

2 Methoden und Materialien

2.1 Herkunft der verwendeten Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid	BioRad (München)
ADP	Sigma (Deisenhofen)
Adrenalin	Sigma (Deisenhofen)
Avidx	Tropix (Bedford, Mass., USA)
Blutpräparate (<i>buffy coats</i>)	Blutbank Krankenhaus Moabit (Berlin)
BSA (für ELISA)	Serva (Heidelberg)
BSA (für Thrombozytenisolierung)	Sigma (Deisenhofen)
CDP-Star	Tropix (Bedford, Mass., USA)
Collagen	Nycomed (München)
Dispase	Boehringer (Mannheim)
Endothelzellmedium	PromoCell (Heidelberg)
FKS	Biochrom (Berlin)
Ficoll	Biochrom (Berlin)
Freundsches Adjuvans	Sigma (Deisenhofen)
IFN- γ	R&D (Wiesbaden)
IL-1	R&D (Wiesbaden)
Ionomycin	Sigma (Deisenhofen)
IPTG	Biomol (Hamburg)
Mikrotiterplatten für ELISA	Nunc (Roskilde, DK)
Ni-NTA-Agarose	Qiagen (Düsseldorf)
PAF	Sigma (Deisenhofen)
Penicillin, Streptomycin	GibcoBRL (Gaithersburg, MD, USA)
PGE ₁	Sigma (Deisenhofen)
PMA	Sigma (Deisenhofen)
Protein A-Sepharose	Pharmacia (Freiburg)
RPMI 1640	Biochrom (Berlin)
SDS	BioRad (München)
Sepharose 2B	Sigma (Deisenhofen)
Sepharose 4B (CNBr-aktiviert)	Pharmacia (Freiburg)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin	Sigma (Deisenhofen)
Thrombin (human)	Boehringer (Mannheim)
TNF- α	R&D (Wiesbaden)
Hirudin	Sigma (Deisenhofen)
Endobulin	Immuno (Heidelberg)
Proteinstandard	GibcoBRL (Gaithersburg, MD, USA)

Alle nicht aufgeführten Reagenzien wurden in p.a. Qualität bei folgenden Firmen bestellt: Merck (Darmstadt); Roth (Karlsruhe); Sigma (Deisenhofen); Fluka (Buchs, CH); Serva (Heidelberg). Sterile Kulturgefäße für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc (Roskilde, DK), Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.2 Antikörper und Antiseren

Antikörper	Spezifität	Quelle
mAk TRAP1	TRAP	D. Graf (eigenes Labor)
mAk TRAP2	TRAP	D. Graf (eigenes Labor)
mAk LL-2	TRAP	C. van Kooten (Dardilly, F)
mAk G28-5	CD40	ATCC (Rockville, USA)
mAk VIII-6G10	VCAM-1	ATCC (Rockville, USA)
mAk BBIG-I1	ICAM-1	R&D (Wiesbaden)
mAk BBIG-E6	E-Selektin	R&D (Wiesbaden)
mAk BK4	CD31	B. Pötsch (Bad Nauheim)
mAk BK17	CD42b	B. Pötsch (Bad Nauheim)
mAk CLB-Thromb/6	P-Selektin	Immunotech (Hamburg)
mAk 1787	CD63	Chemicon (Hofheim)
Ziege-anti-Maus -POD		Sigma (Deisenhofen)
anti-Kaninchen-Biotin		Tropix (Bedford, Mass., USA)
Ziege-anti-Maus -FITC		Caltag (San Francisco, USA)
Ziege-anti-Maus-Ig		Nordic Immunological Lab. (NL)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Thrombozyten-Aufarbeitung

2.2.1.1 Plättchenreiches Plasma (PRP)

Die Gewinnung von plättchenreichem Plasma erfolgte aus frisch gewonnenem Vollblut oder aus Blutpräparaten (*buffy coat*).

Bei Verwendung von frischem Vollblut wurde gesunden Spendern 20 bis 50 ml Blut in eine Citratlösung (3,13 % 3-Natrium-Citrat, Endverdünnung 1:10) abgenommen und das Blut sofort zentrifugiert (10 min, 150 g, RT). Die kernhaltigen Zellen und die Erythrozyten sedimentierten unter diesen Bedingungen, so daß das plättchenreiche Plasma mit einer Plastikpipette abgenommen werden konnte.

