

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt Kardiologie und Angiologie)

**Die Bedeutung des Kollagenrezeptors GPVI auf die Hämin-
induzierte Aktivierung von Thrombozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Fink, Annalena

2025

Dekan: Professor Dr. B. Pilcher

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Philipp

3. Berichterstatter: Professor Dr. D. Buckert

Tag der Disputation: 10.04.2025

*In Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern und Großeltern*

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Thrombozyten.....	2
1.1.1 Thrombozytenentstehung.....	2
1.1.2 Thrombozytenmorphologie und -struktur.....	3
1.1.3 Thrombozytenanzahl.....	6
1.1.4 Thrombozytenfunktion.....	7
1.1.5 Thrombozytenlebensdauer.....	10
1.2 Relevante Membranglykoproteine der Thromozyten	10
1.2.1 Glykoprotein VI (GPVI).....	11
1.2.2 CLEC-2	17
1.2.3 P-Selektin	17
1.2.4 GPIb	18
1.2.5 GPIIb/IIIa	19
1.3 Hämolyse	19
1.3.1 Hämin.....	24
1.3.2 Hämin in Thrombozyten	24
1.4 Furin	26
1.4.1 Furin als Protease	26
1.4.2 Furin in Thrombozyten	28
1.5 Zielsetzung der Dissertation	29
2 Material und Methoden.....	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Chemikalien und Lösungen.....	32
2.1.3 Lösungen	34
2.1.4 Gebrauchsgüter.....	36
2.1.5 Antikörper	37
2.1.6 Software	40
2.2 Methoden	40
2.2.1 Isolation von Thrombozyten	41
2.2.2 Herstellung von Thrombozytenlysaten	41
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	42
2.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	42
2.2.5 Proteinnachweis durch Immunoblot-Analyse	44

2.2.6	Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten.....	45
2.2.7	<i>In vitro</i> Thrombusformation (Flusskammer).....	46
2.2.8	Lichttransmissionsaggregometrie.....	47
2.2.9	Statistik.....	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung, Aggregation und <i>in vitro</i> Thrombusformation vom ITAM-Signalweg abwärts von GPVI und CLEC-2.....	49
3.1.1	Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	49
3.1.2	Hämin-induzierte Thrombozytenaggregation.....	50
3.1.3	Hämin-induzierte <i>in vitro</i> Thrombusformation.....	52
3.1.4	Hämin-induzierte Änderung des Phosphorylierungsgrades von Syk und PLC γ 2.....	53
3.1.5	Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombozytenaggregation von Syk und Src.....	54
3.1.6	Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombusformation <i>in vitro</i> von Src.....	56
3.2	Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI.....	57
3.2.1	Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Oberflächenexpression von P-Selektin, GPIb und GPVI.....	57
3.2.2	Konzentrationsunabhängigkeit der Oberflächenexpression von CLEC-2 von Hämin.....	60
3.2.3	Unabhängigkeit der Oberflächenexpression von GPVI von den CLEC-2-Agonisten Fucoidan und Katakine.....	61
3.2.4	Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI.....	62
3.3	Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren.....	63
3.3.1	Unabhängigkeit der Hämin-induzierten Spaltung von GPVI von Syk und Src.....	66
3.4	Furin-Abhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI.....	67
3.4.1	Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Furin-Oberflächenexpression.....	67
3.4.2	Beeinflussung der Hämin-induzierten Veränderung der GPVI-Oberflächenexpression durch Furin.....	68
3.4.3	Beeinflussung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin.....	73
3.4.4	Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von der CKII.....	75
3.4.5	Vermittlung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin unabhängig von Syk und PLC γ 2.....	77
3.5	Modulation der Thrombozytenfunktion durch Furininhibition.....	78
3.5.1	Beeinflussung der Hämin-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Hämin.....	78

