

3 Ergebnisse

3.1 TRAP auf Thrombozyten

3.1.1 sTRAP-Freisetzung durch unterschiedliche Zellpopulationen des menschlichen Bluts

Nach der Etablierung eines spezifischen sTRAP-ELISA (Graf *et al.*, 1995) fiel bei der Analyse von Blutproben auf, daß diese signifikante Mengen sTRAP enthielten. Die ersten Versuche (durchgeführt von S. Müller) ergaben ferner, daß die Thrombozyten die Quelle des sTRAP waren, und daß die Auslösung der Blutgerinnung dessen Konzentration drastisch erhöhte.

Um den Beitrag der unterschiedlichen Zellpopulationen an der sTRAP-Freisetzung zu bestimmen, isolierte ich verschiedene Zellfraktionen aus frisch gewonnenem Vollblut. Die aufgereinigten Zellen wurden in den ursprünglichen Konzentrationen in zellfreiem Blutplasma aufgenommen und die Gerinnung durch Zugabe von Kalzium ausgelöst. Ein zentraler Schritt der Gerinnungskaskade ist die Bildung von Thrombin, das auch ein potenter Thrombozytenaktivator ist. Um die Rolle von Thrombin bei der sTRAP-Freisetzung durch die Blutgerinnung zu bestimmen, erfolgten die Versuche in Gegenwart oder Abwesenheit des spezifischen Thrombin-Inhibitors Hirudin.

Abb. 1 zeigt, daß in unbehandeltem Vollblut nur geringe Mengen sTRAP enthalten sind, während nach Auslösung der Gerinnung die sTRAP-Konzentration um mehr als den Faktor 50 ansteigt. Auch im PRP (plättchenreiches Plasma), in dem sich die Thrombozyten befinden, führt die Gerinnungsauslösung zu einer starken sTRAP-Freisetzung; die erreichte Konzentration entspricht dabei der des Vollbluts. Alle übrigen Zellpopulationen sezernieren unter diesen Bedingungen keine signifikanten Mengen sTRAP, und auch im zellfreien Plasma ist es kaum nachzuweisen. Hirudin hemmt die sTRAP-Freisetzung im Vollblut und durch Thrombozyten zu mehr als 90 %; dies deutet darauf hin, daß Kalzium nicht direkt auf die Thrombozyten wirkt, sondern daß das gebildete Thrombin der wirksame Agonist ist. Die essentielle Rolle von Thrombin zeigt sich auch bei der Aktivierung von Thrombozyten in Abwesenheit von Plasmabestandteilen: Kalzium induziert keine sTRAP-Freisetzung, während Thrombin unverändert wirksam ist (nicht gezeigt).

Dieser Versuch zeigt eindeutig, daß die Auslösung der Blutgerinnung zu einer Freisetzung von sTRAP durch Thrombozyten führt, die vor allem durch Thrombin induziert wird. Andere Zellen sezernieren unter diesen Bedingungen kein sTRAP.

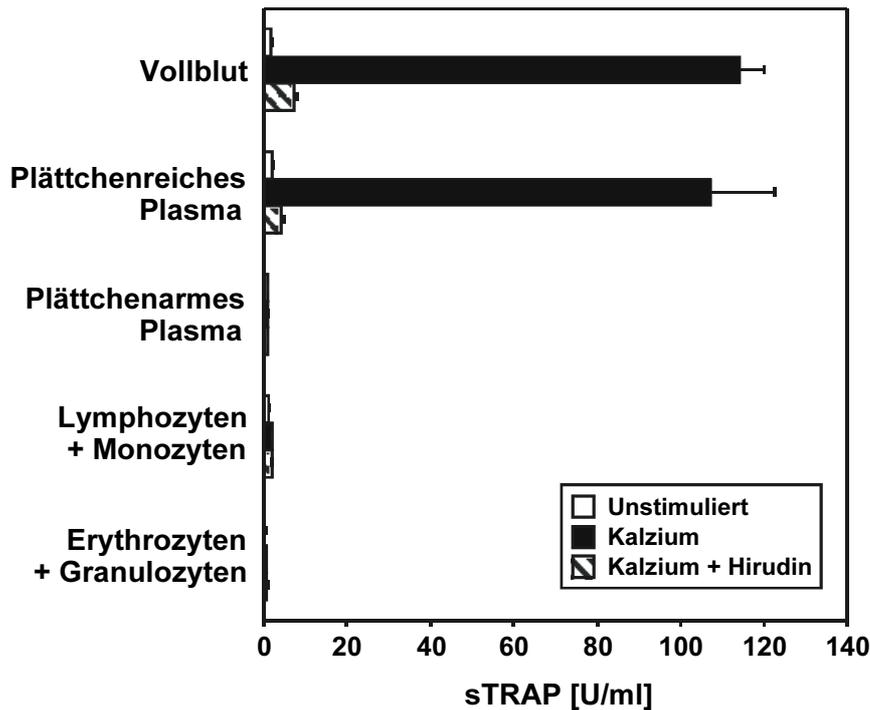


Abb. 1: sTRAP-Freisetzung durch unterschiedliche Zellpopulationen nach Auslösung der Blutgerinnung

Die Zellfraktionen wurden aus Vollblut isoliert und in der ursprünglichen Konzentration in zellfreiem Plasma aufgenommen. Die Gerinnung wurde durch Zugabe von Kalzium (12,5 mM) in Abwesenheit oder Gegenwart von Hirudin (100 µg/ml) ausgelöst und die Proben 1 h bei 37°C inkubiert. Die sTRAP-Konzentrationen wurden in den zellfreien Überständen mit einem spezifischen ELISA bestimmt. Alle Versuche erfolgten in Dreifachwerten, dargestellt ist der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung. Die gezeigten Werte sind repräsentativ für 3 Experimente.

3.1.2 Oberflächenexpression von TRAP auf Thrombozyten

Bei T-Lymphozyten konnten zwei unterschiedliche Varianten von TRAP charakterisiert werden: ein lösliches Molekül (sTRAP) sowie eine membranständige Form (Graf *et al.*, 1995). Das sTRAP wird bei T-Zellen wahrscheinlich durch Proteolyse der membranständigen Form gebildet. Aus diesem Grund war es vorstellbar, daß auch das sTRAP bei Thrombozyten aus der Membranform entsteht, und Thrombozyten somit TRAP auf der Oberfläche exprimieren.

Die Oberflächenexpression von TRAP wurde auf unstimulierten und Thrombin-aktivierten Thrombozyten in einem Zeitraum von 1 min bis 8 h nach Aktivierung bestimmt. Zusätzlich wurde als Aktivierungskontrolle die Expression von CD63 gemessen; CD63 wird in den Granula gespeichert und nach deren Ausschüttung verstärkt auf der Oberfläche exprimiert (Nieuwenhuis *et al.*, 1987).

Auf unstimulierten Thrombozyten ist kein TRAP detektierbar (Abb. 2). Nach Aktivierung erscheint TRAP auf der Oberfläche, die maximale Expression wird bereits innerhalb einer

Minute erreicht. Im Laufe weniger Stunden verschwindet TRAP wieder von der Oberfläche, je nach Blutspender ist es nach 4 bis 12 h nicht mehr nachweisbar. Das Granulaprotein CD63 wird ebenfalls nach 1 min verstärkt exprimiert, das Expressionsniveau bleibt jedoch auch bei allen späteren Zeitpunkten ungefähr konstant. P-Selektin, ein weiteres Granulaprotein, verhält sich ähnlich wie CD63 (nicht gezeigt). Dies zeigt, daß der Abbau von TRAP spezifisch für dieses Molekül ist.

Zusammengefasst kann man sagen, daß die Thrombin-Aktivierung der Thrombozyten eine rasche Oberflächenexpression von TRAP induziert, die im Verlauf weniger Stunden wieder wieder abgebaut wird.

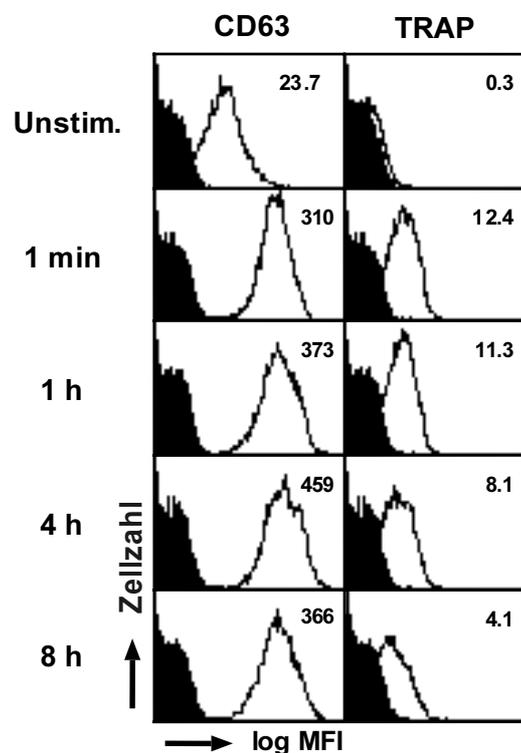


Abb. 2: Oberflächenexpression von TRAP auf Thrombozyten

Die Oberflächenexpression von CD63 und TRAP wurde auf unstimulierten und aktivierten Thrombozyten mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Thrombozyten wurden in einem plasmafreien Puffer für die angegebenen Zeiträume mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert. Das unspezifische Hintergrundsignal ist in schwarz gezeigt, die eingefügten Zahlen geben die bereinigte geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt 3. Unstim., unstimuliert.

