG, Tschape H, Karch H. Cytotoxic distending toxin in Escherichia coli O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1844-1846
- Furlan M. Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann Hematol*. 1996;72:341-348
- Gerber A, Karch H, Allerberger F, Verweyen HM, Zimmerhackl LB. Clinical course and the role of shiga toxin-producing Escherichia coli infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospective study. *J Infect Dis*. 2002;186:493-500
- Ginsberg MH, Plow EF, Forsyth J. Fibronectin expression on the platelet surface occurs in concert with secretion. *J Supramol Struct Cell Biochem*. 1981;17:91-98
- Grif K, Dierich MP, Karch H, Allerberger F. Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic Escherichia coli O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1998;17:761-766
- Gyles CL. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *J Anim Sci*. 2007;85:E45-62
- Haberichter SL, Shi Q, Montgomery RR. Regulated release of vWF and FVIII and the biologic implications. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:547-553
- Habib NF, Jackson MP. Identification of a B subunit gene promoter in the Shiga toxin operon of Shigella dysenteriae 1. *J Bacteriol*. 1992;174:6498-6507

- 
- Hancock DD, Besser TE, Kinsel ML, Tarr PI, Rice DH, Paros MG. The prevalence of Escherichia coli O157.H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiol Infect.* 1994;113:199-207
- Handagama P, Rappolee DA, Werb Z, Levin J, Bainton DF. Platelet alpha-granule fibrinogen, albumin, and immunoglobulin G are not synthesized by rat and mouse megakaryocytes. *J Clin Invest.* 1990;86:1364-1368
- Hantgan RR, Hindriks G, Taylor RG, Sixma JJ, de Groot PG. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb:IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. *Blood.* 1990;76:345-353
- Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7:52-62
- Hauf N, Chakraborty T. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing Escherichia coli. *J Immunol.* 2003;170:2074-2082
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:692-744
- Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. *Int J Med Microbiol.* 2004;294:115-121
- Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999;31:741-746
- Houdijk WP, Sakariassen KS, Nievelstein PF, Sixma JJ. Role of factor VIII-von Willebrand factor and fibronectin in the interaction of platelets in flowing blood with monomeric and fibrillar human collagen types I and III. *J Clin Invest.* 1985;75:531-540
- Hurley BP, Thorpe CM, Acheson DW. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun.* 2001;69:6148-6155

- 
- Ieva R, Skillman KM, Bernstein HD. Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol.* 2008;67:188-201
- Ieva R, Skillman KM, Bernstein HD. Incorporation of a polypeptide segment into the beta-domain pore during the assembly of a bacterial autotransporter. *Mol Microbiol.* 2008;67:188-201
- Inward CD, Howie AJ, Fitzpatrick MM, Rafaat F, Milford DV, Taylor CM. Renal histopathology in fatal cases of diarrhoea-associated haemolytic uraemic syndrome. *British Association for Paediatric Nephrology. Pediatr Nephrol.* 1997;11:556-559
- Jacewicz MS, Acheson DW, Binion DG, West GA, Lincicome LL, Fiocchi C, Keusch GT. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infect Immun.* 1999;67:1439-1444
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. Immunologie. 5.Auflage. 2002 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Karch H. Identification and distribution of the enterohemorrhagic Escherichia coli factor for adherence (efa1) gene in sorbitol-fermenting Escherichia coli O157: H. *Int J Med Microbiol.* 2002;292:207-214
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun.* 2003;71:3634-3638
- Johnson WM, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Campylobacter spp. *Microb Pathog.* 1988;4:115-126
- Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, Varon D, Sixma JJ, Van Aken H, Kehrel BE. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb J.* 2003;17:1490-1492

- 
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996;88:3259-3287
- Kaper JB. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other attaching and effacing *E. coli*. *Jpn J Med Sci Biol*. 1998;51 Suppl:S101-107
- Karch H, Wiss R, Gloning H, Emmrich P, Aleksic S, Bockemuhl J. [Hemolytic-uremic syndrome in infants due to verotoxin-producing *Escherichia coli*]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1990;115:489-495
- Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H. *J Clin Microbiol*. 1993;31:1200-1205
- Karch H, Bielaszewska M, Bitzan M, Schmidt H. Epidemiology and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1999;34:229-243
- Karch H. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)--associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2001;27:207-213
- Karch H, Friedrich AW, Gerber A, Zimmerhackl LB, Schmidt MA, Bielaszewska M. New aspects in the pathogenesis of enteropathic hemolytic uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32:105-112
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Steele BT. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. *Lancet*. 1983;2:1299-1300
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*. 1983;1:619-620