3.5.2	Furin beeinflusst die Hämin-induzierte <i>in vitro</i> Thrombusformation	79
3.6	Hämin-induzierte Produktion von ROS und Phosphatidylserin- Oberflächenexpression und Modulation der ROS Produktion durch Furin bei niedriger Hämin-Konzentration	80
4	Diskussion	83
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	83
4.2	Diskussion der Methoden.....	83
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	87
4	Zusammenfassung	101
5	Literaturverzeichnis	102
6	Erklärung zum Eigenanteil	117
7	Veröffentlichung	119
8	Danksagungen	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Thrombozytenmorphologie.....	6
Abbildung 2:	Kollagenrezeptor GPVI.....	12
Abbildung 3:	Signalkaskade bei Ligandenbindung an GPVI.....	14
Abbildung 4:	Struktur Hämoglobin.....	22
Abbildung 5:	Strukturformel Hämin und Häm.....	24
Abbildung 6:	Furin Cycling Loops.....	28
Abbildung 7:	Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung.....	50
Abbildung 8:	Hämin-induzierte Aggregation von Thrombozyten.....	51
Abbildung 9:	Hämin-induzierte Thrombusformation in vitro.....	52
Abbildung 10:	Hämin-induzierte Änderung des Phosphorylierungsgrads von Syk und PLCy2.....	53
Abbildung 11:	Beeinflussung der Hämin-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Syk und Src.....	55
Abbildung 12:	Beeinflussung der Hämin-induzierten Thrombusformation durch Src in vitro.....	57
Abbildung 13:	Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Oberflächenexpression von P-Selektin, GPIb und GPVI.....	59
Abbildung 14:	Konzentrationsunabhängigkeit der Oberflächenexpression von CLEC-2 von Hämin.....	60
Abbildung 15:	Unabhängigkeit der Oberflächenexpression von GPVI von den CLEC-2-Agonisten Fucoidan und Katacine.....	61
Abbildung 16:	Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI.....	62
Abbildung 17:	Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren.....	64
Abbildung 18:	Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Abnahme der P-Selektion-Oberflächenexpression von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren.....	65
Abbildung 19:	Unabhängigkeit der Hämin-induzierten Spaltung von GPVI von Syk und Src.....	66
Abbildung 20:	Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Furin-Oberflächenexpression.....	67
Abbildung 21:	Beeinflussung der Hämin-induzierten Veränderung der GPVI-Oberflächenexpression durch Furin.....	70
Abbildung 22:	Konzentrationsreihe zur Ermittlung der SSM3-Konzentration.....	71
Abbildung 23:	Effekt von SSM3 auf die GPIb Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämin.....	72
Abbildung 24:	Beeinflussung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin.....	73
Abbildung 25:	Induktion von Ektodomänen-Shedding von GPVI durch rekombinantes humanes Furin.....	74
Abbildung 26:	Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von der CKII.....	76
Abbildung 27:	Fehlender Einfluss von Furin auf die Hämin-induzierte Phosphorylierung von Syk und PLCy2.....	77
Abbildung 28:	Beeinflussung der Hämin-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Hämin.....	79
Abbildung 29:	Beeinflussung der Hämin-induzierten Thrombusformation in vitro durch Furin.....	80
Abbildung 30:	Hämin-induzierte Produktion von ROS und Phosphatidylserin-Oberflächenexpression und Modulation dieser durch Furin.....	82

Abbildung 31:	Schematische Zeichnung der postulierten Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung durch den ITAM-Signalweg abwärts von CLEC-2 und GPVI	88
Abbildung 32:	Mögliche Furin Schnittstellen in GPVI.....	91
Abbildung 33:	Schematische Darstellung der Hämin-induzierten ITAM-abhängigen Aktivierung der Thrombozyten und der ITAM-unabhängigen, aber Furin-abhängigen, GPVI-Spaltung.....	95
Abbildung 34:	Schematische Darstellung der Furin-vermittelten Hämin-induzierten Spaltung der Ektodomäne	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Ultrastruktur der Thrombozyten	4
Tabelle 2:	Übersicht ausgewählter thrombozytärer Membranglykoproteine	11
Tabelle 3:	Beschriebene Proteasen, welche GPVI spalten.....	16
Tabelle 4:	Erhöhte Plasmawerte von sGPVI in ausgewählten Krankheitsbildern.....	16
Tabelle 5:	Einteilung Hämolytische Anämien	21
Tabelle 6:	Effekte von Häm/Hämin auf verschiedene Wirkorte.....	23
Tabelle 7:	In der Literatur beschriebene Hämineffekte in Thrombozyten.....	25
Tabelle 8:	Furin Schnittstellen	27
Tabelle 9:	Verwendete Geräte und deren Hersteller	30
Tabelle 10:	Verwendete Chemikalien und Lösungen und deren Hersteller	32
Tabelle 11:	Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung.....	34
Tabelle 12:	Gebrauchsgüter und deren Hersteller.....	36
Tabelle 13:	Verwendete Primäre Antikörper und deren Hersteller.....	37
Tabelle 14:	Verwendete Sekundäre Antikörper und deren Hersteller	40
Tabelle 15:	Verwendete Software und deren Hersteller	40
Tabelle 16:	Zusammensetzung 2x Sammelgel 5 %	43
Tabelle 17:	Zusammensetzung 2x Trenngel 8 %	43

