

IV Summary

The vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP and the stromal interaction molecule STIM1 are regarded as being amongst the key players functioning in the processes upon platelet activation. Thereby, VASP, due to its actin filament-remodelling activity, is closely related to platelet adhesion and shape change. The Ca^{2+} -sensing molecule STIM1, on the other hand, has been linked to CRAC entry in the course of platelet Ca^{2+} -signaling, which consequently results in enhanced granular secretion, recruitment of further platelets and subsequent aggregation at the site of vessel injury. To further understand the precise mechanisms regulating the specific effects of these two components, we here addressed both the VASP- and STIM1 interactome in resting platelets by applying a differential pull down-based proteomics strategy. In detail, His₆-tagged DNA-vector constructs of (a) phospho-mimetic mutants of human VASP; and (b) of the cytosolic part of human STIM1 were heterologously expressed and IMAC purified. The resulting fusion proteins were intended for subsequent immobilization on Affi-Gel 10 resin to generate VASP- and STIM1-specific affinity supports. These affinity columns should consequently serve for specific interactome screenings on native lysates of resting human platelets.

Following this strategy, however, synthesis and isolation of the intended VASP fusion proteins turned out to be challenging: Initially, prokaryotic translation in *E.coli* was partially inhibited, most probably as a consequence of the codon bias problem inherent to prokaryotic vs eukaryotic protein expression. This issue was finally addressed by changing to an alternate, eukaryotic expression system (i.e. stably transfected HEK293 cells). Nevertheless, the resulting protein yields were still too low to enable sufficient subsequent enrichment. In this context, the applied IMAC approach may have also been further limited by partial inaccessibility of the targeted C-terminal His₆- tags, presumably caused by structural folding of the C-termini of the designed protein constructs. The generated stable cell lines may hence be well suitable to address the phospho-specific VASP interactome in the HEK293 model system (e.g. in Co-IP-based approaches); however, they were not adequate in the context of a platelet-related study as intended here. Therefore, this part of our analysis was finally rejected.

In contrast, when applying the same strategy to unravel the STIM1-specific interactome of resting platelets, a total of 87 non-redundant, platelet-related proteins were detected successfully. These components were classified in four functional complexes: (a) the actin-myosin complex; (b) the adhesion complex, including the (c) GPIb-IX-V subcomplex; and (d) the signaling-related complex. Of these, one of the most promising candidates - i.e. PDLIM family member CLP36, which was related to three of the four functional complexes - was chosen for a more detailed analysis (*in vitro* and *in vivo*). Deriving from these studies, α -actinin-bound CLP36 seems to stabilize STIM1 anchoring to the F-actin cytoskeleton, hence preventing uncontrolled STIM1-mediated CRAC entry and consequent intravascular platelet activation and aggregation. There is furthermore evidence that, upon platelet induction, this interaction is finally reversed by limited proteolysis via the Ca^{2+} -dependent endoprotease calpain. Since CLP36 was also found to act as a negative regulator of GPVI-ITAM signaling, as indicated by functional platelet characterization in $\text{Clp36}^{\Delta\text{LIM}}$ mice, this cytoskeleton adaptor protein presumably plays multiple roles in the context of platelet inhibition. Further research on this protein candidate may thus help to improve our knowledge of intravascular thrombus formation and of the pathological mechanisms contributing to manifestation of acute ischemic diseases.

V Zusammenfassung

Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein VASP und das Stromal-Interaktionsmolekül STIM1 zählen zu den zentralen Komponenten, die an den im Verlauf der Thrombozytenaktivierung auftretenden Prozessen beteiligt sind. Aufgrund seiner Aktinfilament-remodellierenden Aktivität wird VASP hierbei in engen Zusammenhang mit der Adhäsion und Gestaltänderung aktivierter Thrombozyten gebracht. Der Ca^{2+} -Sensor STIM1 hingegen ist in den, über CRAC-Kanäle medierten, Ca^{2+} -Flux im Zuge des thrombozytären Ca^{2+} -Signalings eingebunden, was letztlich zur verstärkten granulären Sekretion, der Rekrutierung weiterer Thrombozyten und schließlich zur Aggregation im Bereich der Gefäßläsion führt. Um tieferen Einblick in die hinter diesen jeweilig spezifischen Funktionen stehenden regulatorischen Mechanismen zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine Analyse des VASP- und des STIM1-Interaktoms in ruhenden Thrombozyten vorgenommen. Dies geschah unter Anwendung eines Pulldown-basierten, differentiellen proteomischen Ansatzes. So wurden His₆-getaggte DNA-Vektorstrukture von (a) phospho-mimetischen humanen VASP-Mutanten; und (b) der zytosolischen Domänen von humanem STIM1 heterolog exprimiert und mittels IMAC aufgereinigt. Die so gewonnenen Fusionsproteine sollten anschließend, nach Immobilisierung an einer Affi-Gel 10 Matrix zur Generierung von VASP- bzw. STIM1-spezifischen Affinitätsmatrices, für spezifische Interaktomsscreenings in nativen Lysaten ruhender humaner Thrombozyten genutzt werden.

