

Nils Christian Gade

Dr. med.

S100A1 in Megakaryocytes

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. Patrick Most

Die vorliegende Arbeit basiert auf den bisher unveröffentlichten Beobachtungen von Prof. Dr. Wolfgang Bergmeier, wonach S100A1-defiziente Mäuse unter einem prothrombotischen Phänotyp mit gesteigerter Thrombozytenaktivierbarkeit leiden. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Selektivität der proaggregatorischen Plättchenfunktion, die sich nur nach Stimulation durch Agonisten des GPVI-Signalweges manifestiert. Als morphologisches Korrelat wurde eine ~1,6-fache Erhöhung der GPVI-Oberflächenexpression auf S100A1-defizienten Plättchen beschrieben. Dies ist der erste Hinweis, dass das Kalzium-abhängige Regulatorprotein S100A1, dessen Funktion bisher in der Regulation der kardialen Kontraktion, des Kalziumzyklus und der Energiehomöostase sowie der endothelialen Stickstoffmonoxid Produktion nachgewiesen wurde, einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion haben könnte.

Ein relevanter Anteil der Thrombozyteneigenschaften wird bereits in den Megakaryozyten festgelegt. Megakaryozyten konnten als CD41/CD42d-positive Population in der Durchflusszytometrie identifiziert und anhand der CD42d-Oberflächenexpression in Reifestufen unterteilt werden. Diese Einteilung wurde durch die Analyse der intrazellulären DNA-Menge bestätigt. Die Abwesenheit von S100A1 führt weder zu relevanten Veränderungen im grundsätzlichen Ablauf der Megakaryozytenreifung noch der Thrombozytenproduktion. Dies zeigt sich nicht nur an der physiologischen Thrombozytenkonzentration im Blut der Mäuse, auch die Proteinzusammensetzung der Thrombozyten ist größtenteils unverändert. Korrespondierend zu der erhöhten GPVI-Oberflächenexpression der S100A1-defizienten Thrombozyten zeigte sich eine im Schnitt ~1,5-fache Überexpression von GPVI auf der Oberfläche der Megakaryozyten. Diese GPVI-Überexpression zog sich dabei durch alle Reifestufen der Megakaryopoese und deutet damit auf einen Ursprung des Phänotyps in frühen Megakaryozyten und die daraus resultierende Weitergabe der proaggregatorischen Eigenschaften an die zirkulierenden Thrombozyten hin. Um einen direkten Zusammenhang zwischen S100A1 in Megakaryozyten und der GPVI-Oberflächenexpression in diesen Zellen herzustellen, wurde der Effekt einer isolierten in vitro Suppression von S100A1 untersucht. Die S100a1-Suppression wurde auf RNA-Level durch Adenovirus-mediierte shRNA gegen S100a1 erreicht. Die vollständige Suppression von S100a1-RNA resultierte in diesem Experiment in einer 1,87-fachen Erhöhung der GPVI-Oberflächenexpression im Vergleich zu der gepaarten Kontrollgruppe. Das Ergebnis des in vitro Suppressionsexperiments beweist einen kausalen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Anwesenheit von S100A1 und der Oberflächenexpression von GPVI. Die Regulation der GPVI-Oberflächenexpression kann grundsätzlich auf diversen Ebenen erfolgen. Eine Transkriptomanalyse aus FACS-sortierten Megakaryozyten mittels Sequenzierung detektierte identische GP6-mRNA-Konzentrationen in Megakaryozyten, unabhängig von der S100A1-Expression. Übereinstimmend damit

fanden sich auch in dem in vitro Suppressionsexperiment keine Unterschiede in der GP6-Expression bei gleichzeitiger Erhöhung der GPVI-Oberflächenexpression. Diese Ergebnisse schließen einen transkriptionellen Mechanismus der Regulation als Ursache des Phänotyps aus. Die daraufhin folgende Untersuchung der GPVI-Proteinexpression in Thrombozyten mittels massenspektrometrischer Proteomanalyse und Western Blot zeigte keinen Unterschied in der gesamt GPVI-Expression abhängig von S100A1. Diese Beobachtung steht in scheinbarem Widerspruch zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie, erklärt sich allerdings durch die Tatsache, dass die Durchflusszytometrie selektiv die Proteinexpression auf der Zelloberfläche detektiert und damit im Gegensatz zu Western Blot und Proteomanalyse keine Aussage über den Gesamtproteingehalt der Zelle liefert. Die beobachtete Überexpression von GPVI auf der Oberfläche von S100A1-defizienten Plättchen bei gleichzeitig unveränderter Gesamtproteinexpression deutet auf eine Veränderung des Proteintransports und der Proteinverteilung innerhalb der Zelle hin. Eine veränderte Degradation von GPVI durch Abspaltung der Ektodomäne konnte von Prof. Dr. Bergmeier experimentell ausgeschlossen werden. Die Hypothese des veränderten GPVI-Transportes wird durch Daten des S100A1-Interaktionspartner-Screenings gestützt. Hier fanden sich als mögliche, indirekte Interaktionspartner nicht nur der gesamte GPVI-Signalweg, sondern auch VAPA/VAPB und weitere Vertreter der funktionalen Cluster „Membran Transport“ und „Transmembran Rezeptor Regulation“. VAPA/VAPB gehören darüber hinaus zu den am stärksten differentiell regulierten Proteine in der Proteomanalyse.

Neben der Regulation der GPVI-Oberflächenexpression gibt es weitere Ebenen, auf denen selektiv die Aktivität des GPVI-Signalweges modelliert werden kann. Da Veränderungen auf Ebene des Kalziumsignals alle proaggregatorischen Signalwege beeinflussen, kann es sich nur um Veränderungen zwischen GPVI und der Phospholipase C-Gamma-2, also hauptsächlich in der Tyrosinkinase Kaskade handeln. Die RNA- und Proteinexpression dieser Signalkaskade wird durch die Abwesenheit von S100A1 nicht beeinflusst. Auffällig ist allerdings die reduzierte Expression des GPVI-Signalweg-Inhibitors PDLIM1 in S100A1-defizienten Megakaryozyten und Plättchen. PDLIM1 ist eines der am stärksten differentiell regulierten Proteine in der Proteomanalyse. Das Fehlen von S100A1 resultierte in einer reduzierten Expression von PDLIM1 und damit einer Enthemmung des GPVI-Signalweges. Der Mechanismus, über den PDLIM1 den GPVI-Signalweg inhibiert, ist bisher nicht beschrieben, PDLIM1 wirkt allerdings unabhängig von der GPVI-Oberflächenexpression.

Zusammenfassend ist der prothrombotische Phänotyp der S100A1-defizienten Mäuse, zumindest teilweise, auf Veränderungen der Plättchenfunktion zurückzuführen. Die Abwesenheit von S100A1 führt zu einer selektiven Steigerung der Plättchenaktivierbarkeit durch Stimulation des GPVI-Signalweges. Mechanistisch liegen dieser gesteigerten Aktivierbarkeit einerseits eine posttranslationalen Oberflächenüberexpression von GPVI, möglicherweise auf der Basis einer Veränderung des GPVI-Transports und der Integration in die Zellmembran, sowie eine verminderte Expression des GPVI-Signalweg-Inhibitors PDLIM1 mit konsekutiver Enthemmung der Tyrosinkinase-Kaskade des GPVI-Signalweges zugrunde.