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AC	<i>acid cluster</i>
ACD-Puffer	<i>acid citrate dextrose-Puffer</i>
ADAM10	<i>a disintegrin and metalloproteinase 10</i>
ADAM17	<i>a disintegrin and metalloproteinase 17</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , einfaktorielle Varianzanalyse
APS	Aktivierter Thrombozytenüberstand (<i>activated platelet supernatant</i>)
APS 10 %	<i>ammonium persulphate solution 10 %</i>
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca²⁺	Kalziumionen
CaCl₂	Kalziumchlorid

cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphat</i>)
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
CCP	<i>clathrin-coated pits</i>
CD62P	P-Selektin
CKII	Caseinkinase II
Cl⁻	Chloridion
CLEC-2	<i>C-type-lectin-like</i> Rezeptor 2
COX-1	Cyclooxygenase-1
CRP-XL	<i>collagen related peptide</i>
D1, D2	Immunglobulin-ähnliche Domänen 1 und 2
DAG	1,2-Diacylglycerol
DCF DA	2',7'-Dichlorfluoreszein-Diacetat
DIC	Disseminierte intravaskuläre Koagulopathie (DIC)
DiOC₆	<i>3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide</i>
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonucleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTS	Dichtes tubuläres System (<i>dense tubular system</i>)
EC50	Mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-like motif	<i>epidermal growth factor like motif</i>
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Faktor X	Steart-Prower-Faktor
FcRγ	<i>fragment crystallizable receptor gamma</i>
Fe²⁺	Zweiwertiges Eisen
Fe³⁺	Dreiwertiges Eisen
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
fl	Femtoliter
GP	Glykoprotein
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIb-V-IX	Glykoprotein Ib-V-IX
GPIIb-IIIa	Glykoprotein IIbIIIa
GPIX	Glykoprotein IX
GPV	Glykoprotein V
GPVI	Glykoprotein VI
GSH	Gluthation
H₂O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
IP₃	Isitol-1,4,5-triphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JAQ1	GPVI-Antikörper JAQ1

KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
L	Leuzin
Lämmli	Ladepuffer mit β -Mercaptoethanol
LAT	<i>activation of T-cells</i>
Lys	Lysin
M	Molar
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
Mg²⁺	Magnesium
MgCl₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Metalloproteinase
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (<i>mean platelet volume</i>)
mRNA	<i>messenger ribonucleotid acid</i>
MVB	Multivesikuläre Körperchen, Endosomen (<i>multivesicular bodies</i>)
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NE	Neutrophile Elastase
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickoxid
ns	nicht signifikant
p	Wahrscheinlichkeit
PACS-1	<i>phosphofurin acidic cluster sorting protein 1</i>
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor
PBS	<i>Dubeccos Phosphate Buffered Saline</i>
PBS+Ca²⁺	<i>Dubeccos Phosphate Buffered Saline with Ca²⁺</i>
PF4	Plättchenfaktor 4
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PIP3	Phosphotinositide 3,4,5-Triphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C- <i>beta</i>
PLCγ2	Phospholipase C <i>gamma</i> 2
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
PP2A	Phosphatase A2

PPP	<i>platelet poor plasma</i>
PRP	<i>platelet rich plasma</i>
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
rhFurin	Rekombinantes humanes Furin
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.D.	Standartabweichung
SCD	Sickelzellanämie (<i>sickle cell disease</i>)
sCLEC-2	lösliches CLEC-2 (<i>soluble CLEC-2</i>)
SCR	<i>short consensus repeats</i>
SCS	Offenes kanalikuläres System (<i>surface connected open canalicular system</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFK	<i>Src family kinase</i>
sGPVI	Lösliches GPVI (<i>soluble GPVI</i>)
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SLP-76	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
sP-Selektin	Lösliches P-Selektin (<i>soluble P-Selektin</i>)
Src	Tyrosinkinase Src (Sarcoma)
Syk	<i>Spleen-Tyrosine-Kinase</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ1	<i>transforming growth factor β1</i>
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TLR4	<i>toll-like-receptor 4</i>
TMRE	Tetramethylrhodamin Ethylester
TTBS	<i>Tris-Tween-Buffered-Solution</i>
TXA2	Thromboxan A2
U	<i>units</i>
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	Von-Willebrand-Faktor
W	Tryptophan
W	Watt
W7	Calmodulininhibitor W7
X	Unbekannt
xg	Relative Zentrifugalkraft als Vielfaches der Erdbeschleunigung
Y	Tyrosin
α	<i>alpha</i>
α-	anti-
β	<i>beta</i>

β-NGF	<i>beta-nerve growth factor</i>
γ	<i>gamma</i>
δ	<i>delta</i>
*	p<0,05
**	p<0,01
***	p<0,001
****	p<0,0001
°C	Grad Celcius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

1 Einleitung

Das Blut bildet als funktionell bedeutsames Organ die Verbindung sämtlicher Organe innerhalb des Organismus [166]. Ausgehend von dieser Körperflüssigkeit, ergeben sich viele epidemiologisch relevante Erkrankungen: neben verschiedenen Typen der Anämie haben hämatologische Neoplasien ihren Ursprung in den Blutzellen [148, 247]. Zusätzlich betreffen sowohl genetisch bedingte Erkrankungen des Bluts, wie die Thalassämie und die Sichelzellanämie (SCD), als auch infektiöse Blutkrankheiten, wie die Malaria, eine Vielzahl an Menschen [133, 247]. Ein Ungleichgewicht in der Blutzusammensetzung sowie funktionelle Störungen des Bluts führen auch zu Gerinnungsstörungen, deren Folgen Thrombosen oder Embolien sein können [148, 204, 247].

