

## **4 Diskussion**

Thrombozyten werden allgemein als hämostatische Zellen angesehen, während die Transmembranproteine TRAP und CD40 vor allem wegen ihrer Rolle im Immunsystem bekannt sind. In dieser Arbeit wird erstmals vorgestellt, daß Thrombozyten durch die Expression des Transmembranproteins TRAP auch eine proinflammatorische Reaktion von Endothelzellen induzieren. Weiterhin wird nachgewiesen, daß Thrombozyten den Rezeptor CD40 koexprimieren, der an der Regulation seines Liganden TRAP beteiligt ist.

### **4.1 Expression und Induktion von TRAP auf Thrombozyten**

Die Expression und Induktion des Oberflächenproteins TRAP wurde bisher im wesentlichen auf T-Zellen untersucht. Wir können hier zum ersten Mal Daten vorstellen, die dieses Protein auch auf humanen Thrombozyten charakterisieren. TRAP ist bereits bei unstimulierten Thrombozyten nachweisbar, die es als Transmembranprotein in einem intrazellulärem Kompartiment speichern. T-Zellen hingegen exprimieren TRAP erst nach Aktivierung und nach Einleitung einer *de-novo*-Proteinsynthese. Eine intrazelluläre Lokalisation von TRAP wurde bisher erst bei einer Teilpopulation von T-Zellen in lymphatischen Geweben berichtet (Casamayor-Palleja *et al.*, 1995; Dürkopp *et al.*, 1997). Diese T-Zellen sind zu einem großen Teil aktiviert, und wahrscheinlich wird TRAP erst nach erfolgter Oberflächenexpression wieder in das Zellinnere transportiert wird (Yellin *et al.*, 1994). Eine Speicherform von TRAP, die wie bei Thrombozyten in allen unstimulierten Zellen vorhanden ist, ist nicht beschrieben. Im menschlichen Blutkreislauf muß diese Speicherform – in Anbetracht der  $1 \times 10^{12}$  zirkulierenden Thrombozyten – als bedeutendste Quelle von biologisch aktivem TRAP angesehen werden.

Thrombozyten bilden die einzige Zellpopulation, die beim Ablauf der Blutgerinnung TRAP freisetzt. Thrombin induziert innerhalb von Sekunden die Expression von TRAP auf der Thrombozytenoberfläche, wodurch eine sofortige Aktivierung von CD40-tragenden Zellen im Gefäßsystem ausgelöst werden kann. T-Zellen benötigen selbst nach optimaler Aktivierung mehrere Stunden, um TRAP *de novo* zu synthetisieren und auf der Oberfläche zu exprimieren (Spriggs *et al.*, 1992). Eine gleichzeitig mit der Gerinnungskaskade ablaufende Aktivierung von Zellen über CD40 kann somit nur durch Thrombozyten erfolgen, T-Zellen wären dazu erst deutlich später in der Lage.

Eine TRAP-Expression ist nicht nur durch Thrombin induzierbar, sondern durch alle Agonisten, die eine irreversible Aggregation und eine Ausschüttung der Granula auslösen. Daher muß man davon ausgehen, daß auch *in vivo* jede irreversible Aggregation von Thrombozyten zu der Expression von TRAP führt. Diese weitgehend unspezifische Induktion kontrastiert mit der strengen Regulation von TRAP auf T-Zellen, bei denen eine Expression erst nach spezifischer Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen induziert wird.

Dieser Vergleich von Thrombozyten und T-Zellen zeigt deutlich, daß in Bezug auf die Induktion, Kinetik und Spezifität der TRAP-Expression grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen existieren. Zieht man auch die sehr unterschiedlichen biologischen Funktionen von T-Zellen und Thrombozyten in Betracht, dann erscheint es wahrscheinlich, daß diese Zellen TRAP nicht nur unter deutlich anderen Umständen exprimieren, sondern daß TRAP jeweils auch andere Wirkungen ausübt. Die TRAP-Expression auf Thrombozyten und T-Zellen wäre somit nicht redundant, sondern sie würden sich gegenseitig ergänzen. Unterstützt wird diese Annahme durch die jüngeren Erkenntnisse, die CD40 eine Rolle in zwei unterschiedlichen Prozessen zuweisen: der spezifischen Immunantwort und der allgemeinen Entzündungsreaktion (Stout *et al.*, 1996).

