

5 Zusammenfassung

Das Oberflächenprotein TRAP, das vor allem auf T-Zellen charakterisiert wurde, und sein Rezeptor CD40 spielen eine zentrale Rolle im Immunsystem. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß TRAP und CD40 auch von humanen Thrombozyten exprimiert werden und diesen Zellen eine inflammatorische Wirkung im Rahmen der Blutgerinnung verleihen.

Unstimulierten Thrombozyten speichern präformiertes TRAP als Transmembranprotein in einem intrazellulärem Kompartiment. Nach starker Aktivierung der Thrombozyten - u.a. beim Ablauf der Blutgerinnung - wird es innerhalb von Sekunden in die Oberflächenmembran integriert. Die Expression auf der Oberfläche führt im Verlauf weniger Stunden zu einer proteolytischen Spaltung von TRAP, das als lösliche Form (sTRAP) in das Blutplasma abgegeben wird. Die TRAP-Formen auf Thrombozyten und T-Zellen haben die gleiche Proteinstruktur. Die schnelle und leicht induzierbare Expression auf Thrombozyten kontrastiert jedoch stark mit der strengen transkriptionellen und antigenspezifischen Regulation bei T-Zellen. Neuartig ist auch die breite Expression einer Speicherform, durch die Thrombozyten zur Hauptquelle von TRAP im Gefäßsystem werden.

Die Funktion von TRAP auf Thrombozyten wurde in der Interaktion mit CD40-tragenden Endothelzellen bestimmt. In Gegenwart von Thrombin können Thrombozyten Endothelzellen aktivieren und die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 sowie die Sekretion der Chemokine IL-8 und MCP-1 induzieren. Die Induktion der Adhäsionsmoleküle wird zu 70 bis 90 %, die Sekretion der Chemokine zu etwa 40 % über den TRAP/CD40-Signalweg vermittelt. Bei optimaler Stimulation der Endothelzellen durch eine TRAP-transfizierte Zelllinie wird über CD40 eine vergleichbar starke Aktivierung erzielt wie mit den inflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1. Die Interaktion von TRAP-exprimierenden Thrombozyten und der Endothelschicht konnte *in vivo* nachgewiesen werden. Thrombozyten können also eine proinflammatorische Reaktion von Endothelzellen auslösen. Weiterhin sind Thrombozyten und nicht, wie allgemein diskutiert, die T-Zellen die natürlichen Interaktionspartner der Endothelschicht bei einer Entzündungsreaktion *in vivo*.

Thrombozyten exprimieren sowohl TRAP als auch dessen Rezeptor CD40. CD40 wird bereits von unstimulierten Thrombozyten exprimiert, eine Aktivierung verändert das Expressionsniveau nicht. Bei der Aggregationsreaktion scheint CD40 keine Rolle zu spielen. Die Interaktion mit CD40 löst jedoch die Proteolyse von membranständigem TRAP aus. Im Gegensatz zur Membranform ist das lösliche sTRAP selbst in Kombination mit anderen Agonisten nicht in der Lage, Endothelzellen zu aktivieren. Die Hauptfunktion von CD40 auf Thrombozyten scheint es daher zu sein, die Expression seines Liganden TRAP zu regulieren und die stark aktivierende Membranform in die biologisch unwirksame lösliche Form zu überführen. Die proinflammatorische Wirkung der Thrombozyten wird auf diese Weise zeitlich begrenzt, und eine unspezifische Aktivierung von CD40-tragenden Zellen des Immunsystems mit potentiell schädlichen Auswirkungen könnte so vermieden werden.

Summary

The surface protein TRAP, which is mainly characterized on T cells, and its receptor CD40 play a pivotal role in the immune system. We could show for the first time that both TRAP and CD40 are expressed by human platelets, which confers a pro-inflammatory activity on these cells.

Unstimulated platelets store preformed TRAP as a transmembrane protein in an intracellular compartment. After strong activation of platelets, e.g. after induction of the coagulation cascade, TRAP is very rapidly transferred to the surface membrane. The expression on the surface leads within a few hours to a proteolytic cleavage of TRAP which then is released as a soluble form (sTRAP) into the blood plasma. The TRAP-variants on platelets and T cells have the same protein structure. The rapid expression on platelets contrasts with the tight transcriptional and antigenspecific regulation of TRAP on T cells. A novel finding is the broad expression of a storage form of TRAP, by which platelets become the main source of TRAP in the vascular system.

The function of TRAP on platelets was characterized in the interaction with CD40-expressing endothelial cells. In the presence of thrombin, platelets can activate endothelial cells and induce the expression of the adhesion molecules E-selectin, VCAM-1 and ICAM-1 and the secretion of the chemokines IL-8 and MCP-1. The induction of the adhesion molecules is mediated by 70-90 %, the secretion of chemokines by about 40 % via the TRAP/CD40 signaling pathway. After optimal stimulation of endothelial cells with a TRAP-transfected cell line the activation via CD40 is comparable to the effects of the classical inflammatory cytokines TNF- α and IL-1. The interaction of TRAP-expressing platelets and the endothelium could be demonstrated *in vivo*. Platelets are thus able to induce a proinflammatory reaction of endothelial cells. Furthermore, we propose that platelets and not, as generally discussed, T cells are the natural interaction partners of the endothelium in a CD40-mediated inflammatory reaction *in vivo*.

Platelets express both TRAP and its receptor CD40. CD40 is constitutively expressed and the activation of platelets has no influence on its expression level. CD40 does not seem to play a role in the aggregatory reaction of platelets, but the interaction with CD40 induces the cleavage of membrane TRAP. The soluble sTRAP - in contrast to the membrane form - does not activate endothelial cells, even in combination with other agonists. The main function of CD40 on platelets appears to be the regulation of its ligand TRAP, i.e. the transformation of the active membrane form to the biologically inactive soluble form. The proinflammatory effect of platelets is thus limited in time, and an unspecific activation of CD40-expressing cells of the immune system with potential damaging side effects is thus prevented.