3.1.3 Kinetik der sTRAP-Freisetzung

Bei T-Zellen unterscheiden sich der zeitliche Verlauf der TRAP-Oberflächenexpression und der sTRAP-Freisetzung deutlich voneinander (Graf *et al.*, 1995). Daher wurde auch für Thrombozyten die Kinetik der sTRAP-Freisetzung charakterisiert.

Thrombozyten wurden mit Thrombin stimuliert und in einem Zeitraum von 1 min bis 24 h die sTRAP-Konzentration im Überstand bestimmt.

Abb. 3 zeigt, daß eine sTRAP-Freisetzung innerhalb von 10 min Minuten detektierbar ist. Die maximale Konzentration wird meist nach 2 Stunden erreicht, je nach Spender kann dies aber auch nach 1 oder 4 Stunden der Fall sein. Danach nimmt die Konzentration graduell ab und ist nach spätestens 24 h nicht mehr nachweisbar. Diese Abnahme der sTRAP-Konzentration ist ein allgemeines Phänomen und erklärt sich vermutlich dadurch, daß sTRAP bei 37°C nicht stabil ist (frühere Beobachtungen).

Nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin wird zuerst die Membranform von TRAP exprimiert (siehe Abb. 2), und dann mit deutlicher Verzögerung sTRAP in den Überstand freigesetzt. Die Freisetzung von sTRAP verläuft somit parallel zum Verlust der TRAP-Oberflächenexpression.

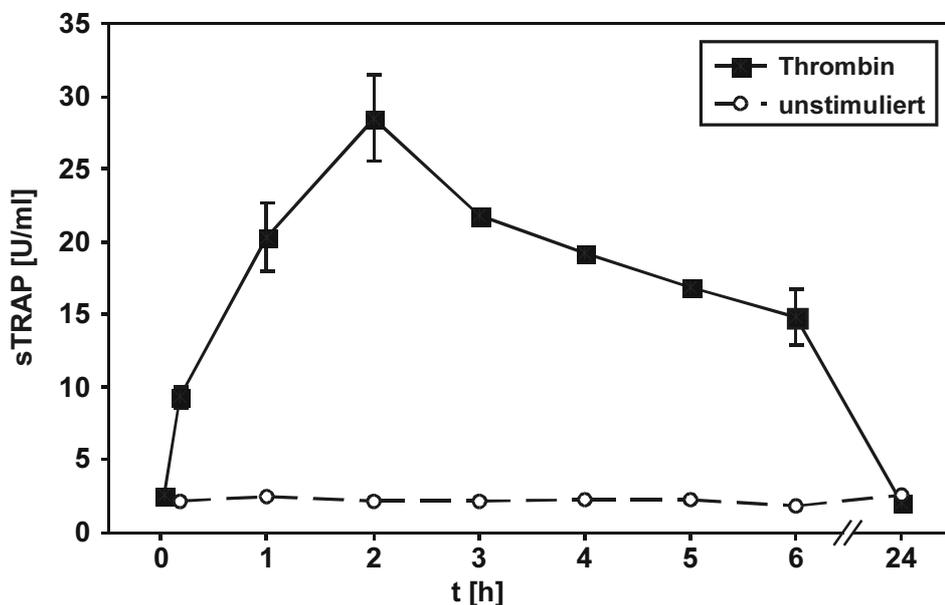


Abb. 3: Kinetik der sTRAP-Freisetzung

Die Kulturüberstände von unstimulierten und mit 0,2 U/ml Thrombin aktivierten Thrombozyten (2×10^8 /ml, jeweils Doppelwerte) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen und die sTRAP-Konzentration mit einem spezifischen ELISA bestimmt.

3.1.4 Immunpräzipitation und Western Blot zur Detektion von TRAP

sTRAP entspricht ungefähr der extrazellulären Domäne der membranständigen Form, die Aminosäuren 1 bis 112 fehlen vollständig (Graf *et al.*, 1995). Die Membranform ist also mit 29-33 kDa wesentlich größer als sTRAP mit ungefähr 18 kDa. Anhand der bisherigen Versuche war nicht eindeutig zu erkennen, ob beide Varianten koexprimiert werden oder ob sTRAP eventuell durch Proteolyse der Membranform entsteht. Da beide Varianten sich anhand des Molekulargewichts eindeutig unterscheiden lassen, wurde zur Klärung dieser Frage ein Western Blot durchgeführt.

Thrombozyten wurden für eine Stunde mit Thrombin aktiviert, eine Kontrollpopulation blieb unstimuliert. Mit dem Zell-Lysat und den zellfreien Kulturüberständen wurde eine Immunpräzipitation mit einem TRAP-spezifischen Antikörper durchgeführt und die Proteine in einem Western Blot analysiert.

In Abb. 4 ist deutlich zu sehen, daß in dem Lysat von unstimulierten Thrombozyten nur die Membranform von TRAP nachweisbar ist, sTRAP fehlt völlig. Im Kulturüberstand der unstimulierten Zellen findet sich nur sehr wenig sTRAP, das wahrscheinlich auf eine Voraktivierung zurückzuführen ist. Nach Aktivierung nimmt die Menge von zellgebundenem Membran-TRAP drastisch ab, während im Überstand ein sehr starkes sTRAP-Signal nachweisbar ist.

Diese Daten zeigen eindeutig, daß TRAP von ruhenden Thrombozyten als Transmembranprotein gespeichert wird. Nach Aktivierung mit Thrombin wird die Membranform proteolytisch zu sTRAP gespalten und in den Überstand abgegeben.

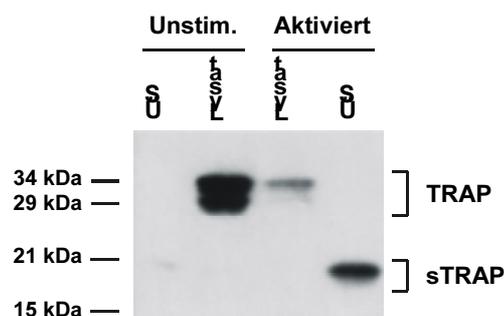


Abb. 4: Immunpräzipitation von TRAP aus Thrombozytenlysaten und Kulturüberständen

TRAP wurde aus Thrombozytenlysaten (Lysat) und Kulturüberständen (ÜS) mit dem spezifischen mAk TRAP2 immunpräzipitiert und mit einem Antiserum, das beide TRAP-Formen erkennt, im Western Blot nachgewiesen. Unstim., unstimuliert.

3.1.5 Immunpräzipitation von TRAP mit einem CD40-Fusionsprotein

Die biologisch wirksame Aktivität von TRAP ist die Interaktion mit CD40, andere Rezeptoren oder Funktionen sind nicht bekannt. TRAP auf Thrombozyten kann daher nur eine

biologische Funktion erfüllen, wenn diese Bindungsfähigkeit erhalten ist. Um die Bindung an den Rezeptor nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation mit einem Fusionsprotein durchgeführt, bei dem die extrazelluläre Domäne von humanem CD40 an den Fc-Teil eines humanen IgG1-Moleküls gekoppelt wurde (Lauffer *et al.*, 1995).

Für die Immunpräzipitation wurden ein Lysat von unstimulierten Thrombozyten sowie ein Überstand von aktivierten Thrombozyten eingesetzt. Der Versuch wurde parallel mit einem TRAP-spezifischen Antikörper sowie einem CD40/Fc-Fusionsprotein durchgeführt, der Nachweis von TRAP erfolgte in einem Western Blot.

In Abb. 5 ist zu sehen, daß sich sTRAP und das membranständige TRAP mit dem CD40/Fc-Fusionsprotein immunpräzipitieren lassen. Es wurden etwa vergleichbare Mengen mit dem Antikörper und mit dem Fusionsprotein detektiert.

Da beide TRAP-Formen von Thrombozyten an CD40 binden, können sie auch biologisch wirksam sein.

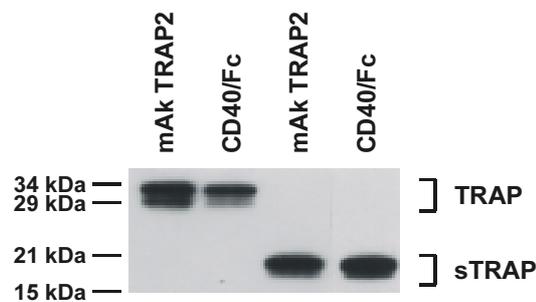


Abb. 5: Immunpräzipitation von TRAP und sTRAP mit einem CD40/Fc-Fusionsprotein

Jeweils gleiche Mengen an Protein wurden mit einem CD40/Fc-Fusionsprotein und dem TRAP-spezifischen mAk TRAP2 immunpräzipitiert und mit einem Antiserum, das beide TRAP-Formen erkennt, im Western Blot nachgewiesen.