Die Blutpräparate wurden unverdünnt auf eine Ficoll-Lösung (Dichte 1,077 g/ml) aufgetragen und zentrifugiert (30 min, 400 g, RT). Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren unter diesen Bedingungen, während Leukozyten sich an der Grenzschicht zwischen Ficoll-Lösung

und Plasma sammelten. Das plättchenreiche Plasma bildete die oberste Phase und konnte mit einer Plastikpipette abgenommen werden.

2.2.1.2 Isolation von plasmafreien Thrombozyten

Das plättchenreiche Plasma wurde zuerst über einen zweistufigen BSA-Gradienten zentrifugiert, um kernhaltige Zellen und Plasmabestandteile abzutrennen. Daran schloß sich eine Gelfiltration an, um das BSA und eventuell noch vorhandene Plasmabestandteile zu entfernen (Mustard *et al.*, 1991).

Um eine Aktivierung der Thrombozyten durch den Zentrifugationsschritt zu vermeiden, wurde das plättchenreiche Plasma mit 2 mM EDTA und wo angegeben auch mit 10 µg/ml PGE₁ versetzt. Ein zweistufiger BSA-Gradient (34 % und 25 % BSA (w/v) in modifizierten Tyrodes Puffer und 2 mM EDTA) wurde dann mit dem PRP überschichtet und zentrifugiert (30 min, 750 g, RT). Nach diesem Schritt sammelten sich die Thrombozyten als schmale Bande an der Grenzschicht zwischen den BSA-Phasen, während die Leukozyten und Erythrozyten vollständig sedimentierten. Das Plasma und seine löslichen Bestandteile drangen nicht in den BSA-Gradienten ein. Die Thrombozyten wurden in möglichst kleinem Volumen abgenommen und auf eine Sepharose 2B-Säule aufgetragen, welche mit modifiziertem Tyrodes Puffer voräquilibriert war. Die Thrombozyten wurden mit dem Puffer eluiert; die Thrombozytenfraktion war dabei eindeutig an der Trübung der Lösung zu erkennen.

modifizierter Tyrodes Puffer: 138 mM NaCl, 2,9 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0,5 mM Na₂HPO₄, 1 mM Glucose, 0,3 % (w/v) BSA, 20 mM HEPES pH 7,4

2.2.2 Thrombozyten-Stimulation

Alle Stimulationen fanden bei 37°C statt, die Thrombozyten wurden nicht geschüttelt oder gerührt. In der Regel wurden die Thrombozyten auf eine Konzentration von 2×10^8 /ml in Plasma oder modifiziertem Tyrodes Puffer eingestellt und vor Versuchsbeginn noch mindestens 15 min bei 37°C inkubiert. Das Thrombozyten-Sediment sowie die zellfreien Kulturüberstände wurden durch Zentrifugation (2000 g, 5 min, RT) gewonnen.

2.2.3 Aggregationsassays

Thrombozyten in einer Einzelzellsuspension streuen sichtbares Licht stärker als Thrombozytenaggregate. Der Verlauf einer Aggregationsreaktion läßt sich somit charakterisieren, indem man die Transmissionsänderung einer Zellsuspension nach Zugabe von Agonisten in Abhängigkeit von der Zeit aufzeichnet. Kritische Parameter sind dabei die Latenzzeit, die Steigung der Transmissionskurve sowie die maximal erzielte Transmission. Zur Aufzeichnung der Aggregationsassays wurde ein Photometer (Kontron) benutzt. Dieses Photometer bot folgende Ausstattungsmerkmale, die eine Nutzung als vollwertiges Aggregometer ermöglichten: eine Röhreinrichtung, einen temperierbaren Küvettenhalter

sowie die Möglichkeit, bis zu 600 Absorptionswerte pro Minute automatisch zu bestimmen und zu speichern.

Die Aggregationsversuche wurden in Makroküvetten durchgeführt, die Thrombozytensuspension ($V=1,5$ ml) wurde dabei mit kleinen Magnetkernen bei voller Leistung der Drehvorrichtung gerührt. Die Küvette wurde durch ein externes Wasserbad auf 37°C erwärmt, die Transmissionsänderungen wurden bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen.