- 
- Karmali MA, Petric M, Lim C, Fleming PC, Arbus GS, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1985;151:775-782
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1989;2:15-38
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4930-4940
- Karmali MA. Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Mol Biotechnol*. 2004;26:117-122
- Karpman D, Papadopoulou D, Nilsson K, Sjogren AC, Mikaelsson C, Lethagen S. Platelet activation by Shiga toxin and circulatory factors as a pathogenetic mechanism in the hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2001;97:3100-3108
- Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102:1701-1707
- Khan AB, Naim A, Orth D, Grif K, Mohsin M, Prager R, Dierich MP, Wurzner R. Serine protease espP subtype alpha, but not beta or gamma, of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is associated with highly pathogenic serogroups. *Int J Med Microbiol*. 2009;299:247-254
- Kimmitt PT, Harwood CR, Barer MR. Toxin gene expression by shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:458-465
- Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM, Milford DV. Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985-8: association with

- 
- verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. *Arch Dis Child*. 1990;65:722-727
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1977;18:775-779
- Kuczus T, Bielaszewska M, Friedrich AW, Zhang W. A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. *Mol Nutr Food Res*. 2004;48:515-521
- Kum WW, Lee S, Grassl GA, Bidshahri R, Hsu K, Ziltener HJ, Finlay BB. Lack of functional P-selectin ligand exacerbates *Salmonella* serovar typhimurium infection. *J Immunol*. 2009;182:6550-6561
- Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Yoshioka A. Cytosolic calcium changes in a process of platelet adhesion and cohesion on a von Willebrand factor-coated surface under flow conditions. *Blood*. 1999;94:1149-1155
- Lara-Tejero M, Galan JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun*. 2001;69:4358-4365
- Law D. Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *J Appl Microbiol*. 2000;88:729-745
- Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol*. 2006;7:216
- Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med*. 1995;332:1553-1559
- Leung PH, Peiris JS, Ng WW, Robins-Browne RM, Bettelheim KA, Yam WC. A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69:7549-7553
- Lingwood CA. Shiga toxin receptor glycolipid binding. Pathology and utility. *Methods Mol Med*. 2003;73:165-186

- 
- Loncar R, Kalina U, Stoldt V, Thomas V, Scharf RE, Vodovnik A. Antithrombin significantly influences platelet adhesion onto immobilized fibrinogen in an in-vitro system simulating low flow. *Thromb J.* 2006;4:19
- Loncar R, Zotz RB, Sucker C, Vodovnik A, Mihalj M, Scharf RE. Platelet adhesion onto immobilized fibrinogen under arterial and venous in-vitro flow conditions does not significantly differ between men and women. *Thromb J.* 2007;5:5
- Louise CB, Obrig TG. Specific interaction of Escherichia coli O157:H7-derived Shiga-like toxin II with human renal endothelial cells. *J Infect Dis.* 1995;172:1397-1401
- Low AS, Holden N, Rosser T, Roe AJ, Constantinidou C, Hobman JL, Smith DG, Low JC, Gally DL. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Environ Microbiol.* 2006;8:1033-1047
- March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for detection of Escherichia coli O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol.* 1986;23:869-872
- Mazzucato M, Spessotto P, Masotti A, De Appollonia L, Cozzi MR, Yoshioka A, Perris R, Colombatti A, De Marco L. Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem.* 1999;274:3033-3041
- Mellmann A, Bielaszewska M, Zimmerhackl LB, Prager R, Harmsen D, Tschape H, Karch H. Enterohemorrhagic Escherichia coli in human infection: *in vivo* evolution of a bacterial pathogen. *Clin Infect Dis.* 2005;41:785-792
- Mellmann A, Bielaszewska M, Karch H. Intrahost genome alterations in enterohemorrhagic Escherichia coli. *Gastroenterology.* 2009;136:1925-1938
- Melton-Celsa AR, Kokai-Kun JF, O'Brien AD. Activation of Shiga toxin type 2d (Stx2d) by elastase involves cleavage of the C-terminal two amino acids of the A2 peptide in the context of the appropriate B pentamer. *Mol Microbiol.* 2002;43:207-215