3.1.6 Vergleich von TRAP aus Thrombozyten und T-Zellen

Beide TRAP-Varianten wurden bisher im wesentlichen auf T-Lymphozyten charakterisiert. Um festzustellen, ob auffällige Strukturunterschiede zwischen TRAP aus T-Lymphozyten und Thrombozyten bestehen, wurden diese im Western Blot verglichen.

Aus Lysaten von unstimulierten Thrombozyten und aktivierten T-Zellen sowie Kulturüberständen von aktivierten Thrombozyten und T-Zellen wurde TRAP mit einem spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und im Western Blot nachgewiesen.

Das Bandenmuster in Abb. 6 entspricht den Daten in der Literatur (Graf *et al.*, 1995; Pietravalle *et al.*, 1996). Die Transmembranform aus beiden Zelltypen besteht aus zwei Banden mit 33 und 29 kDa, und Unterschiede zwischen T-Lymphozyten und Thrombozyten lassen sich mit dieser Methode nicht feststellen. Für die beiden gezeigten sTRAP-Banden

ergab sich auch das gleiche apparente Molekulargewicht, jedoch finden sich leichte Unterschiede bei der jeweiligen Signalstärke: Bei den T-Lymphozyten geben die 17 und die 18-kDa-Bande ein Signal von ungefähr gleicher Intensität, während bei den Thrombozyten die 17-kDa-Bande deutlich schwächer ist. Weiterhin weisen T-Lymphozyten eine schwache Bande bei 15 kDa auf, die bei den Thrombozyten vollständig fehlt (nicht gezeigt). Da letztere Bande aber wahrscheinlich nicht biologisch aktiv ist (Mazzei *et al.*, 1995), wurde diesem Befund nicht weiter nachgegangen.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das membranständige TRAP aus Thrombozyten in einem Western Blot nicht von dem aus T-Lymphozyten zu unterscheiden ist. Die sTRAP-Banden sind bezüglich des Molekulargewichts ebenfalls identisch.

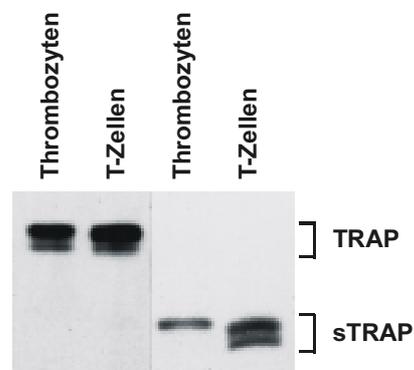


Abb. 6: Struktureller Vergleich von TRAP und sTRAP aus Thrombozyten und T-Lymphozyten

Die TRAP-Varianten wurden jeweils mit dem spezifischen mAk TRAP2 immunpräzipitiert. Die Auftrennung von TRAP erfolgte auf einem 14 % SDS-Gelelektrophorese gemäß Lämmli, die von sTRAP auf einer Gelelektrophorese gemäß Schägger und von Jagow. Der Nachweis erfolgte mit einem Antiserum, das beide TRAP-Formen erkennt, im Western Blot.

3.1.7 Nachweis der TRAP-mRNA in Megakaryozytenlinien

Zusätzlich zum Vergleich des Molekulargewichtes des TRAP-Proteins aus Thrombozyten und T-Zellen wurde auch die jeweilige mRNA analysiert, um die exakten Aminosäuresequenzen zu erhalten. Da Thrombozyten keine Protein-Neusynthese durchführen, muß das TRAP-Protein und auch die Boten-RNA aus deren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, stammen. Primäre Megakaryozyten können nicht in der für die RT-PCR notwendigen Reinheit isoliert werden; daher wurden zwei Zelllinien analysiert, die Eigenschaften von Megakaryozyten aufweisen: MEG-01 und UT-7 (Ogura *et al.*, 1985; Komatsu *et al.*, 1991).

Mit der RT-PCR ließ sich in beiden Zelllinien ein Transkript von der erwarteten Länge amplifizieren. Die kodierende Sequenz des Transkripts aus der Zelllinie UT-7 wurde

vollständig sequenziert. Ein Vergleich mit der Sequenz aus T-Lymphozyten (Graf *et al.*, 1992) ergab, daß beide identisch waren (nicht gezeigt).

TRAP auf Thrombozyten hat somit die gleiche Aminosäuresequenz wie TRAP auf T-Zellen.

3.1.8 Induktion der sTRAP-Freisetzung

In allen bisherigen Versuchen wurden Thrombozyten mit Thrombin stimuliert, das als sehr starker Agonist sowohl eine Aggregation als auch eine Ausschüttung der Granula bewirkt. Schwächere Agonisten können zwar eine Aggregation, aber keine Granulaausschüttung induzieren (Holmsen, 1994). Die Klärung der Frage, welche Agonisten die Freisetzung von sTRAP bewirken, gibt wichtige Hinweise auf den physiologischen Kontext, in dem TRAP *in vivo* exprimiert wird.

Thrombozyten wurden mit den aufgeführten Agonisten aktiviert und die sTRAP-Konzentration in den Überständen bestimmt. Zur Kontrolle, ob die jeweiligen Agonisten eine Aktivierung der Thrombozyten induzierten, wurde der Verlauf der Aggregationsreaktion aufgezeichnet. Möglich ist dies, da Thrombozyten in einer Einzelzellsuspension sichtbares Licht stärker streuen als Thrombozytenaggregate. Der Verlauf einer Aggregationsreaktion läßt sich somit bestimmen, indem man die Transmissionänderung einer Thrombozyten-suspension nach Zugabe von Aktivatoren in Abhängigkeit von der Zeit aufzeichnet.

In Abb. 7 sind für jeden Agonisten neben den induzierten sTRAP-Konzentrationen auch die aufgezeichneten Aggregationskurven dargestellt. Die jeweiligen Kurven entsprechen den Daten in der Literatur. Eine sTRAP-Freisetzung wird nur durch Collagen, Thrombin und durch die Kombination von ADP und Adrenalin induziert. Gemeinsam ist diesen Agonisten, daß sie eine Ausschüttung der Granula und somit eine irreversible Aggregation auslösen (erkennbar an den konstant hohen Transmissionswerten). ADP oder PAF allein, die nur eine reversible Aggregation auslösen, lösen hingegen keine sTRAP-Freisetzung aus. Adrenalin allein induziert keine detektierbare Veränderung der Aggregationskurve und keine erhöhte sTRAP-Freisetzung.

Die Freisetzung von sTRAP erfolgt nach Auslösung der irreversiblen Aggregation und ist damit an die Ausschüttung der Granula gekoppelt. Potente Agonisten sind Thrombin, Collagen und die Kombination von ADP mit Adrenalin.