Es wurden pro Versuch insgesamt 1000 Transmissionswerte in einem Zeitraum von 6 bis 10 min gesammelt, die Daten wurden auf einen Computer transferiert und mittels Microsoft Excel ausgewertet. Die prozentualen Eckwerte der Transmission wurden wie folgt definiert: die Transmission von thrombozytenfreiem Plasma bzw. modifiziertem Tyrodes Puffer als 100 %, die von thrombozytenhaltigem Plasma bzw. modifiziertem Tyrodes Puffer als 0 %.

Die Konzentration der Thrombozyten wurde auf $2 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellt; plättchenfreies Plasma wurde durch zwei Zentrifugationsschritte (1900 g, 15 min, RT) aus plättchenreichem Plasma gewonnen und zur Einstellung der korrekten Thrombozyten-Konzentration verwendet. Vor Beginn der Messung wurden die Proben für 2 min im Photometer äquilibriert.

2.2.4 Isolierung der Endothelzellen

Die Aufarbeitung von primären humanen Endothelzellen aus Nabelschnüren (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) erfolgte gemäß einem Standardprotokoll von Jaffe *et al.* (1973).

Dabei wurde die Vene der Nabelschnur mit Dispase-Lösung gefüllt, um die subendotheliale Matrix zu verdauen. Die Endothelzellen konnten dann als Einzelzellsuspension aus der Nabelschnur gespült werden und wurden in Gelatine-beschichteten Gefäßen kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen schonend trypsiniert und in einem Verhältnis von 1:3 aufgeteilt. Die Zellen wurden in der dritten Passage verwendet. Kultiviert wurden die Zellen in serum- und heparinfreiem Medium der Firma PromoCell (Heidelberg) .

2.2.5 Kokultur der Endothelzellen mit Thrombozyten

Für die Kokulturversuche wurden die HUVEC auf Zellkulturschalen inkubiert. Die Schalen wurden einmal mit Kulturmedium gewaschen und dann in einem Volumen von 2 ml Medium mit den jeweiligen Agonisten inkubiert. Als Kontrollen wurden die Zytokine TNF- α (100 U/ml) und IL-1 (1 ng/ml) eingesetzt; diese Mengen bewirkten eine maximale Aktivierung der Endothelzellen. Weiterhin wurde die TRAP-Transfektante P3xTB.A7 bzw. die untransformierte Mutterlinie P3xAg63 sowohl fixiert als auch unfixiert mit insgesamt $7,5 \times 10^6$ Zellen eingesetzt. Die Fixierung erfolgte für 5 min mit 1 % para-Formaldehyd auf Eis, dann wurde dreimal mit PBS gewaschen.

Die Thrombozyten wurden jeweils aus frisch gewonnenem Vollblut über einen endotoxinfreien BSA-Gradienten aufgearbeitet. Nach Zugabe der Thrombozytensuspension wurden die Thrombozyten durch Zugabe von 0,4 U humanem Thrombin (Endkonzentration: 0,2 U/ml) aktiviert. Die Suspension wurde sofort geschüttelt, und kurz zentrifugiert (150 g,

1 min, RT) um einen optimalen Kontakt zwischen Thrombozyten und Endothelzellen herzustellen. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Zellmedium abgenommen, zelluläre Bestandteile abzentrifugiert (2000 g, 5 min) und der Überstand bis zur Bestimmung der Chemokinkonzentrationen bei -20°C gelagert. Die Kulturschalen mit den adhärennten Endothelzellen wurde mehrmals gewaschen, um anhaftende Thrombozyten oder die Zelllinien zu entfernen und dann gemäß 3.3.2.1 in der Durchflußzytometrie analysiert.

2.2.6 Zell-ELISA

Für den Zell-ELISA wurden HUVEC auf Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten (Flachboden) kultiviert. Die Zellen wurden in 300 µl Medium auf diesen Platten mit diversen Agonisten (jeweils 8fach-Werte) für 6 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die folgenden Inkubationsschritte erfolgten für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂. Als Primärantikörper wurde der VCAM-1-spezifische mAk VIII-6G10, als Isotypkontrolle der mAk MOPC-21 (beide 20 µg/ml) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde das POD-gekoppelte Ziege-anti-Maus Antiserum (1:2000, Sigma) eingesetzt. Alle Antikörper waren in PBS/2 % FKS verdünnt, und deren optimale Konzentrationen wurden vorher in Titrationsreihen bestimmt. Die Waschschriffe zwischen den Inkubationen erfolgten mit 300 µl PBS.