#### 4.2 Lokalisation und Struktur von TRAP auf Thrombozyten

Ruhende Thrombozyten speichern TRAP in einem intrazellulärem Kompartiment, von dem aus es sehr schnell in die Oberflächenmembran integriert werden kann. Die Identität dieses intrazellulären Kompartiments wurde nicht geklärt, zwei Befunde deuten jedoch auf eine Lokalisation von TRAP in den Granula hin: Erstens wird TRAP erst nach der irreversiblen Aggregation und somit nach Ausschüttung der Granula freigesetzt, und zweitens korreliert die Oberflächenexpression von TRAP mit der von P-Selektin, einem in den  $\alpha$ -Granula lokalisiertem Transmembranprotein (Stenberg *et al.*, 1985). Alternativ könnte TRAP auch in dem offenen Kanalsystem gespeichert werden. Da die genaue Lokalisation von TRAP in Thrombozyten sehr schwierig ist und keine zusätzlichen Erkenntnisse bezüglich dessen Funktion *in vivo* erwarten läßt, wurden in dieser Richtung keine systematischen Untersuchungen durchgeführt.

Bei T-Zellen gibt es starke Indizien dafür, daß sTRAP durch Proteolyse aus der Membranform entsteht (Graf *et al.*, 1995). Für Thrombozyten läßt sich diese Vermutung eindeutig beweisen, da unstimulierte Thrombozyten nur die Transmembranform exprimieren und sTRAP bereits wenige Minuten nach der Aktivierung nachweisbar ist. Da auch eine signifikante Proteinneusynthese bei Thrombozyten auszuschließen ist, kann sTRAP nur durch eine proteolytische Spaltung der Membranform gebildet werden.

Ein struktureller Vergleich der TRAP-Varianten aus Thrombozyten mit jeweils entsprechenden Varianten aus den T-Zellen ergibt, daß die Membranformen bezüglich ihres Molekulargewichts und des Bandenmusters vergleichbar sind. Die beiden Hauptbanden von sTRAP haben ebenfalls ein vergleichbares Molekulargewicht, es finden sich jedoch leichte Unterschiede bezüglich der relativen Proteinmengen. Eine biologisch vermutlich nicht aktive Form von sTRAP (Mazzei *et al.*, 1995) fehlt bei Thrombozyten ganz. Dies deutet darauf hin, daß die Proteolyse der Membranform bei T-Zellen und Thrombozyten über einen leicht modifizierten Mechanismus abläuft.

Sowohl die membranständige als auch die lösliche Form von TRAP aus Thrombozyten binden an CD40. Thrombozyten besitzen damit grundsätzlich die Fähigkeit, alle CD40-tragenden Zellen zu aktivieren.

### 4.3 Funktion von TRAP auf Thrombozyten

Eine Verletzung des Gefäßsystems führt zur Interaktion von Thrombozyten und Endothelzellen. Vor kurzem wurde berichtet, daß die Stimulation von Endothelzellen über CD40 die Expression von Adhäsionsmolekülen sowie die Sekretion von Chemokinen induziert und so zur Einleitung einer entzündlichen Reaktion beiträgt (Karmann *et al.*, Hollenbaugh *et al.*, Yellin *et al.*, alle 1995; Déchanet *et al.*, 1997). Wir haben uns die Frage gestellt, ob auch TRAP auf Thrombozyten diese Effekte auslösen kann. Unsere Versuche zeigen, daß aktivierte Thrombozyten - im Gegensatz zu ruhenden Zellen - die Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sowie die Sekretion der Chemokine IL-8 und MCP-1 durch Endothelzellen induzieren. Diese Aktivierung wird zu einem großen Teil über CD40 vermittelt, da eine Blockade der TRAP-Aktivität die Expression der Adhäsionsmoleküle zu 70 bis 90 % und die Chemokinsekretion zu etwa 40 % hemmt. Thrombozyten können also durch die Expression von TRAP eine Entzündungsreaktion der Endothelzellen auslösen.