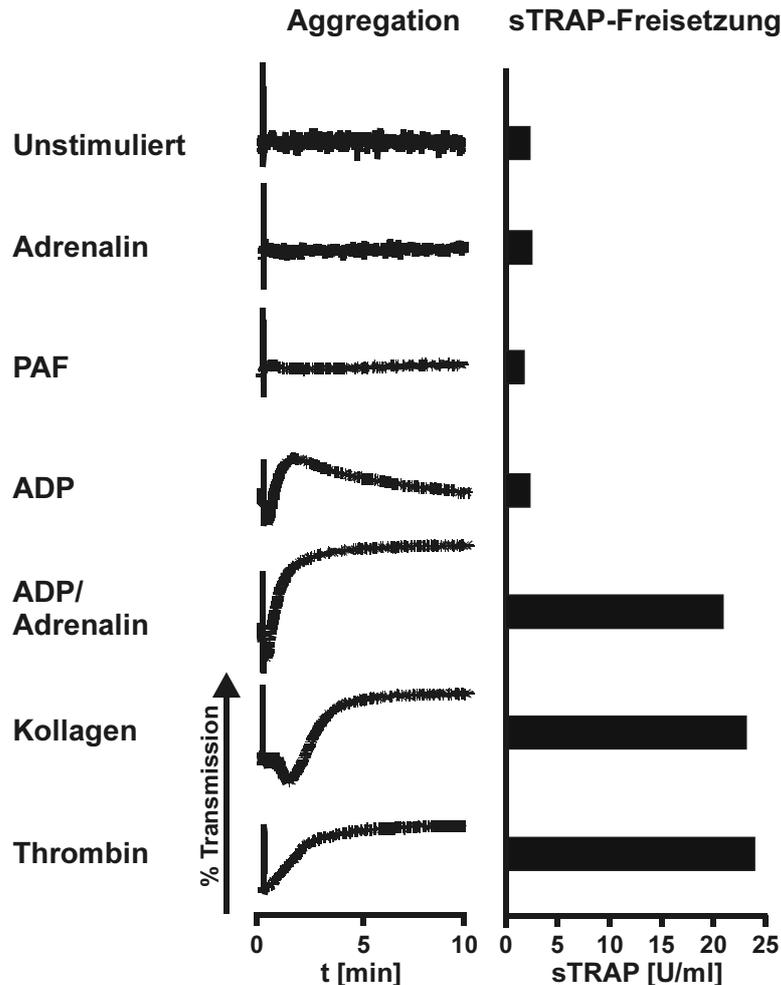


Abb. 7: Induktion der sTRAP-Freisetzung

Die Versuche wurden sowohl mit plättchenreichem Plasma sowie mit isolierten Thrombozyten in Puffer durchgeführt. Grundsätzlich verläuft die Aktivierung der Thrombozyten in beiden Lösungen gleich. Um die Daten verständlich zu präsentieren, wurden die Aggregationskurven in plättchenreichem Plasma aufgezeichnet (da nur in Gegenwart von externem Fibrinogen die reversible Aggregation detektierbar ist), die sTRAP-Konzentrationen jedoch in Puffer bestimmt (Serumkomponenten können zu einer Verfälschung der ELISA-Daten führen). Die Aggregationskurven geben den Verlauf der ersten 10 min nach Zugabe der Agonisten (erkennbar am Ausschlag), die sTRAP-Konzentration im zellfreien Kulturüberstand wurde nach 1 h bestimmt. Die gezeigten Werte ist repräsentativ für 3 Versuche in Plasma bzw. in plasmafreiem Puffer. ADP, Adenosindiphosphat; PAF, Plättchenaktivierender Faktor.

3.1.9 Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen über CD40

3.1.9.1 Koinkubation mit Thrombozyten

Im Verlauf der Blutgerinnung kommt es *in vivo* zu einem engen Kontakt von aktivierten Thrombozyten und der Gefäßwand. In kleineren Blutgefäßen exprimieren die Endothelzellen konstitutiv CD40 (Karmann *et al.*, 1995), und eine Aktivierung über diesen Rezeptor induziert die Expression von Adhäsionsmolekülen, die eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen (Karmann *et al.*; Hollenbaugh *et al.*; Yellin *et al.*; alle 1995). Da aktivierte

Thrombozyten TRAP exprimieren, erscheint es möglich, daß sie auf diesem Weg eine Aktivierung von Endothelzellen induzieren können.

Diese Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. J. R. Slupsky (Bad Nauheim) durchgeführt. Die Aufarbeitung der Endothelzellen erfolgte durch Dr. M. Gräfe (Berlin). Endothelzellen wurden aus humanen Nabelschnüren isoliert (HUVEC) und als Einzelzellschicht auf Kulturschalen kultiviert. Plasmafrei isolierte Thrombozyten wurden *in situ* mit Thrombin aktiviert und die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 auf den Endothelzellen nach 4 h Inkubation bei 37°C bestimmt. Die Aktivierung wurde in Gegenwart oder Abwesenheit eines blockierenden TRAP-spezifischen Antikörpers sowie eines unspezifischen Kontrollantikörpers durchgeführt. Für eine optimale Aktivierung darf das Kulturmedium kein Heparin enthalten, da dies eine hemmende Wirkung auf Thrombozyten ausübt (Rohrer *et al.*, 1992). Weiterhin muß frühzeitig ein enger Kontakt

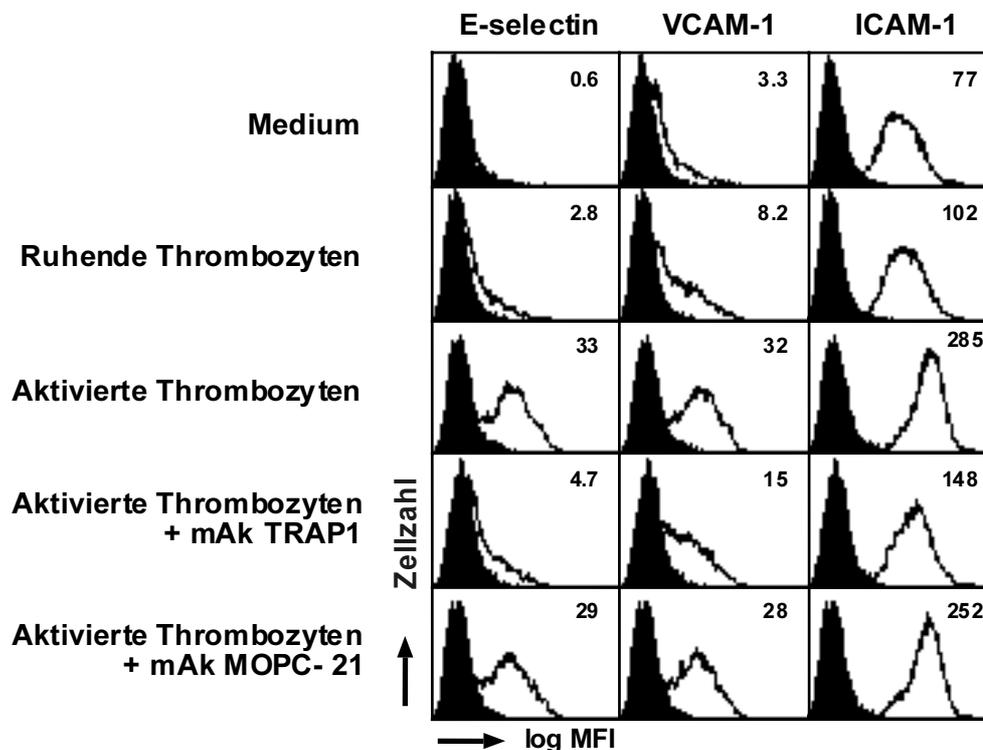


Abb. 8: Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen durch TRAP auf Thrombozyten

1×10^6 HUVEC wurden mit Kulturmedium, ruhenden und aktivierten Thrombozyten für 4 h bei 37°C inkubiert und die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Gesamtmenge der Thrombozyten betrug jeweils 2×10^8 , die Aktivierung erfolgte mit 0,2 U/ml Thrombin. Die Aktivierung erfolgte in Gegenwart oder Abwesenheit des TRAP-spezifischen mAk TRAP1 und des Kontrollantikörpers mAk MOPC-21 (je 10 µg/ml). Das unspezifische Hintergrundsignal ist in schwarz gezeigt, die eingefügten Zahlen geben die bereinigte geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 5 nach Etablierung der optimalen Stimulationsbedingungen.

zwischen Endothelzellen und aktivierten Thrombozyten hergestellt werden. Daher wurden die Thrombozyten sofort nach der Aktivierung mit Thrombin durch eine kurze Zentrifugation in unmittelbaren Kontakt mit der Endothelschicht gebracht.

Abb. 8 zeigt, daß aktivierte Thrombozyten bereits nach vier Stunden bei Endothelzellen die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, VCAM-1 und ICAM-1 induzieren bzw. verstärken. Dieser Effekt ist weitgehend von TRAP vermittelt, da in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers die Expression stark gehemmt ist (E-Selektin: 90 ± 9 %; VCAM-1: 71 ± 15 %; ICAM-1: 68 ± 7 %, n=5). Ein unspezifischer Kontrollantikörper hemmt die Aktivierung nicht. Unstimulierte Thrombozyten hatten nur eine geringe Wirkung auf die Endothelzellen, Thrombin allein induziert unter diesen Bedingungen keine signifikante Aktivierung (nicht gezeigt).

Durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen kann TRAP auf aktivierten Thrombozyten eine proinflammatorische Reaktion einleiten.

3.1.9.2 *Koinkubation mit einer TRAP-transfizierten Zelllinie*

Der obige Versuch (3.1.9.1) wurde in plasmafreiem Medium und damit in Abwesenheit aller Gerinnungsfaktoren durchgeführt. *In vivo* wird die Bindung von Thrombozyten an Endothelzellen jedoch in der Regel von dem Ablauf der Blutgerinnung begleitet, und es ist vorstellbar, daß eine effektive Interaktion zwischen diesen Zellpopulationen nur in einem Gerinnungspfropf stattfindet. Daher war unklar, ob die in Versuch 4.1.9.1 erzielte Stimulation der Endothelzellen über CD40 bereits das maximale Aktivierungsniveau darstellte. Zur Klärung dieser Frage wurden Endothelzellen mit einer transfizierten Zelllinie inkubiert, die TRAP in hoher Dichte auf der Oberfläche exprimiert (P3xTB.A7, Graf *et al.*, 1992).

Die Versuchsbedingungen waren identisch mit Versuch 4.1.9.1, nur auf die Zugabe von Thrombin wurde verzichtet. Zum Vergleich wurden die Endothelzellen mit der untransfizierten Mutterlinie (P3x63) sowie mit optimalen Mengen TNF- α inkubiert. Die eingesetzten Zelllinien sezernieren Wachstumsfaktoren, die die Aktivierung der Endothelzellen beeinflussen könnten. Um diesen Einfluß auszuschließen, wurden in einigen Versuchen die Zelllinien mit para-Formaldehyd fixiert und vor der Inkubation mit den Endothelzellen mehrfach gewaschen.