- 
- Moon DG, Kaplan JE, Mazurkewicz JE. The inhibitory effect of plasma fibronectin on collagen-induced platelet aggregation. *Blood*. 1986;67:450-457
- Mosesson MW, Umfleet RA. The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *J Biol Chem*. 1970;245:5728-5736
- Mosher DF. Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J Biol Chem*. 1975;250:6614-6621
- Musken A, Bielaszewska M, Greune L, Schweppe CH, Muthing J, Schmidt H, Schmidt MA, Karch H, Zhang W. Anaerobic conditions promote expression of Sfp fimbriae and adherence of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM to human intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:1087-1093
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:142-201
- Ni H, Denis CV, Subbarao S, Degen JL, Sato TN, Hynes RO, Wagner DD. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest*. 2000;106:385-392
- Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol*. 2000;35:275-288
- Nurden AT, Nurden P. A review of the role of platelet membrane glycoproteins in the platelet-vessel wall interaction. *Baillieres Clin Haematol*. 1993;6:653-690
- O'Brien AO, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet*. 1983;1:702
- Okuda J, Kurazono H, Takeda Y. Distribution of the cytolethal distending toxin A gene (*cdtA*) among species of *Shigella* and *Vibrio*, and cloning and sequencing of the *cdt* gene from *Shigella dysenteriae*. *Microb Pathog*. 1995;18:167-172

- 
- Olofsson AM, Arfors KE, Ramezani L, Wolitzky BA, Butcher EC, von Andrian UH. E-selectin mediates leukocyte rolling in interleukin-1-treated rabbit mesentery venules. *Blood*. 1994;84:2749-2758
- Olson JD, Zaleski A, Herrmann D, Flood PA. Adhesion of platelets to purified solid-phase von Willebrand factor: effects of wall shear rate, ADP, thrombin, and ristocetin. *J Lab Clin Med*. 1989;114:6-18
- Onitsuka I, Jung SM, Ikeda H, Imaizumi T, Moroi M. Real-time analysis of the interaction of platelets with immobilized thrombospondin under flow conditions. *Thromb Res*. 2001;101:455-465
- Ostroff SM, Kobayashi JM, Lewis JH. Infections with *Escherichia coli* O157:H7 in Washington State. The first year of statewide disease surveillance. *Jama*. 1999;282:355-359
- Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated *in vivo* by P-selectin on adherent platelets. *Nature*. 1992;359:848-851
- Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002;115:3861-3863
- Park CH, Vandell NM, Hixon DL. Rapid Immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 directly from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1996;34:988-990
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:450-479
- Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun*. 2001;69:6999-7009
- Paton AW, Srimanote P, Talbot UM, Wang H, Paton JC. A new family of potent AB(5) cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. *J Exp Med*. 2004;200:35-46

- 
- Paton AW, Beddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MC, Rossjohn J, Talbot UM, Paton JC. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature*. 2006;443:548-552
- Perna NT, Mayhew GF, Posfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*. 1998;66:3810-3817
- Plow EF, Ginsberg MH. Specific and saturable binding of plasma fibronectin to thrombin-stimulated human platelets. *J Biol Chem*. 1981;256:9477-9482
- Plow EF, McEver RP, Collier BS, Woods VL, Jr., Marguerie GA, Ginsberg MH. Related binding mechanisms for fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor, and thrombospondin on thrombin-stimulated human platelets. *Blood*. 1985;66:724-727
- Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*. 1987;325:458-462
- Polanowska-Grabowska R, Simon CG, Jr., Gear AR. Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrand factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb Haemost*. 1999;81:118-123
- Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V. Molecular analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2118-2128
- Raife T, Friedman KD, Fenwick B. Lepirudin prevents lethal effects of Shiga toxin in a canine model. *Thromb Haemost*. 2004;92:387-393
- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:603-609
- Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D320-325