Die Aktivierung der Endothelzellen über CD40 ist deutlich stärker, wenn sie mit einer TRAP-transfizierten Zelllinie inkubiert werden. Die Adhäsionsmoleküle erreichen in diesem System ein Expressionsniveau, das die gleiche Größenordnung erreicht wie nach einer optimalen Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IL-1, den potentesten proinflammatorischen Zytokinen. Diese Beobachtung korrigieren die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die über CD40 eine wesentlich schwächere Aktivierung von Endothelzellen erzielen konnte als mit IL-1 und TNF- $\alpha$  (Karmann *et al.*, 1996a). Diese Gruppe hat allerdings zur Aktivierung der Endothelzellen ein lösliches Fusionsprotein eingesetzt, das nicht so stark agonistisch wirkt wie natives, membranständiges TRAP.

Die TRAP-transfizierte Zelllinie erzielt aber auch im Vergleich mit Thrombozyten eine wesentlich stärkere Endothelzellaktivierung. Eventuell ist unter den verwendeten Bedingungen eine effektive Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothelzellen nicht möglich, da die Versuche in Abwesenheit von Plasmakomponenten durchgeführt wurden. Es ist vorstellbar, daß *in vivo* die Bindung der Zellen aneinander durch die Bildung eines Thrombus wesentlich verstärkt wird.

Im Gegensatz zur Membranform induziert natives sTRAP keine Aktivierung der Endothelzellen. Mit rekombinanten löslichen TRAP-Fusionsproteinen können andere Arbeitsgruppen - im Widerspruch zu unseren Ergebnissen - jedoch Endothelzellen aktivieren (Karmann *et al.*; Hollenbaugh *et al.*, beide 1995). Vermutlich weisen diese Fusionsproteine veränderte Bindungseigenschaften auf, und können somit nicht als Modell für die physiologische Situation dienen. In unserem System verstärkte sTRAP auch nicht die Wirkung von anderen Agonisten wie TNF- $\alpha$  und IL-1. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß sTRAP an der Aktivierung anderer CD40-tragender Zellen beteiligt ist. Der Versuch, sTRAP als Marker für eine Thrombozytenaktivierung *in vivo* bei unterschiedlichen Patientengruppen zu etablieren, blieb erfolglos.

Als wesentliches Ergebnis dieser Versuche kann man festhalten, daß Thrombozyten nicht nur bei der Blutstillung, sondern auch bei der Entzündungsreaktion mitwirken. Thrombozyten exprimieren weitere Moleküle, die die proinflammatorische Wirkung von TRAP verstärken können (Herd *et al.*, 1995). Das von Thrombozyten produzierte PAF wirkt nicht nur als autokriner Agonist, sondern es aktiviert auch Neutrophile, Makrophagen, Endothelzellen und Lymphozyten (Snyder, 1990). Aus den Thrombozytengranula werden diverse Chemokine freigesetzt, die die Leukozytenmigration unterstützen: RANTES wirkt chemotaktisch auf Eosinophile und T-Zellen (Kameyoshi *et al.*, 1992), PF<sub>4</sub> (Plättchen Faktor 4) lockt alle Granulozytenpopulationen sowie Monozyten an (Brindley *et al.*, 1983; Deuel *et al.*, 1981), und das  $\beta$ -Thromboglobulin und verwandte Proteine wirken auf Neutrophile (Walz *et al.*, 1989).