Abb. 9 zeigt, daß die TRAP-transfizierte Zelllinie eine sehr starke Expression aller drei Adhäsionsmoleküle induziert. Das erreichte Expressionsniveau beträgt bis zu 50 % des mit TNF- α erzielten Niveaus. Der TRAP-spezifische Antikörper blockierte die Aktivierung der Endothelzellen nahezu vollständig, während der Kontrollantikörper keine Auswirkungen hatte. Die Mutterlinie induzierte ebenfalls keine Expression von Adhäsionsmolekülen. Mit der fixierten Transfektante wurden im wesentlichen die gleichen Ergebnisse erzielt (nicht gezeigt).

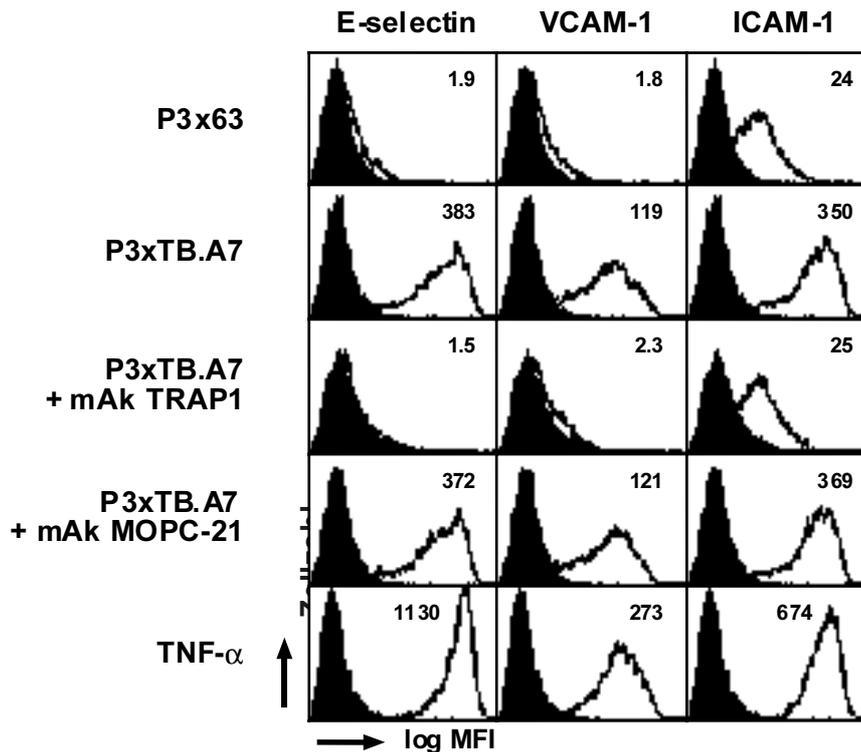


Abb. 9: Induktion von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen durch eine TRAP-transfizierte Zelllinie

1×10^6 HUVEC wurden mit der untransfizierten Mutterlinie P3x63 und der TRAP-transfizierten Zelllinie P3xTB.A7 (je $7,5 \times 10^6$ Zellen insgesamt) sowie mit 100 U/ml TNF- α für 4 h bei 37°C inkubiert und die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 in der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Inkubation mit der Zelllinie P3xTB.A7 erfolgte in Gegenwart oder Abwesenheit des TRAP-spezifischen mAk TRAP1 und des Kontrollantikörpers mAk MOPC-21 (je 10 μ g/ml). Das unspezifische Hintergrundsignal ist in schwarz gezeigt, die eingefügten Zahlen geben die bereinigte geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für 5 Versuche.

Unter optimalen Bedingungen kann eine Stimulation von Endothelzellen über CD40 ein sehr hohes Expressionsniveau von Adhäsionsmolekülen induzieren, daß mit dem durch TNF- α induzierten Niveau vergleichbar ist.

3.1.10 Induktion der Chemokinsekretion durch Endothelzellen über CD40

Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen ist die Sekretion von Chemokinen ein weiterer wichtiger Beitrag der Endothelzellen zur Entzündungsreaktion (Springer, 1994). Zum Zeitpunkt dieser Versuche war noch unklar, ob die Chemokinsekretion auch durch die Stimulation über CD40 ausgelöst werden kann.

Daher wurden in den zellfreien Kulturüberständen aus den Koinkubationen von Endothelzellen mit Thrombozyten (siehe 4.1.9.1) und der TRAP-transfizierten Zelllinie (siehe 4.1.9.2) die Konzentrationen der Chemokine IL-8 und MCP-1 bestimmt.

Man sieht deutlich, daß aktivierte Thrombozyten die Freisetzung von IL-8 und MCP-1 induzieren (Abb. 10 a,c). Die Blockade der TRAP/CD40-Interaktion die Chemokin-Sekretion nur zum Teil (IL-8: $39 \pm 19 \%$; MCP-1: $37 \pm 25 \%$; $n=3$). Der Kontrollantikörper hatte keinen signifikanten Einfluß, und unstimulierte Thrombozyten bewirkten nur eine geringe Erhöhung der Chemokinsekretion. Thrombin hatte in der verwendeten Konzentration keine aktivierende Wirkung (nicht gezeigt).

Die transfizierte Zelllinie löste ebenfalls sehr potent die Chemokin-Freisetzung aus, die untransfizierte Mutterlinie hatte keinen Effekt (Abb. 10 b,d). In diesem Fall blockierte der TRAP-spezifische Antikörper die Chemokinausschüttung vollständig. Der über CD40 induzierte Effekt erreichte 50-75 % der Wirkung von TNF- α in optimalen Konzentrationen.

Eine Stimulation von Endothelzellen über CD40 induziert, ähnlich wie TNF- α , eine starke Sekretion von Chemokinen. Aktivierte Thrombozyten lösen ebenfalls eine Chemokinsekretion aus, jedoch wird sie nur zum Teil über TRAP vermittelt.

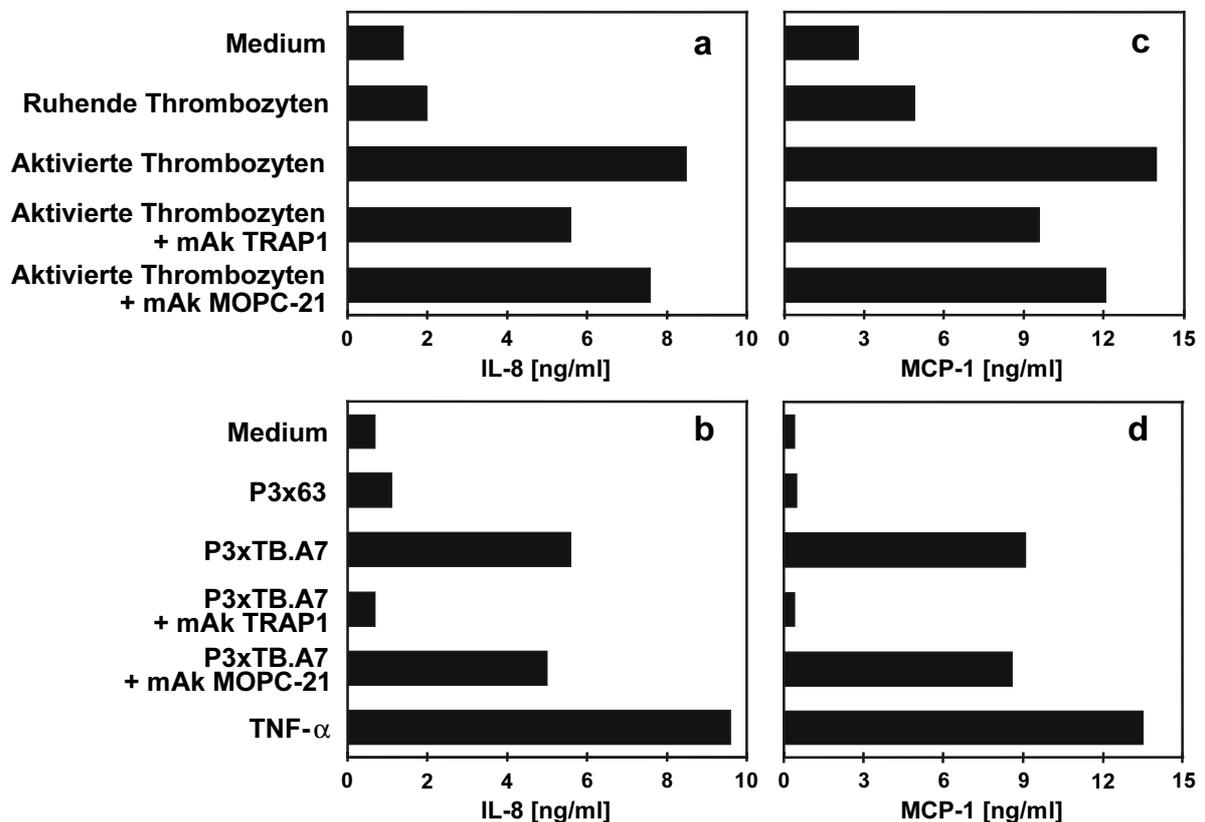


Abb. 10: Chemokinsekretion durch Endothelzellen nach Aktivierung über CD40

Die Kulturüberstände aus der Koinkubation von Endothelzellen mit Thrombozyten (a,c; siehe 3.1.9.1) sowie mit Zelllinien (b,d; siehe 3.1.9.2) wurden nach 4 h abgenommen und die Konzentration der Chemokine IL-8 (a,b) und MCP-1 (c,d) mit einem spezifischen ELISA bestimmt.