- 
- Reininger AJ. Function of von Willebrand factor in haemostasis and thrombosis. *Haemophilia*. 2008;14 Suppl 5:11-26
- Ren J, Utsunomiya I, Taguchi K, Ariga T, Tai T, Ihara Y, Miyatake T. Localization of verotoxin receptors in nervous system. *Brain Res*. 1999;825:183-188
- Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12:261-273
- Richardson SE, Karmali MA, Becker LE, Smith CR. The histopathology of the hemolytic uremic syndrome associated with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infections. *Hum Pathol*. 1988;19:1102-1108
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*. 1983;308:681-685
- Robert Koch-Institut B. *Epidemiologisches Bulletin*. 2009;16
- Romer W, Berland L, Chambon V, Gaus K, Windschiegel B, Tenza D, Aly MR, Fraissier V, Florent JC, Perrais D, Lamaze C, Raposo G, Steinem C, Sens P, Bassereau P, Johannes L. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature*. 2007;450:670-675
- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med*. 1999;190:803-814
- Ruggeri ZM, Bader R, de Marco L. Glanzmann thrombasthenia: deficient binding of von Willebrand factor to thrombin-stimulated platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79:6038-6041
- Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest*. 1983;72:1-12

- 
- Ruggeri ZM, Dent JA, Saldivar E. Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood. *Blood*. 1999;94:172-178
- Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost*. 2003;1:1335-1342
- Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ. Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood*. 2006;108:1903-1910
- Ruiz-Perez F, Henderson IR, Leyton DL, Rossiter AE, Zhang Y, Nataro JP. Roles of periplasmic chaperone proteins in the biogenesis of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *J Bacteriol*. 2009;191:6571-6583
- Sandvig K, Garred O, Prydz K, Kozlov JV, Hansen SH, van Deurs B. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature*. 1992;358:510-512
- Santoro SA. Inhibition of platelet aggregation by fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1983;116:135-140
- Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*. 1998;94:657-666
- Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1989;264:596-601
- Scheiring J, Andreoli SP, Zimmerhackl LB. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). *Pediatr Nephrol*. 2008;23:1749-1760
- Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *Apmis*. 2004;112:569-584

- 
- Schick PK, Wojenski CM, Bennett V, Denisova L. Fibronectin isoforms in megakaryocytes. *Stem Cells*. 1996;14 Suppl 1:212-219
- Schmidt H, Karch H, Beutin L. The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;117:189-196
- Schmidt H, Kernbach C, Karch H. Analysis of the EHEC hly operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:h7. *Microbiology*. 1996;142 ( Pt 4):907-914
- Schmidt H, Scheef J, Huppertz H, Frosch M, Karch H. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H(-) strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol*. 1999a;37:3491-3496
- Schmidt H, Bielaszewska M, Karch H. Transduction of enteric *Escherichia coli* isolates with a derivative of Shiga toxin 2-encoding bacteriophage phi3538 isolated from *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 1999b;65:3855-3861
- Schmidt H, Scheef J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:1205-1208
- Sixma JJ, Sakariassen KS, Beeser-Visser NH, Ottenhof-Rovers M, Bolhuis PA. Adhesion of platelets to human artery subendothelium: effect of factor VIII-von Willebrand factor of various multimeric composition. *Blood*. 1984;63:128-139
- Sonntag AK, Bielaszewska M, Mellmann A, Dierksen N, Schierack P, Wieler LH, Schmidt MA, Karch H. Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71:8855-8863
- Spears KJ, Roe AJ, Gally DL. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;255:187-202

- 
- Stel HV, Sakariassen KS, de Groot PG, van Mourik JA, Sixma JJ. Von Willebrand factor in the vessel wall mediates platelet adherence. *Blood*. 1985;65:85-90
- Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*. 1985;101:880-886
- Tarr PI, Bilge SS, Vary JC, Jr., Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel Escherichia coli O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*. 2000;68:1400-1407
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 2005;365:1073-1086
- Tarr PI. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura: distinct mechanisms of pathogenesis. *Kidney Int Suppl*. 2009:S29-32
- Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun*. 2001;69:6660-6669
- Tatsuno I, Mundy R, Frankel G, Chong Y, Phillips AD, Torres AG, Kaper JB. The Ipf gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic Escherichia coli or virulence of Citrobacter rodentium. *Infect Immun*. 2006;74:265-272
- te Loo DM, Monnens LA, van Der Velden TJ, Vermeer MA, Preyers F, Demacker PN, van Den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Binding and transfer of verocytotoxin by polymorphonuclear leukocytes in hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2000;95:3396-3402
- Te Loo DM, van Hinsbergh VW, van den Heuvel LP, Monnens LA. Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12:800-806