Auf Thrombozyten wurde auch eine IL-1-Aktivität nachgewiesen, die eine Stimulation von Endothelzellen auslöst (Hawrylowicz *et al.*, 1989 und 1991). Gezeigt wurde eine Induktion der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und ICAM-1 durch aktivierte Thrombozyten, die fast vollständig durch die Blockade von IL-1 verhindert werden kann. Dies steht im Widerspruch zu unseren Versuchen, bei denen die Adhäsionsmoleküle im wesentlichen durch TRAP induziert werden. Weiterhin haben Kaplanski *et al.* (1993) gezeigt, daß Thrombozyten eine IL-8-Sekretion von Endothelzellen auslösen, die zu etwa 50 % durch IL-1 verursacht wird. Da TRAP gemäß unseren Daten zu etwa 40 % beteiligt ist, könnte dies darauf hindeuten, daß TRAP und IL-1 einen gleichwertigen Beitrag zur Induktion der Chemokinsekretion leisten. Es bedarf jedoch weiterer Untersuchungen, um genau zu bestimmen, welchen Anteil thrombozytenständiges TRAP und IL-1 jeweils an der Aktivierung von Endothelzellen haben. IL-1 auf Thrombozyten wurde allerdings immer nur anhand seiner biologischen Aktivität nachgewiesen, überzeugende proteinchemische Daten konnten weder von Hawrylowicz *et al.* noch von einer anderen Gruppe (Sedlmayr *et al.*, 1995) präsentiert werden; dieser Umstand erklärt vielleicht, warum diese Arbeiten allgemein wenig Beachtung fanden.

Es gibt also eine Fülle von Belegen dafür, daß Thrombozyten auch außerhalb der Hämostase wichtige Funktionen erfüllen. Vor dem Hintergrund dieser Literaturdaten bekräftigen unsere Ergebnisse nachdrücklich die Hypothese, daß Thrombozyten inflammatorische Zellen sind.

Die Verletzung eines Blutgefäßes führt zur Aktivierung vieler Zellpopulationen, die alle über diverse Mechanismen in den Entzündungsprozeß eingreifen und teilweise redundante Effekte auslösen. Welchen spezifische Beitrag kann TRAP auf Thrombozyten in dieser komplexen Situation liefern? Ein wesentlicher Punkt ist, daß TRAP präformiert vorliegt und somit innerhalb von Sekunden nach Eintritt der Verletzung exprimiert werden kann. Die aktivierende Wirkung auf Endothelzellen ist sehr hoch, übertroffen wird sie nur durch IL-1 und TNF- $\alpha$ . Diese beiden Zytokine müssen im wesentlichen *de novo* synthetisiert werden, so daß sie erst nach einigen Stunden effektiv wirken können. Durch das Vorhandensein von präformiertem TRAP in Thrombozyten kann jedoch unverzüglich eine vollständige Entzündungsreaktion der Endothelzellen eingeleitet werden.

TRAP wird auch von anderen Zellpopulationen exprimiert, die Endothelzellen über CD40 aktivieren könnten. Die bisherige Literatur hat vor allem T-Zellen in diesem Zusammenhang diskutiert (Yellin *et al.*, 1995a; Stout *et al.*, 1996), da eine Interaktion von T-Zellen und der Endothelschicht *in vivo* eindeutig nachgewiesen ist. Unklar ist jedoch, ob es in dieser Situation auch zu einer Interaktion von TRAP und CD40 kommen kann. Es gibt keine Hinweise darauf, daß im Blutkreislauf zirkulierende T-Zellen TRAP exprimieren, eine TRAP-Expression müßte also durch die Endothelzellen induziert werden. Eine Induktion von TRAP auf T-Zellen erfolgt erst nach Präsentation von spezifischem Antigen, bei geringen Antigenmengen werden zusätzlich noch kostimulatorische Moleküle benötigt. Endothelzellen können jedoch nur in begrenztem Umfang T-Zellen aktivieren (Adams *et al.*, 1992) und kostimulatorische Moleküle konnten bei ihnen nicht nachgewiesen werden (Yellin *et al.*; Murray *et al.*, beide 1995). Karmann *et al.* (1996b) haben eindeutig festgestellt, daß Endothelzellen keine TRAP-Expression auf unstimulierten, allogenen T-Zellen induzieren, sondern nur eine Verstärkung der Expression auf vorstimulierten T-Zellen hervorrufen. Aus diesen Gründen erscheint es zumindest für die frühen Phasen einer Entzündung unwahrscheinlich, daß T-Zellen *in vivo* an der Aktivierung von Endothelzellen über CD40 beteiligt sind.