3.1.11 *in vivo* Nachweis der TRAP-Expression auf Thrombozyten

Bei den bisherigen Untersuchungen handelte es sich um *in vitro* Versuche. Um zu belegen, daß Thrombozyten auch *in vivo* TRAP exprimieren und daß diese Expression in unmittelbarer Nähe der Gefäßwand erfolgen kann, wurden Schnitte von frischen, intravaskulären Thromben untersucht.

Die angewendete Methode der Fixierung und Behandlung der Proben gewährleistete, daß nur das auf der Oberfläche exprimierte TRAP angefärbt wurde, und nicht die intrazelluläre Speicherform. Zum Beleg dienen die Abbildungen mit der konfokalen Mikroskopie, die von von Dr. R. Förster (Berlin) erstellt wurden: Nur auf den aktivierten Thrombozyten (Abb. 11 b) ist eine TRAP-Expression zu detektieren, ruhende Thrombozyten erscheinen negativ (Abb.11 a).

Abbildungen 11 c-f zeigt einen frischen Thrombus in der Vena femoralis, der von Dr. I. Anagnostopoulos analysiert wurde. Am unteren Rand der Abb. 11 c ist die Gefäßwand zu erkennen an der der Thrombus haftet. Die Thrombozyten sind rot angefärbt; im Thrombus gibt es Regionen, in denen Thrombozyten stark vertreten sind, während andere Bereiche vor allem aus Fibrinmatrix bestehen. Abb. 11 d und e sind Ausschnittsvergrößerungen der Regionen R1 bzw. R2 (wie in Abb. 11 c markiert), das TRAP-Protein ist rot angefärbt. Ein großer Teil der Thrombozyten (40-80 %) exprimiert TRAP, und in unmittelbarer Nähe kann man anhand der blauen Kernfärbung Leukozyten identifizieren. In Abb. 11 f ist ein Thrombus zu sehen, der auf der Oberfläche eines atherosklerotischen Plaques sitzt. An der Kontaktfläche von Endothel und Thrombus (durch Pfeilspitzen markiert) sieht man Thrombozyten, die eindeutig das rot angefärbte TRAP auf der Oberfläche exprimieren.

Zusammengefasst zeigt Abb. 11, daß Thrombozyten *in vivo* TRAP auf ihrer Oberfläche exprimieren, und daß diese Expression in unmittelbarer räumlicher Nähe der Gefäßwand stattfinden kann.

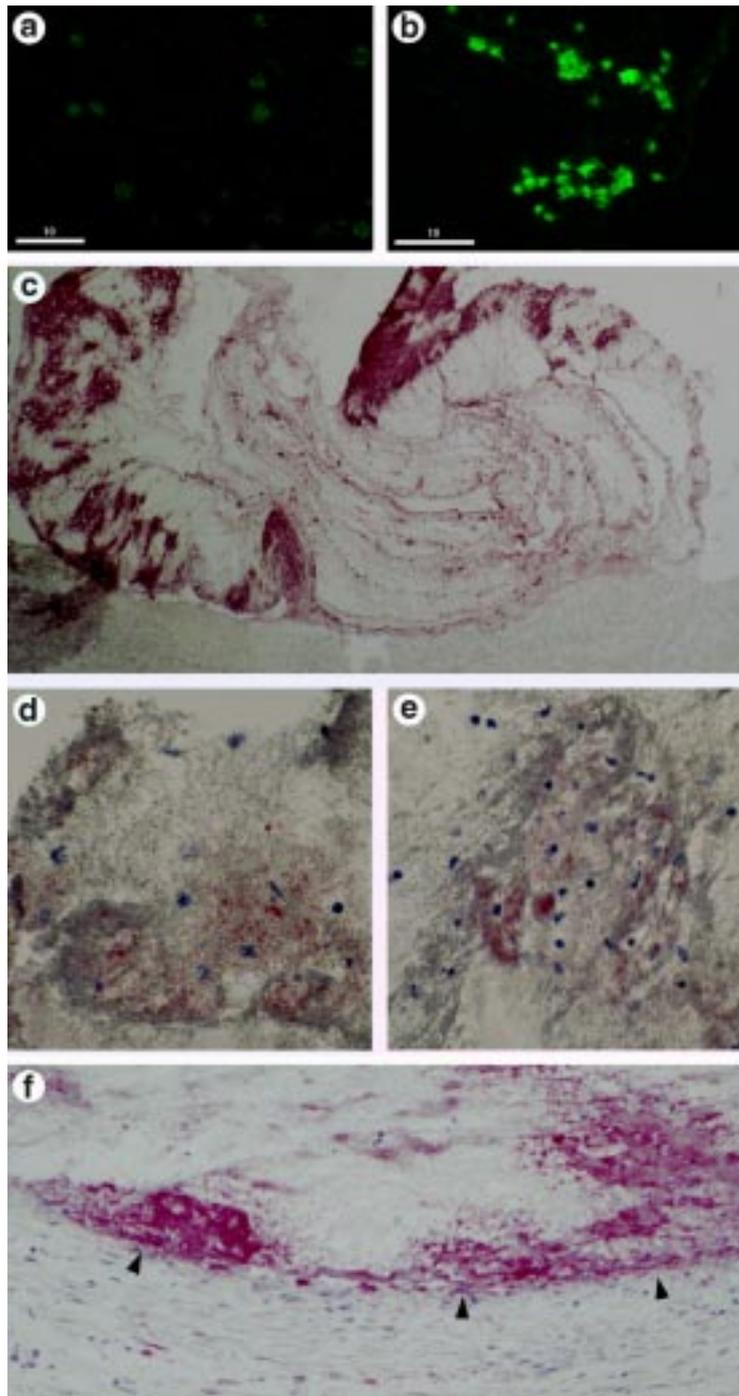


Abb. 11: *In vivo* Expression von TRAP auf aktivierten Thrombozyten

Expression von TRAP auf unstimulierten (a) und aktivierten Thrombozyten (b) mit einem konfokalen Mikroskop (der Balken entspricht 10 μ M). (c) Schnitt durch einen frischen intravaskulären Thrombus in der Vena femoralis. Angefärbt ist das thrombozytenspezifische Antigen CD42b (Originalvergrößerung 10 \times). (d), (e), Vergrößerung der Regionen R1 bzw. R2 (wie in c markiert). Angefärbt ist TRAP (Originalvergrößerung 66 \times , aufeinanderfolgende Serienschnitte). (f) Schnitt durch einen Thrombus auf einem atherosklerotischen Plaque. Angefärbt ist TRAP, die Pfeilspitzen markieren die Grenzfläche von Gefäß und Thrombus (Originalvergrößerung 86 \times). Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für 5 untersuchte frische intravaskuläre Thromben.

3.1.12 Funktion von sTRAP auf Endothel

Bei den bisherigen Versuchen zur biologischen Funktion stand die Membranform von TRAP im Vordergrund. Es besteht aber die Möglichkeit, daß auch das sTRAP biologisch wirksam ist, da es an CD40 bindet (siehe 3.1.5), und andere Arbeitsgruppen Endothelzellen über ein lösliches CD40-Fusionsprotein aktivieren konnten (Karmann *et al.*, Hollenbaugh *et al.*, beide 1995). Da unserem Labor auch das native sTRAP-Molekül zur Verfügung steht, ließ sich testen, ob es allein oder im Zusammenspiel mit anderen Agonisten aktivierend auf Endothelzellen wirkt.

Da es hierbei wichtig war, möglichst viele Ansätze parallel und mit statistischer Signifikanz durchzuführen, wurde die Versuche mit einem Zell-ELISA durchgeführt. sTRAP wurde allein sowie in Verbindung mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1, TNF- α und Thrombin verwendet. Die eingesetzte sTRAP-Konzentration lag wesentlich höher als die maximalen Werte, die wir in Serumproben messen konnten. IL-1 und TNF- α , beides sehr starke Aktivatoren von Endothelzellen, wurden titriert bis zu dem Punkt, an dem keine Endothelzellaktivierung mehr meßbar war. Da sich bei den bisherigen Versuchen keine Anzeichen für eine differentielle Regulation der untersuchten Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen durch CD40 ergeben hatten, wurde nur die Expression von VCAM-1 analysiert. In den Kulturüberständen wurde die Konzentration von IL-8 bestimmt.