Für die Farbreaktion wurde 1 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 10 ml Substratpuffer gelöst und mit 2 µl 30%igem Wasserstoffperoxid versetzt. Pro Kavität wurden 100 µl der Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde ca. 20-30 min inkubiert und die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt, als Referenzwellenlänge diente 630 nm.

Substratpuffer: 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,05 M Zitronensäure, pH 5,0

2.2.7 Aufarbeitung von T-Lymphozyten

2.2.7.1 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem Blut (PBMC)

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der mononukleären Zellen dienen Blutpräparate (*buffy coats*). Diese Zellsuspension wurde über einen Ficoll-Gradienten (Dichte 1,077 g/ml) zentrifugiert (400 g, 30 min, RT); die Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten, Thrombozyten verblieben in der wäßrigen Phase, während Lymphozyten, Monozyten und NK-Zellen sich in der Interphase ansammelten. Die Interphase wurde abgenommen und mehrmals mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium/10 % FKS aufgenommen, und dann entweder eingefroren oder gleich weiterverwendet.

2.2.7.2 Nylon T-Zellen

Zur Anreicherung der T-Zellen wurden PBMC auf eine Nylonwoll-Säule gegeben. Bei einer Temperatur von 37°C adhärten B-Zellen, Monozyten und NK-Zellen an der Nylonwolle,

während sich T-Zellen nach 1 h eluieren ließen. Die Reinheit der T-Zellen betrug ca. 90 % (Eisen *et al.*, 1972).

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 ELISA

Der "sandwich"-ELISA für das lösliche sTRAP wurde von S. Müller etabliert (Graf *et al.*, 1995). Als Primärantikörper diente der mAk LL-2, als peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper der mAk TRAP1.

Als Standard wurde ein Fusionsprotein aus rekombinanten humanen TRAP und rekombinanten murinen IL-4-Rezeptor in einem Konzentrationsbereich von 40 bis 0,313 ng/ml verwendet. Als eine Einheit sTRAP pro Milliliter (1 U/ml) war dabei die Konzentration an sTRAP definiert, die die gleiche Absorption wie 1 ng/ml des Fusionsproteins hervorrief.

Alle folgenden Schritte wurden durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer abgeschlossen; in Klammern ist die jeweilige Inkubationsdauer und -temperatur angegeben. Eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Maxisorb Immuno-Plates, Nunc) wurde mit 50 µl mAk LL-2 (5 µg/ml in Beschichtungspuffer) beschichtet (20 h, 4°C). Unspezifische Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte wurden mit BSA (3 % (w/v) in PBS) abgesättigt (1 h, 37°C). Von der Standardreihe, dem Leerwert und den Proben wurden jeweils 100 µl in Doppelwerten auf die Platte aufgetragen (2 h, 37°C). Der Sekundärantikörper wurde in PBS/5 % FKS auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt und jeweils 100 µl pro Kavität zugegeben (1 h, 37°C).

In 10 ml Substratpuffer wurde 1 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin gelöst und mit 2 µl 30%igem Wasserstoffperoxid versetzt. Pro Kavität wurden 100 µl der Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde ca. 20-30 min inkubiert und die Farbreaktion durch Zugabe von jeweils 100 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Die Optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt, als Referenzwellenlänge dienten 630 nm. Die Auswertung der Standardkurve und die Berechnung der Probenkonzentrationen erfolgte durch das Computerprogramm Revelation 2.0 (Dynatech).

Die ELISA für die Chemokine MCP-1 und IL-8 wurde von R&D (Wiesbaden) erworben und gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Beschichtungs-Puffer: 0,1 M NaHCO₃-Lösung, pH 8,2

Waschpuffer: PBS + 0,05 % Tween 20

Substratpuffer: 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,05 M Zitronensäure, pH 5,0

2.3.2 Durchflußzytometrie

2.3.2.1 *Thrombozyten*

Die Thrombozyten wurden vor Beginn der Anfärbung mit 1 % para-Formaldehyd fixiert, da die häufigen Zentrifugationsschritte deren Aktivierung induzieren konnten. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Thrombozyten dreimal mit PBS gewaschen (alle Zentrifugationsschritte: 1000 g, 5 min, RT).