Im Zuge dieser Vorgehensweise erwies sich die Synthese und Aufreinigung der VASP Fusionsproteine allerdings als schwierig: So ließ sich zunächst nur eine schwache Translation in *E.coli* feststellen, was vermutlich auf die bei prokaryotischer Expression von eukaryotischem Genmaterial häufig auftretende 'Codon Bias-Problematik' zurückzuführen war. Durch den Wechsel in ein eukaryotisches Expressionssystem (stabil transfizierte HEK293 Zellen) konnten diese Limitierungen schließlich umgangen werden. Die Expressionslevel der synthetisierten VASP Fusionsproteine fielen allerdings auch hier letztlich viel zu gering aus, um anschließend eine ausreichend hohe Anreicherung zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang muss auch vermutet werden, dass die IMAC-Aufreinigung der Proteinkonstrukte eventuell durch partielle strukturelle Unzugänglichkeit der

C-terminalen His₆-Affinitätstags als Folge C-terminaler Proteinfaltungen zusätzlich beeinträchtigt worden sein könnte. Die generierten stabilen Zelllinien mögen somit zwar durchaus dafür geeignet sein, eine phospho-spezifische VASP Interaktionsstudie im HEK293 Modellsystem vorzunehmen (z.B. über einen Co-IP-basierten Ansatz). Für die hier beabsichtigte Untersuchung humaner Thrombozyten erwiesen sie sich jedoch letztlich als unzulänglich. Aus diesem Grund muss dieser Teil der vorliegenden Studie vorerst als gescheitert angesehen werden. Im Falle der Analyse des thrombozytären Interaktoms von humanem STIM1 konnten hingegen mittels der beschriebenen Strategie insgesamt 87 nicht-redundante thrombozytäre Proteine erfolgreich detektiert werden. Diese Komponenten waren vier funktionellen Komplexen zuzuordnen: (a) dem Aktin-Myosin Komplex; (b) dem Adhäsionskomplex, einschließlich des (c) GPIb-IX-V Subkomplexes; und (d) dem Signaling-assoziierten Komplex. Einer der in diesem Zusammenhang vielversprechendsten Kandidaten - das zur PDLIM Familie gehörende Protein CLP36, welches funktionelle Assoziation zu drei der vier angesprochenen Komplexe zeigt - wurde schließlich einer detaillierteren Analyse (*in vitro* und *in vivo*) unterzogen. Auf Basis dieser Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass α -Aktinin-gebundenes CLP36 vermutlich die Verankerung von STIM1 am F-Aktin Zytoskelett stabilisiert, und somit unkontrolliertem STIM1/ CRAC-vermitteltem Ca²⁺-Einstrom und der damit einhergehenden intravaskulären Thrombozytenaktivierung und -aggregation entgegenwirkt. Desweiteren bestehen Hinweise darauf, dass diese Interaktion in aktivierten Thrombozyten durch limitierte Proteolyse, vermittelt durch die Ca²⁺-abhängige Endoprotease Calpain, aufgehoben wird. Da CLP36 außerdem als Negativregulator im Zuge des GPVI-ITAM Signalings zu fungieren scheint - was hier anhand thrombozytärer Funktionsanalysen in Clp36 ^{Δ LIM} Mäusen belegt werden konnte - kommt diesem zytoskelettalen Adapterprotein vermutlich eine umfassendere Rolle im Kontext der Thrombozyteninhibierung zu. Weitere eingehendere Untersuchung dieses Kandidaten kann somit möglicherweise dazu beitragen, unser Wissen bezüglich der intravaskulären Thrombusbildung, sowie der pathologischen Mechanismen, die letztlich zur Ausbildung akuter ischämischer Erkrankungen führen, zu erweitern.