- 
- Thurlow PJ, Kenneally DA, Connellan JM. The role of fibronectin in platelet aggregation. *Br J Haematol.* 1990;75:549-556
- Torres AG, Kaper JB. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun.* 2003;71:4985-4995
- Toth I, Herault F, Beutin L, Oswald E. Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new cdt variant (Type IV). *J Clin Microbiol.* 2003;41:4285-4291
- Turitto VT, Weiss HJ, Zimmerman TS, Sussman, II. Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood.* 1985;65:823-831
- Tuszynski GP, Kowalska MA. Thrombospondin-induced adhesion of human platelets. *J Clin Invest.* 1991;87:1387-1394
- Tzipori S, Gunzer F, Donnenberg MS, de Montigny L, Kaper JB, Donohue-Rolfe A. The role of the eaeA gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun.* 1995;63:3621-3627
- Upadhyaya K, Barwick K, Fishaut M, Kashgarian M, Siegel NJ. The importance of nonrenal involvement in hemolytic-uremic syndrome. *Pediatrics.* 1980;65:115-120
- van de Kar NC, van Hinsbergh VW, Brommer EJ, Monnens LA. The fibrinolytic system in the hemolytic uremic syndrome: *in vivo* and *in vitro* studies. *Pediatr Res.* 1994;36:257-264
- van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009;85:195-204
- van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol.* 2009;85:195-204

- 
- van Setten PA, Monnens LA, Verstraten RG, van den Heuvel LP, van Hinsbergh VW. Effects of verocytotoxin-1 on nonadherent human monocytes: binding characteristics, protein synthesis, and induction of cytokine release. *Blood*. 1996;88:174-183
- Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:403-412
- Welch RA, Pellett S. Transcriptional organization of the Escherichia coli hemolysin genes. *J Bacteriol*. 1988;170:1622-1630
- Wells JG, Davis BR, Wachsmuth IK, Riley LW, Remis RS, Sokolow R, Morris GK. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare Escherichia coli serotype. *J Clin Microbiol*. 1983;18:512-520
- Westerholt S, Hartung T, Tollens M, Gustrau A, Oberhoffer M, Karch H, Klare B, Pfeffer K, Emmrich P, Oberhoffer R. Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine*. 2000;12:822-827
- Wohner N. Role of cellular elements in thrombus formation and dissolution. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008;6:224-228
- Wu YP, van Breugel HH, Lankhof H, Wise RJ, Handin RI, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to multimeric and dimeric von Willebrand factor and to collagen type III preincubated with von Willebrand factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:611-620
- Yang J, Furie BC, Furie B. The biology of P-selectin glycoprotein ligand-1: its role as a selectin counterreceptor in leukocyte-endothelial and leukocyte-platelet interaction. *Thromb Haemost*. 1999;81:1-7
- Zaidi TN, McIntire LV, Farrell DH, Thiagarajan P. Adhesion of platelets to surface-bound fibrinogen under flow. *Blood*. 1996;88:2967-2972

---

Zhang W, Bielaszewska M, Kuczius T, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (stx(1c)) in Escherichia coli strains isolated from humans. *J Clin Microbiol.* 2002;40:1441-1446

Zhang W, Bielaszewska M, Pulz M, Becker K, Friedrich AW, Karch H, Kuczius T. New immuno-PCR assay for detection of low concentrations of shiga toxin 2 and its variants. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1292-1297

Zoja C, Corna D, Farina C, Sacchi G, Lingwood C, Doyle MP, Padhye VV, Abbate M, Remuzzi G. Verotoxin glycolipid receptors determine the localization of microangiopathic process in rabbits given verotoxin-1. *J Lab Clin Med.* 1992;120:229-238