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und alle Zentrifugationen für 5 min bei 1000 g. Der Erst- und der Zweitantikörper waren in FACS-PBS verdünnt und mit 0,5 mg/ml Endobulin versetzt, um unspezifische Anfärbungen zu verringern; die optimalen Konzentrationen der Antikörper wurden vorher in Titrationsreihen bestimmt. Alle Waschschrte erfolgten mit 200 µl FACS-PBS.

Pro Anfärbung wurden 5×10^6 Thrombozyten auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Rundboden) aufgetragen, abzentrifugiert und einmal gewaschen. Der Erstantikörper wurde in einem Volumen von 50 µl zugegeben und die Proben 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde der Zweitantikörper in einem Volumen von 50 µl zugegeben und die Proben 30 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, in 400 µl FACS-PBS aufgenommen und sofort in einem FACSCalibur (Becton & Dickinson) analysiert. Es wurden standardmäßig 1×10^4 Zellen aufgenommen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Auswertungsprogramm CellQuest (Becton & Dickinson), und bei der Berechnung des geometrischen Mittelwerts der spezifischen Fluoreszenzintensität wurde die Fluoreszenzintensität eines unspezifischen Kontrollantikörpers (mit passendem Isotyp) abgezogen (bereinigte Fluoreszenzintensität).

2.3.2.2 *Endothelzellen*

Um die adhärennten Endothelzellen von den Kulturschalen zu entfernen, wurden sie erst 20 min bei 4°C, dann 10 min bei 37°C in PBS/5 mM EDTA inkubiert und schließlich durch kräftiges Pipettieren abgelöst.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis und alle Zentrifugationsschritte für 5 min bei 550 g und 4°C. Alle Antikörper waren in FACS-PBS verdünnt und mit 0,5 mg/ml Endobulin versetzt, um unspezifische Anfärbungen zu verringern; die optimalen Konzentrationen der Antikörper wurden vorher in Titrationsreihen bestimmt. Alle Waschschrte erfolgten mit 200 µl FACS-PBS.

Pro Anfärbung wurden 2×10^5 Zellen auf eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten (Rundboden) aufgetragen, abzentrifugiert und einmal gewaschen. Der Erstantikörper bzw. ein direkt markierter Antikörper wurde in einem Volumen von 50 µl zugegeben und die Proben 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde im Fall einer indirekten Färbung der Zweitantikörper in einem Volumen von 50 µl zugegeben und die Proben 30 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal gewaschen, in 400 µl FACS-PBS aufgenommen und sofort vermessen. Zur Anfärbung der toten Zellen wurde die Zellsuspension direkt vor der Messung mit Propidiumiodidlösung (Endkonzentration 25 mg/ml) versetzt. Es wurden standardmäßig

1×10^4 lebende Zellen aufgenommen. Bei der Berechnung des geometrischen Mittelwerts der spezifischen Fluoreszenzintensität wurde die Fluoreszenzintensität eines unspezifischen Kontrollantikörpers (mit passendem Isotyp) abgezogen (bereinigte Fluoreszenzintensität).

FACS-PBS: PBS, 3 % FKS, 0,1 % Azid

2.3.3 Immunpräzipitation

Als Ausgangsmaterial für die Immunpräzipitation dienten entweder Zell-Lysate oder Überstände von Zellkulturen. Die monoklonalen Antikörper mAk TRAP2 (TRAP-spezifisch) und mAk G28-5 (CD40-spezifisch) waren dabei direkt an eine Sepharose 4B-Matrix gekoppelt. Bei Immunpräzipitation mit dem CD40-Fusionsprotein (Lauffer *et al.*, 1995) wurde das Protein über seinen Fc-Anteil mit Protein A-Matrix gefällt. Zur Voradsorption wurde ungekoppelte Sepharose 4B-Matrix bzw. Protein A-Matrix verwendet. Es wurden jeweils 10 μ l Matrix pro 1 ml Zell-Lysat eingesetzt, bei Zellkulturüberständen wurde die Matrixmenge an der erwarteten Antigen-Konzentration ausgerichtet.

