



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Bedeutung der CLEC-2/ Podoplanin- Interaktion für die
Thrombozytenfunktion**

Autor: Foteini Christodoulou
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. P. Bugert

Hintergrund: C-type lectin like receptor 2 (CLEC-2) ist ein Adhäsionsrezeptor, der im Bluthauptbereich von Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert wird. Podoplanin (PDPN) ist ein Glykoprotein, welches von bestimmten Tumorzellen aber auch von einer Reihe von normalen Zellen exprimiert wird, wie zum Beispiel fibroblastischen retikulären Zellen, Lymphknoten, Nierenpodozyten und lymphatischen Endothelzellen aber nicht von vaskulären Endothelzellen. Eine Interaktion zwischen CLEC-2/Podoplanin findet unter normalen Umständen nicht statt, ist jedoch während der Entwicklung und unter pathologischen Umständen beschrieben worden. In der Embryonalentwicklung spielt die Interaktion zwischen CLEC-2 und Podoplanin eine Rolle in der Abtrennung der Blut- und der lymphatischen Gefäße. Im erwachsenen Stadium hält sie die Integrität von Hochendothelvenolen aufrecht. Eine Reihe von Tierexperimenten zeigte, dass CLEC-2 die hämatogene Metastasierung und die tumorassoziierte Thrombusbildung von Podoplanin-exprimierenden Tumoren fördert. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass es eine Erhöhung der löslichen CLEC-2 (sCLEC-2) im Plasma bei Patienten nach akutem ischämischen Schlaganfall oder akuter koronarer Herzkrankung gibt. Deshalb wurde spekuliert, ob die lösliche sCLEC-2 Form einen Plasmabiomarker für die Thrombozytenaktivierung bildet. Ziel des Projekts war die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen dieser Interaktion sowie der Rolle der Interaktion für die Thrombozytenfunktion. Methoden: Zur Gewinnung von Thrombozyten bzw. Platelet reichem Plasma (PRP) wurden gesunde Freiwillige Probanden, die in den letzten 10-14 Tagen keine Thrombozytenfunktion beeinflussende Medikation einnahmen, Blut in 10ml Citratmonovetten oder in 10ml EDTA-Monovetten (je nach Messungsprotokoll) abgenommen. Um die Thrombozytenaggregation nach Stimulation durch Podoplanin zu messen, wurde Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) durchgeführt. Die oberflächliche CLEC-2 Expression auf die Thrombozyten wurde bei PRP Proben mittels Durchflusszytometrie gemessen, ohne oder nach Zugabe von Thrombozytenagonisten (ADP oder PDPN). Die gleichen Proben wurden verwendet, um die lösliche CLEC-2 Form mittels ELISA zu messen. Western Blot wurde durchgeführt, um die CLEC-2 Konzentration in Thrombozytenlysaten vor und nach Aktivierung zu quantifizieren und eine potentielle Degradierung des Proteins nach Thrombozyten-Aktivierung zu untersuchen. Die Quantifizierung von CLEC-2 erfolgte in Relation zum Referenzprotein β -Aktin.

Ergebnisse: Die Stimulation von PRP durch diverse Konzentrationen oder Inkubationszeiten von PDPN führte zu keiner Thrombozytenaggregation. Wir fanden nachweisbare Mengen an CLEC-2 auf die Thrombozytenoberfläche und an lösliche CLEC-2 Form in Plasma bei inaktivierten Thrombozyten. Interessanterweise führte die Thrombozytenaktivierung durch ADP oder PDPN zu einer signifikanten Abnahme der oberflächlichen CLEC-2 Expression auf die Thrombozyten (Faktor 2.3 bis 2.9) ($p < 0.0001$) sowie zu einer signifikanten Abnahme der löslichen CLEC-2 (sCLEC-2) in Plasma der gleichen Proben (Faktor 1.7) ($p < 0.001$). Des Weiteren ergab die Untersuchung von Thrombozytenlysaten mittels Western Blot keinen signifikanten Unterschied in der CLEC-2 Proteinmenge vor und nach in vitro Aktivierung. Schlussfolgerung: Die Thrombozytenaktivierung durch klassische Agonisten wie ADP und auch durch Podoplanin führte zur signifikanten Abnahme der oberflächlichen CLEC-2 Expression auf die Thrombozyten. Allerdings „Shedding“ von CLEC-2 nach Aktivierung kann eher ausgeschlossen werden, da ähnlich zur Oberflächenexpression führte die Thrombozytenaktivierung auch zu einer Abnahme der sCLEC-2 Konzentration im Plasma. Stattdessen könnte die Thrombozytenaktivierung eine Internalisierung und/oder eine Degradation von CLEC-2 auslösen. Weitere Erkenntnisse zu diesen Hypothesen konnten in der vorliegenden Arbeit durch Western-Blot Analysen gewonnen werden. Die Untersuchung von Thrombozytenlysaten ergab keinen signifikanten Unterschied in der CLEC-2 Proteinmenge vor und nach in vitro Aktivierung. Damit ist eine Internalisierung von CLEC-2 naheliegend, während die Degradation eher unwahrscheinlich ist.