

Aus dem Fachgebiet
Molekulare Immunologie
des Robert Koch-Instituts
Berlin

**TRAP (*TNF-related activation protein*) auf aktivierten Thrombozyten
induziert eine Entzündungsreaktion der Endothelzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Volker Henn

Berlin 1999

Prüfungskommission:

Prof. Dr. R. A. KroczeK (1. Gutachter)

Prof. Dr. F. Hucho (2. Gutachter)

Tag der Disputation:

6. September 1999

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	3
Abkürzungen	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Thrombozyten.....	6
1.1.1 Aufbau der Thrombozyten.....	6
1.1.2 Aktivierung der Thrombozyten	7
1.1.3 Funktion der Thrombozyten	8
1.2 Endothelzellen und die entzündliche Reaktion	8
1.3 CD40 und TRAP in Entzündung und Immunabwehr	10
1.4 Problemstellung	13
2 Methoden und Materialien.....	14
2.1 Herkunft der verwendeten Materialien	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Antikörper und Antiseren.....	15
2.2 Zellbiologische Methoden	15
2.2.1 Thrombozyten-Aufarbeitung.....	15
2.2.1.1 Plättchenreiches Plasma (PRP)	15
2.2.1.2 Isolation von plasmafreien Thrombozyten	16
2.2.2 Thrombozyten-Stimulation	16
2.2.3 Aggregationsassays.....	16
2.2.4 Isolierung der Endothelzellen.....	17
2.2.5 Kokultur der Endothelzellen mit Thrombozyten	17
2.2.6 Zell-ELISA	18
2.2.7 Aufarbeitung von T-Lymphozyten	18
2.2.7.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Blut (PBMC)	18
2.2.7.2 Nylon T-Zellen	18
2.3 Proteinchemische Methoden	19
2.3.1 ELISA.....	19
2.3.2 Durchflußzytometrie	20
2.3.2.1 Thrombozyten.....	20
2.3.2.2 Endothelzellen	20
2.3.3 Immunpräzipitation.....	20
2.3.4 SDS-Gelelektrophorese	21
2.3.5 Western Blot.....	22
2.3.6 Aufarbeitung von rekombinantem Protein.....	22
2.3.7 Serumgewinnung	22
2.4 Molekularbiologische Methoden	23
2.4.1 RNA-Isolation	23
2.4.2 Reverse Transkription und Poymerasekettenreaktion (RT-PCR)	23

2.4.3	Plasmid-Konstruktion	23
2.4.4	Sequenzierung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	TRAP auf Thrombozyten	25
3.1.1	sTRAP-Freisetzung durch unterschiedliche Zellpopulationen des menschlichen Bluts	25
3.1.2	Oberflächenexpression von TRAP auf Thrombozyten	26
3.1.3	Kinetik der sTRAP-Freisetzung	28
3.1.4	Immunpräzipitation und Western Blot zur Detektion von TRAP	29
3.1.5	Immunpräzipitation von TRAP mit einem CD40-Fusionsprotein	29
3.1.6	Vergleich von TRAP aus Thrombozyten und T-Zellen	30
3.1.7	Nachweis der TRAP-mRNA in Megakaryozytenlinien	31
3.1.8	Induktion der sTRAP-Freisetzung	32
3.1.9	Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen über CD40	33
3.1.9.1	Koinkubation mit Thrombozyten	33
3.1.9.2	Koinkubation mit einer TRAP-transfizierten Zelllinie	35
3.1.10	Induktion der Chemokinsekretion durch Endothelzellen über CD40	36
3.1.11	<i>in vivo</i> Nachweis der TRAP-Expression auf Thrombozyten	38
3.1.12	Funktion von sTRAP auf Endothel	40
3.1.13	sTRAP als Marker für die Thrombozytenaktivierung <i>in vivo</i>	41
3.2	CD40 auf Thrombozyten	41
3.2.1	Oberflächenexpression von CD40	41
3.2.2	Western Blot zur Detektion von CD40	42
3.2.3	Stimulation der Thrombozytenaggregation über CD40	43
3.2.4	Einfluß der Interaktion von TRAP und CD40 auf die sTRAP-Freisetzung	44
4	Diskussion	46
4.1	Expression und Induktion von TRAP auf Thrombozyten	46
4.2	Lokalisation und Struktur von TRAP auf Thrombozyten	47
4.3	Funktion von TRAP auf Thrombozyten	48
4.4	Funktion von CD40	50
5	Zusammenfassung	53
Summary	54
6	Literaturverzeichnis	55
Danksagung	64
Publikationen	65
Lebenslauf	66

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	sTRAP-Freisetzung durch unterschiedliche Zellpopulationen nach Auslösung der Blutgerinnung	26
Abb. 2:	Oberflächenexpression von TRAP auf Thrombozyten.....	27
Abb. 3:	Kinetik der sTRAP-Freisetzung.....	28
Abb. 4:	Immunpräzipitation von TRAP aus Thrombozytenlysaten und Kulturüberständen	29
Abb. 5:	Immunpräzipitation von TRAP und sTRAP mit einem CD40/Fc-Fusionsprotein .	30
Abb. 6:	Struktureller Vergleich von TRAP und sTRAP aus Thrombozyten und T-Lymphozyten	31
Abb. 7:	Induktion der sTRAP-Freisetzung.....	33
Abb. 8:	Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen durch TRAP auf Thrombozyten.....	34
Abb. 9:	Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen durch eine TRAP-transfizierte Zelllinie	36
Abb. 10:	Chemokinsekretion durch Endothelzellen nach Aktivierung über CD40.....	37
Abb. 11:	<i>In vivo</i> Expression von TRAP auf aktivierten Thrombozyten.	39
Abb. 12:	Funktion von sTRAP auf Endothelzellen.....	40
Abb. 13:	Oberflächenexpression von CD40 auf Thrombozyten	42
Abb. 14:	Vergleich von CD40 aus Thrombozyten mit anderen Zellpopulationen im Western Blot	43
Abb. 15:	sTRAP-Freisetzung in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers.....	45
Abb. 16:	Proteolyse von TRAP in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers.....	45

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APZ	antigenpräsentierende Zellen
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinol)-ethansulfonsäure
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC	periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-ECGF	<i>platelet-derived endothelial cell growth factor</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PF	Plättchenfaktor
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RANTES	<i>regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sTRAP	<i>soluble TNF-related activation protein</i>

TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	<i>TNF-related activation protein</i>
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
v/v	Volumen pro Volumen
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)