Zur Herstellung der Lysate wurden 1×10^7 kernhaltige Zellen bzw. 1×10^9 Thrombozyten in 1 ml Lysispuffer mit Proteasehemmern 30 min auf Eis inkubiert, dann 15 min mit 12 000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand entweder sofort für die Immunpräzipitation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Die Voradsorption fand für 8 h auf einem Über-Kopf-Schüttler bei 4°C statt. Danach wurde die Matrix abzentrifugiert und der Überstand entweder mit Antikörper-gekoppelter Matrix oder Fusionsprotein/Protein A-Matrix für 16 h unter den gleichen Bedingungen geschüttelt. Dann wurde die Matrix abzentrifugiert, viermal mit Lysispuffer gewaschen und in 3 \times SDS-Probenpuffer (8 μ l pro 10 μ l Matrix) aufgenommen. Bei Immunpräzipitation von CD40 war der Probenpuffer mit DTT versetzt, im Fall von TRAP wurde auf DTT verzichtet. Die Proben wurden entweder sofort auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) Nonidet P-40, pH 8,0

Proteasehemmer: 1 mM PMSF, 2 μ M Leupeptin A, 2 μ M Pepstatin, 10 μ g/ml Aprotinin

2.3.4 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinproben in dem Probenpuffer (gemäß Sambrook *et al.*, 1989) wurden für 4 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach kurzer Zentrifugation auf ein SDS-Gel aufgetragen. Standardmäßig wurde die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) verwendet. CD40-Proben wurden auf ein 10%iges Gel aufgetragen, Proben mit membranständigem TRAP meist auf ein 12%iges Gel, sTRAP-Proben auf ein 14%iges Gel aufgetragen. Die Elektrophorese fand in einer Mini-Protean II-Kammer (BioRad) statt, die Laufspannung betrug im Sammelgel 80 V und im Trenngel 120 V. Als Proteinmarker wurden 6-60 kDa und 10-200 kDa Proteinleitern (beide von Gibco) verwendet.

Für den strukturellen Vergleich von sTRAP wurde das Gel-System gemäß Schägger und von Jagow (1987) verwendet. Das Trenngel bestand aus 16,5 % Gesamtacrylamid mit einem 6%igen Anteil von Bisacrylamid.

2.3.5 Western Blot

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) erfolgte nach der semi-dry Methode (Kyhse-Andersen, 1984) im Transferpuffer bei $0,9 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h. Nach dem Transfer wurde die Membran in Ponceau S-Lösung gefärbt, die Proteinbanden des Markers mit Bleistift markiert und die Membran in PBS entfärbt.

Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert, dann für 2 h bei Raumtemperatur mit einem anti-TRAP-Serum (1:2000 verdünnt) bzw. einem anti-CD40-Serum (1:500) inkubiert. Die Nachweisreaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem *Western Light Kit* (Tropix). Eingesetzt wurden dabei ein biotin-gekoppelter polyklonaler anti-Kaninchen-Antikörper sowie Alkalische Phosphatase gekoppelt an Avidin (Avidx, Tropix). Als Chemoluminiszenzsubstrat diente CDP-Star (Tropix), die Exposition der Membran erfolgte auf einem XOMatAR Film (Kodak).

Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS, 20 % Methanol

Blockpuffer: PBS, 3 % Milchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20

2.3.6 Aufarbeitung von rekombinantem Protein

Zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums wurde ein Teil von humanem CD40 als rekombinantes Protein hergestellt. Exprimiert wurden die Aminosäuren 25 bis 180, die der extrazellulären Domäne ohne der Signalsequenz entsprechen. Eingesetzt wurde das pQE-Expressionssystem von Qiagen (Düsseldorf), bei dem die rekombinanten Proteine mit einem Marker von sechs Histidinen versehen werden, welcher dann die Aufreinigung über eine Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie ermöglicht. Die Klonierung des Expressionskonstrukts erfolgte gemäß 3.4.2 und 3.4.3.