Eine Entzündung kann auch durch Eosinophile und Mastzellen ausgelöst werden, die gemäß einzelner Berichte ebenfalls TRAP exprimieren (Gauchat *et al.*, 1993 und 1995). Die Induktion von TRAP wurde allerdings nur mit pharmakologischen Substanzen erzielt, unter welchen Bedingungen sie *in vivo* erfolgt, ist vollkommen unklar. Schließlich fand eine einzelne Arbeitsgruppe auch eine TRAP-Expression auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Mach *et al.*, 1997); diese Beobachtung konnte jedoch weder von uns noch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden.

Aus den oben dargelegten Gründen erscheint es als wahrscheinlich, daß *in vivo* vor allem Thrombozyten für die Aktivierung der Endothelzellen über CD40 verantwortlich sind. Somit konnte erstmals bei einer anderen Zellpopulation als T-Zellen eine überzeugende biologische Funktion für TRAP nachgewiesen werden. Dies bedeutet eine Abkehr von der bisher T-Zell-zentrischen Sichtweise des TRAP-Proteins. T-Zellen sind mit Sicherheit die natürlichen Interaktionspartner der CD40-exprimierenden Zellen des Immunsystems, aber für die CD40-exprimierenden Zellen des Gefäßsystems kommt diese Rolle den Thrombozyten zu.

#### **4.4 Funktion von CD40**

Die Funktion von TRAP auf Thrombozyten wurde bisher in der Interaktion mit CD40 auf Endothelzellen bestimmt. Im Verlauf dieser Doktorarbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß CD40 auch auf Thrombozyten nachweisbar ist. Thrombozyten exprimieren also sowohl den Liganden TRAP als auch den Rezeptor CD40 auf ihrer Oberfläche. Da CD40 konstitutiv exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, daß es auch zwischen Thrombozyten zu einer Interaktion von TRAP und CD40 kommt.

Der über CD40 ausgelöste Signalweg vermittelt in der Regel eine Aktivierung von Zellen. Daher wäre es vorstellbar, daß die Expression von TRAP auf aktivierten Thrombozyten eine autokrine Verstärkung der Aggregationsreaktion induziert, so wie es z.B. für ADP und Serotonin beschrieben ist. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, daß CD40 einen signifikanten Einfluß auf den Verlauf der Aggregationsreaktion hat. Zusätzlich konnte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. P. Presek (Gießen) gezeigt werden, daß über CD40 nur geringfügige Änderungen im Phosphorylierungsmuster der Proteine induziert werden können. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse stark darauf hin, daß CD40 keine wesentliche Rolle bei der Aggregation und Sekretion, den zentralen Aktivierungsvorgängen der Thrombozyten, spielt.

Es ist bekannt, daß CD40 die Expression seines Liganden TRAP reguliert. Bei der Interaktion von T-Zellen mit B-Zellen oder Dendritischen Zellen löst die Bindung von CD40 an TRAP eine drastische Verringerung der Oberflächenexpression von TRAP aus (Yellin *et al.*, 1994; Ludewig *et al.*, 1996). Da auch bei Thrombozyten eine deutliche Verringerung der TRAP-Oberflächenexpression innerhalb weniger Stunden nachweisbar ist, wurde auch hier der Einfluß von CD40 untersucht. In der Tat konnte durch eine Blockade der Bindung von CD40 an TRAP eine Stabilisierung der TRAP-Oberflächenexpression sowie eine Verringerung der sTRAP-Freisetzung bewirkt werden. Da sTRAP auf Endothelzellen keine aktivierende Wirkung hat, wird durch die Proteolyse der Membranform die biologische Wirksamkeit von TRAP beendet. Ein bemerkenswerter Unterschied zur T-Zell/B-Zell-Interaktion ist, daß CD40 und TRAP auf der gleichen Zellpopulation exprimiert werden.