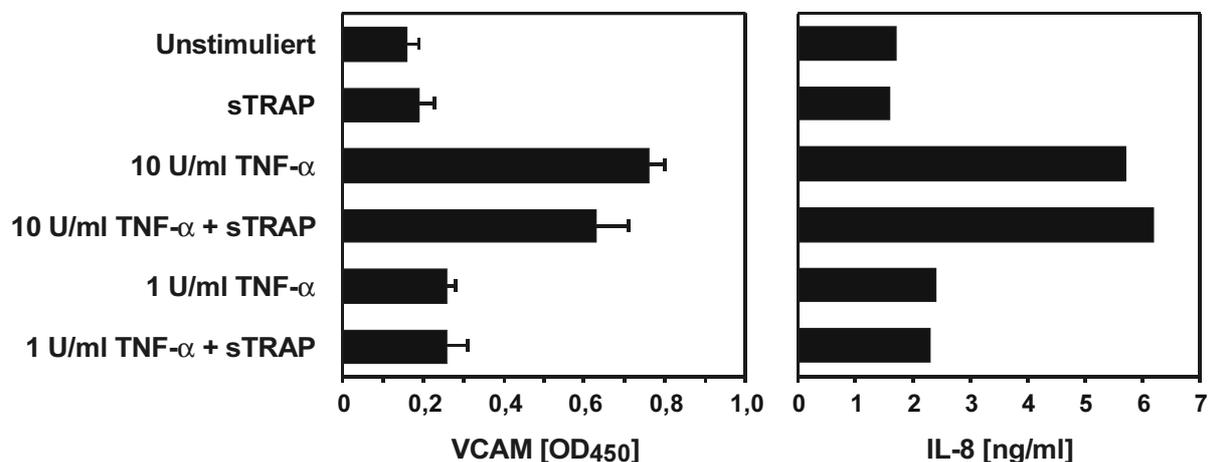


Abb. 12: Funktion von sTRAP auf Endothelzellen

HUVEC wurden auf Mikrotiterplatten kultiviert und für 6 h mit Medium, 1000 U/ml sTRAP und TNF- α (10 U/ml bzw. 1 U/ml) inkubiert. Die Aktivierung mit TNF- α erfolgte in Gegenwart oder Abwesenheit von 1000 U/ml sTRAP. Die VCAM-1-Expression wurde mit einem Zell-ELISA ermittelt (gezeigt ist der Mittelwert und die Standardabweichung von Vierfachwerten). Die IL-8-Sekretion wurde aus den Kulturüberständen des gleichen Experiments bestimmt (die Überstände der Vierfachwerte wurden vereinigt).

sTRAP allein induziert weder die Expression von VCAM-1 noch die Sekretion von IL-8 durch Endothelzellen (Abb. 12). Auch in Kombination mit TNF- α werden keine Synergieeffekte erzielt. Das gleiche gilt für die Kombination mit IL-1 und Thrombin (nicht gezeigt).

Man kann daher sagen, daß sTRAP - im Kontrast zu membranständigem TRAP - weder allein noch in Kombination mit anderen Agonisten eine Aktivierung der Endothelzellen bewirkt.

3.1.13 sTRAP als Marker für die Thrombozytenaktivierung *in vivo*

Nach Aktivierung geben Thrombozyten große Mengen sTRAP in das Blutplasma ab. Daher erschien es vorstellbar, daß sTRAP *in vivo* als Marker für eine Thrombozytenaktivierung dienen könnte.

In Zusammenarbeit mit dem Deutschen Herzzentrum Berlin und dem Universitätsklinikum Charité wurden in einer Vorstudie Plasmaproben von Patienten gesammelt, bei denen mutmaßlich eine starke Thrombozytenaktivierung stattgefunden hatte. Speziell wurden Patienten nach einer erfolgten Lebertransplantation, nach Beseitigung eines Gefäßverschlusses und nach erfolgter perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) untersucht. Weiterhin wurde eine Gruppe von starken Allergikern ausgesucht. Die Gruppen bestanden aus jeweils etwa 10 Patienten.

In keiner der Patientengruppen wurden signifikant erhöhte sTRAP-Werte im Plasma gefunden. Möglicherweise ist der Anteil der *in vivo* aktivierten Thrombozyten zu gering, um einen meßbaren Anstieg der sTRAP-Konzentration im Blutplasma zu bewirken. Zusätzlich könnte CD40, das in weiten Teilen des Gefäßsystems exprimiert ist, das entstandene sTRAP gebunden und so rasch aus dem Blut entfernt haben. Letzlich kommt erschwerend hinzu, daß Plasmaproben bei dem eingesetzten ELISA einen hohen unspezifischen Hintergrund verursachen, so daß geringfügige Veränderungen der sTRAP-Konzentration nicht nachweisbar sind.

Da die Ergebnisse dieser Vorstudie so eindeutig negativ waren, wurde von der Durchführung einer klinischen Studie mit größeren Patientenzahlen abgesehen.

3.2 CD40 auf Thrombozyten

3.2.1 Oberflächenexpression von CD40

Im Laufe dieser Arbeit fiel auf, daß Thrombozyten nicht nur TRAP, sondern auch den Rezeptor CD40 exprimieren. Da CD40 ebenfalls ein Transmembranprotein ist (Stamenkovic *et al.*, 1989), wurde dessen Expression auf der Oberflächen der Thrombozyten bestimmt.

Thrombozyten wurden entweder unstimuliert gelassen oder für unterschiedliche Zeiträume mit Thrombin aktiviert. Dann wurde jeweils die Oberflächenexpression von CD40 im Vergleich zu TRAP bestimmt.

Abb. 13 zeigt, daß CD40 im Gegensatz zu TRAP schon auf unstimulierten Thrombozyten nachweisbar ist. Eine Aktivierung der Zellen hat zu keinem Zeitpunkt einen Einfluß auf das Expressionsniveau von CD40, während TRAP in diesem Versuch nach 1 min maximal exprimiert wird und nach 4 h fast vollständig abgeschnitten ist.

Im Gegensatz zu TRAP wird CD40 also konstitutiv auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert.

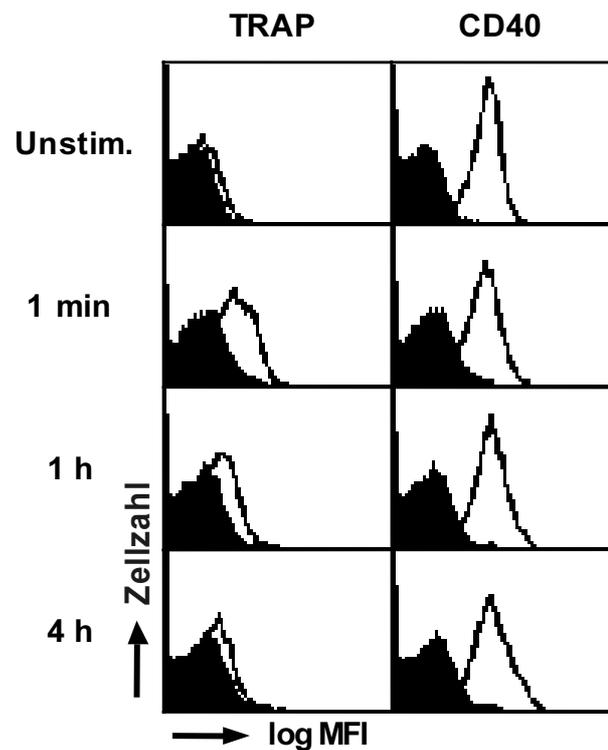


Abb. 13: Oberflächenexpression von CD40 auf Thrombozyten

Die Oberflächenexpression von TRAP und CD40 wurde auf unstimulierten und aktivierten Thrombozyten mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt. Die Thrombozyten wurden in einem plasmafreien Puffer für die angegebenen Zeiträume mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert. Das unspezifische Hintergrundsignal ist in schwarz gezeigt, die eingefügten Zahlen geben die bereinigte geometrische mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt 3.

3.2.2 Western Blot zur Detektion von CD40

Um eindeutig zu belegen, daß es sich bei dem in der Durchflußzytometrie detektierten Signal (3.2.1) um CD40 handelt, wurde ein Western Blot durchgeführt. Zum Vergleich wurde CD40 aus mononukleären Zellen und Endothelzellen mitgeführt.

Lysate von unstimulierten Thrombozyten, mononukleären Zellen (PBMC) und Endothelzellen wurden mit einem CD40-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert und CD40 mit einem spezifischen Antiserum im Western Blot nachgewiesen. Die Fraktion der mononukleären

Zellen besteht aus diversen Zellpopulationen, von denen im wesentlichen B-Zellen und Monozyten CD40 exprimieren.