Die Transformation der Bakterien und die Induktion der Proteinexpression erfolgten dabei im wesentlichen wie vom Hersteller beschrieben (The Expressionist, Qiagen). Als Kulturmedium wurde dabei LB-Medium verwendet.

Die Aufarbeitung des rekombinanten Proteins erfolgte gemäß Herstellerangaben. Bei der Dialyse gegen PBS präzipitierte das Protein. Es wurde bei -70°C gelagert.

2.3.7 Serumgewinnung

Für die Serumgewinnung wurden drei Kaninchen eingesetzt. Die erste Immunisierung erfolgte mit jeweils 1 mg rekombinantem Protein in 1 ml komplettem Freundschens Adjuvans. Die drei nachfolgenden Auffrischungsimmunisierungen wurden im Abstand von 4 Wochen mit je 1 mg rekombinantem Protein in 1 ml inkomplettem Freundschens Adjuvans. Dann

wurde das Kaninchen vollkommen entblutet, das Blut bei 37°C geronnen und der Blutkuchen abzentrifugiert. Der Serumüberstand wurde mit 0,02 % Natriumazid versetzt und entweder bei 4°C oder bei –70°C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen erfolgte mit dem TRIzol-Reagenz (Gibco), basierend auf der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Dabei wurden gemäß den Angaben des Herstellers 1×10^7 Zellen in 1 ml TRIzol-Reagenz lysiert, die RNA mit Chloroform extrahiert und nach einer Fällung mit Isopropanol in einem geringem Volumen H₂O aufgenommen.

2.4.2 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die reverse Transkription erfolgte mit der Superscript II Reversen Transkriptase (Gibco). Die Reaktion erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA und 1 µg oligo-dT-Primer.

Die für die CD40-PCR verwendeten Primer wurden anhand des Computerprogramms OLIGO 3.4 (nach Breslauer *et al.*, 1986; Schildkraut *et al.*, 1965) anhand der Zielsequenz entworfen. Die TRAP-Primer wurden verwendet wie beschrieben (Korthäuer *et al.*, 1993).

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mit einer hot-start-Polymerasekettenreaktion (Innis *et al.*, 1990) mit der Pfu-Polymerase. Eingesetzt wurden 0,1-250 ng cDNA und je 0,5 µM der Primer.

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler 60 (Fa. bio-med) nach folgendem Programm:

Denaturierung	94°C	4 min	
Zyklus (33×)	94°C	40 s	(Denaturierung)
	60°C	60 s	(Hybridisierung)
	75°C	70 s	(Synthese)
Endsynthese	75°C	10 min	

2.4.3 Plasmid-Konstruktion

Die Klonierung der Vektoren erfolgte nach folgenden Standardmethoden. Falls keine Referenzen angegeben sind, wurden Standardprotokolle aus Sambrook *et al.* (1989) verwendet.

Restriktion von DNA

Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Ethanolpräzipitation von DNA

DNA-Gelelektrophorese

Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen (Thuring *et al.*, 1975)

Ligation mit T4 DNA Polymerase

Herstellung kompetenter Bakterien: *E. coli* XL1-Blue (Hanahan *et al.*, 1991)

Herstellung kompetenter Bakterien: *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen, 1992)

Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Schnellpräparation von Bakterien (He *et al.*, 1990)

Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Vektoren wurden in *E. coli* XL1-Blue in LB-Medium mit dem plasmidkodierten Antibiotikum propagiert (pBluescript: 100 µg/ml Ampicillin; pQE30: 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin)

2.4.4 Sequenzierung

Die automatische Sequenzierung erfolgte auf den Geräten ABI 310 oder ABI 373. Die Sequenzierreaktion erfolgte mit der AmpliTaq Polymerase unter Verwendung des *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (ABI) gemäß den Angaben des Herstellers. Eingesetzt wurden jeweils 0,5 µg DNA und 3,2 pmol Primer.

Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler GeneAmp 2400 (Perkin Elmer) nach folgendem Programm:

Denaturierung	96°C	2 min 30 s	
Zyklus (25×)	96°C	10 s	(Denaturierung)
	50°C	5 s	(Hybridisierung)
	60°C	4 min	(Synthese)

Die Proben wurden dann mit Ethanol und Natrium-Acetat präzipitiert und gemäß den Angaben des Herstellers auf die Sequenziergele aufgetragen.