CD40 wäre nicht der einzige Rezeptor auf Thrombozyten, der an der Regulation seines Liganden beteiligt ist. Thrombopoetin ist ein essentieller Wachstumsfaktor für Megakaryozyten, dessen Konzentration im Blut die Produktion von Thrombozyten steuert. Eine Bindung von Thrombopoetin an thrombozytenständige Rezeptoren hat nur einen marginalen Einfluß auf die Thrombozytenaktivierung (Toombs *et al.*, 1995), entfernt aber eine substantielle Menge des Wachstumsfaktors aus dem Blutkreislauf (Kuter *et al.*, 1994). Die Thrombozytenneuproduktion durch Megakaryozyten wird dadurch verringert. Die Menge der im Blut zirkulierenden Thrombozyten reguliert auf diese Weise ihre eigene Neuproduktion. Die primäre Funktion von CD40 und dem Thrombopoetin-Rezeptor scheint es also zu sein, die verfügbare Menge und auf diesem Wege die biologische Aktivität der jeweiligen Liganden zu regulieren.

TRAP auf Thrombozyten ist an der Auslösung der Entzündungsreaktion beteiligt, wird dann aber durch das koexprimierte CD40 sehr schnell inaktiviert. Aus welchem Grund wird die schnelle Inaktivierung von TRAP sichergestellt? Es könnte vorteilhaft sein, daß der weitere Verlauf der Entzündungsreaktion vor allem von Leukozyten gesteuert wird, die z.B. im Falle einer Infektion diese spezifisch erkennen und angemessen darauf reagieren können. Gerade diese spezifischen Regulationsmöglichkeiten fehlen den Thrombozyten, ihr sehr unflexibles Aktivierungsschema birgt eher die Gefahr, daß unangemessene Reaktionen eingeleitet werden. Die enge zeitliche Begrenzung der TRAP-Expression auf Thrombozyten könnte

daher dazu beitragen, das Risiko von Gewebeschädigungen durch unregulierte Entzündungsreaktionen zu vermindern.

Die strenge Kontrolle der TRAP-Expression könnte weiterhin mithelfen, eine unspezifische Aktivierung anderer CD40-tragender Zellen zu vermeiden. So sind z.B. in den sogenannten "roten Thromben" auch B-Zellen eingeschlossen, die zwangsläufig in engen Kontakt mit aktivierten Thrombozyten geraten. Eine Stimulation über CD40 regt B-Zellen zur Proliferation an (Banchereau *et al.*, 1991), und TGF- $\beta$ , das gleichzeitig mit TRAP aus den Thrombozytengranula freigesetzt wird, kann vorstimulierte B-Zellen zu einer Immunglobulinsynthese anregen (Defrance *et al.*, 1992). Im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion wird eine Vielzahl von Zytokinen freigesetzt, die wie z.B. IL-6 (Kishimoto *et al.*, 1989) ebenfalls die Antikörperproduktion von vorstimulierten B-Zellen anregen können. Die Spezifität dieser Antikörper wäre dann nicht durch T-Zellen kontrolliert, so daß schädliche Effekte wie Autoimmunreaktionen auftreten könnten. Die frühzeitige Inaktivierung von TRAP kann auch dieser Gefahr vorbeugen.

Eine unregulierte Expression von geringem Mengen TRAP kann auch der Entstehung von Tumoren Vorschub leisten. Man hat bei TRAP-gendefizienten Mäusen versucht, deren Immunkompetenz zu erhöhen, indem man Stammzellen mit den TRAP-Gen transformierte (Brown *et al.*, 1998). Die sich entwickelnden Zellen wiesen eine geringe, aber konstitutive TRAP-Expression aus, die durchaus die Produktion von Antikörpern stimulieren konnte. Als Langzeitfolge stellte sich jedoch ein drastisch erhöhtes Auftreten von Lymphomen ein. Auch wenn diese Versuche im Kontext des Thymus erfolgten und deshalb schwer auf das Gefäßsystem zu übertragen sind, machen sie doch deutlich, daß eine prolongierte und unkontrollierte TRAP-Expression schwerwiegende und schädliche Folgen hat.

Aus den oben aufgeführten Gründen könnte es vorteilhaft sein, die Expression von TRAP auf Thrombozyten durch die Koexpression seines Rezeptors CD40 auf einen kurzen Zeitraum zu begrenzen. Wir vermuten daher, daß *in vivo* die Hauptfunktion von CD40 in der Regulation seines Liganden besteht.