In dem Western Blot werden zwei Banden von etwa 48 kDa und 43 kDa detektiert (Abb. 14). Dies steht in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Clark *et al.*, 1986; Péguet-Navarro *et al.*, 1997). Beim Vergleich von CD40 aus den verschiedenen Zellpopulationen sind keine Unterschiede bezüglich des Molekulargewichts und des Bandenmusters erkennbar.

Es konnte also bestätigt werden, daß Thrombozyten CD40 exprimieren.

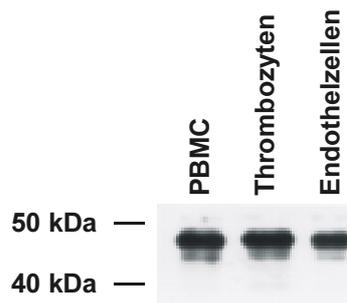


Abb. 14: Vergleich von CD40 aus Thrombozyten mit anderen Zellpopulationen im Western Blot
 CD40 wurde aus Lysaten von unstimulierten Thrombozyten, PBMC und Endothelzellen mit dem CD40-spezifischen mAk G28-5 immunpräzipitiert und mit einem spezifischen Antiserum nachgewiesen. Die Molekulargewichte wurden anhand eines Proteinstandards bestimmt. PBMC, periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut.

3.2.3 Stimulation der Thrombozytenaggregation über CD40

Aggregationsversuche sind bei Thrombozyten eine gängige und sensitive Methode, um den Verlauf der Aktivierung zu charakterisieren. Die Gestaltveränderung und die reversible Aggregation sind in der Regel die ersten Reaktionen der Thrombozyten auf einen Stimulus - fast alle agonistischen Rezeptoren haben entweder einen hemmenden oder verstärkenden Einfluß auf diese Prozesse. Daher wurde im folgenden untersucht, ob auch eine Aktivierung über CD40 einen Einfluß auf die Thrombozytenaggregation hat.

Als Stimulans wurde in den meisten Fällen der CD40-spezifische Antikörper mAk G28-5 eingesetzt. Von diesem Antikörper konnte gezeigt werden, daß er die Proliferation von B-Zellen in Gegenwart anderer Agonisten erhöht (Ledbetter *et al.*, 1987) und daß er Proteinphosphorylierungen induziert (Uckun *et al.*, 1991). Um eine Quervernetzung von CD40 zu erzielen, wurde der mAk G28-5 in einigen Versuchen mit einem Ziege-anti-Maus-Immunglobulin Serum quervernetzt. Weiterhin wurde als Stimulans auch die TRAP-transfizierte Zelllinie P3xTB.A7 eingesetzt. Die Stimulation von CD40 erfolgte entweder ohne zusätzliche Agonisten oder in Gegenwart von suboptimalen Konzentrationen von Collagen, ADP, Adrenalin und PAF.

Unter diesen Versuchsbedingungen hat die Ligandierung von CD40 auf Thrombozyten keinen Einfluß auf die Aggregationsreaktion. Man kann damit jedoch nicht ausschließen, daß unter anderen Bedingungen eine begrenzte Modulation der Wirkung anderer Agonisten zu beobachten wäre. Ein Beitrag von CD40 zur Aggregationsreaktion wäre aber auf jeden Fall nur von untergeordneter Bedeutung, und eine wesentliche Mitwirkung bei der Thrombozytenaggregation *in vivo* ist nicht zu erwarten.

3.2.4 Einfluß der Interaktion von TRAP und CD40 auf die sTRAP-Freisetzung

TRAP auf T-Zellen wird sehr schnell von der Oberfläche entfernt, nachdem es an CD40 gebunden hat (Yellin *et al.*, 1994; Ludwig *et al.*, 1996). In Gegenwart eines Antikörpers, der die Interaktion von TRAP mit CD40 unterbindet, wird die Oberflächenexpression von TRAP stabilisiert. Da auch bei Thrombozyten eine rasche Proteolyse von membranständigem TRAP zu beobachten ist, wurde untersucht, ob die Bindung an CD40 zu diesem Abschneiden beiträgt.

Thrombozyten wurden mit Thrombin für unterschiedliche Zeiträume aktiviert und die Freisetzung von sTRAP in Gegenwart oder Abwesenheit eines blockierenden Antikörpers bzw. eines Kontrollantikörpers bestimmt. Weiterhin wurden Immunpräzipitationen aus dem Überstand und Lysat von Thrombozyten durchgeführt, die in Gegenwart oder Abwesenheit eines blockierenden F(ab')₂-Fragments für 1 h mit Thrombin stimuliert wurden.

Die Freisetzung von sTRAP in den Überstand ist in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers bei allen untersuchten Zeitpunkten zu etwa 80 % inhibiert (Abb. 15). Ein Kontrollantikörper hat keinen Einfluß. Auch im Western Blot (Abb. 16) ist deutlich zu erkennen, daß die Proteolyse des membranständigen TRAP deutlich gehemmt ist.

Bei Thrombozyten induziert die Interaktion von TRAP mit CD40 die Proteolyse der Membranform und somit die Freisetzung von sTRAP.

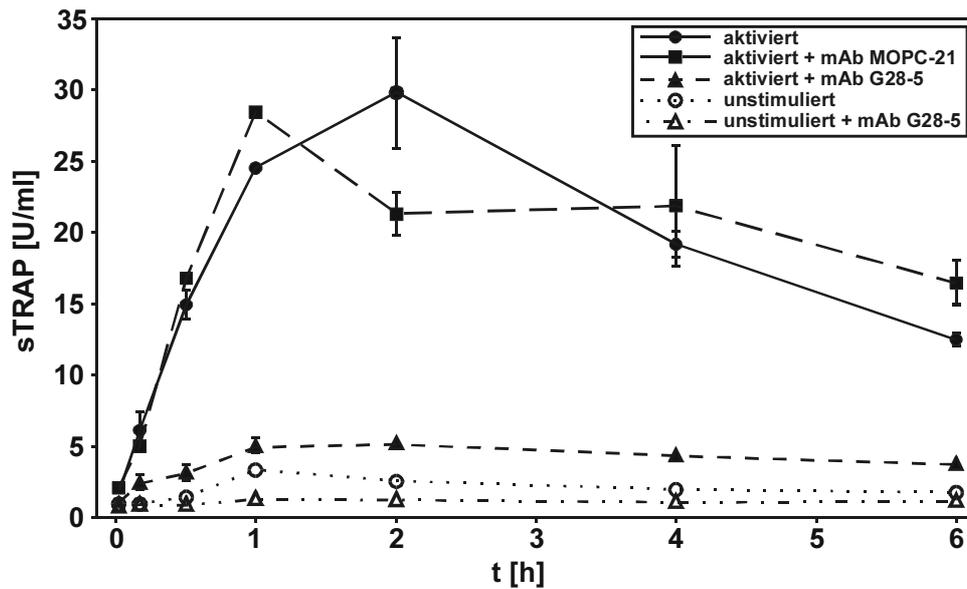


Abb. 15: sTRAP-Freisetzung in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers

Plasmafrei isolierte Thrombozyten wurden in Gegenwart oder Abwesenheit des CD40-spezifischen mAk G28-5 oder des unspezifischen Kontrollantikörpers mAk MOPC-21 (je 10 µg/ml) mit 0,2 U/ml Thrombin stimuliert; unstimulierte Thrombozyten dienten als Kontrolle (jeweils Doppelwerte). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die sTRAP-Konzentration mit einem spezifischen ELISA im zellfreien Kulturüberstand bestimmt.

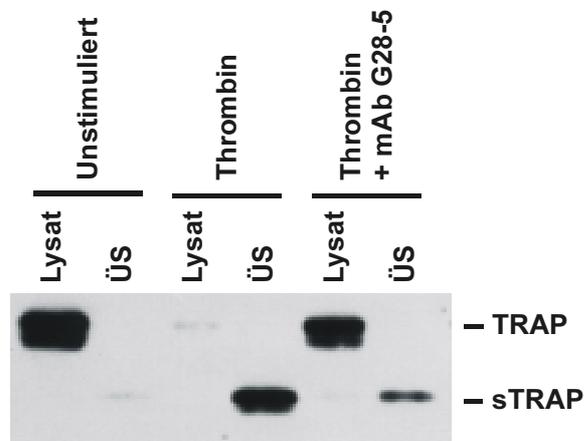


Abb. 16: Proteolyse von TRAP in Gegenwart eines blockierenden Antikörpers

Thrombozyten wurden für 1 h in Gegenwart oder Abwesenheit eines F(ab')₂-Fragments des CD40-spezifischen mAk G28-5 (10 µg/ml) mit 0,2 U/ml Thrombin aktiviert; unstimulierte Thrombozyten dienten als Kontrolle. TRAP wurde aus den Zell-Lysaten (Lysat) und Kulturüberständen (ÜS) mit dem spezifischen mAk TRAP2 immunpräzipitiert und mit einem spezifischen Antiserum im Western Blot nachgewiesen. ÜS, Kulturüberstand.