Hämolytische Erkrankungen und deren Folgen finden ihren Ursprung ebenfalls in der Dysfunktion der Blutzellen und -bestandteile [42, 106, 231]. Ausgehend von den Erythrozyten selbst oder deren Umgebung wird bei der Hämolyse die Integrität der Zellmembran der roten Blutkörperchen beschädigt und in der Folge intrazelluläre Komponenten, wie das Hämoglobin, freigesetzt [42, 106, 231]. Bekannte Komplikationen bei hämolytischen Erkrankungen, wie der SCD und der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH), sind prothrombotische Zustände, welche vermehrt Stillstände in der Mikrozirkulation und Organversagen verursachen können [15, 16, 274].

In dem Jahr 2018 konnten Wissenschaftler erstmalig zeigen, dass das Hämolyseabbauprodukt Hämin die humane Thrombozytenaktivierung und den -zelltod via Ferroptose induziert [176]. Weiterhin wurde im Februar 2021 berichtet, dass Hämin ein endogener Agonist für den *C-type-lectin-like* Rezeptor 2 (CLEC-2) ist, woraufhin nur zwei Monate später beschrieben wurde, dass es sich zusätzlich zu CLEC-2 auch beim Glykoprotein VI (GPVI) um einen thrombozytären Häminrezeptor handelt [38, 176, 184].

Die Beschreibung der erhöhten Thrombozytenaktivität durch vermehrt freies Hämin/Häm, welche bei der Hämolyse auftritt, und zu weitergehenden Komplikationen führt, deutet auf den Bedarf der weiteren Forschung im Bereich der Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung hin [38, 176, 184].

1.1 Thrombozyten

Der Begriff „Thrombozyt“ entstammt dem griechischen („*thrómbos*“ für Klumpen und „*kýtos*“ für Höhlung) und beschreibt das Blutplättchen. Die Thrombozyten sind neben den Leukozyten und den Erythrozyten ein zellulärer Bestandteil des Bluts [93, 120, 199, 251, 253]. Zusätzlich zu ihrer zentralen Rolle in der Blutgerinnung, der Hämostase, sind die Thrombozyten auch in weiteren Gebieten wie der Entwicklung, Inflammation und Immunität sowie der Angiogenese beteiligt [93, 120, 199, 251, 253].

1.1.1 Thrombozytenentstehung

Thrombozyten sind kernlose, diskoide Abkömmlinge ihrer Vorläuferzellen, der Megakaryozyten, somit geht der Thrombozytenentstehung (Thrombopoese) die Megakaryozytenentstehung (Megakaryopoese) voran [87]. Die Megakaryopoese findet im Knochenmark statt und beschreibt den Prozess, bei dem aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen zunächst myeloide Vorläuferzellen entstehen, welche dann über weitere Zwischenschritte zu Megakaryozyten heranreifen [187, 216, 243]. Im Rahmen der Megakaryopoese erfolgt eine Vervielfachung des Chromosomensatzes, der Megakaryozyt wird durch Endomitose (Deoxyribonukleinsäure (DNA) Replikation ohne Zellteilung) polyploid [150]. Außerdem kommt es zu einer Proliferation des Zytoplasmas durch Zunahme der zytoskelettalen Proteine und dem Ausbau des Membransystems [150]. Während der Reifung werden die Megakaryozyten somit größer, besitzen thrombozytenspezifische Granula und beginnen thrombozytenspezifische Proteine zu exprimieren [150, 216]. Für die Entwicklung und das Wachstum der Megakaryozyten ist das hormonell aktive Glykoprotein Thrombopoietin von großer Wichtigkeit [129]. Im Rahmen der Thrombozytenentstehung kommt es in den sinusoiden Blutgefäßen des Knochenmarks zur Bildung von „Pro-Plättchen“ ausgehend von den ausgereiften Megakaryozyten durch Remodelling des Zytoskeletts [150, 267]. Vesikel, welche Granula aus dem Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) enthalten, werden in den multivesikulären Körperchen (MVB) sortiert, verpackt und anschließend zusammen mit Organellen in die „Pro-Plättchen“ transportiert [31, 203, 270]. Zytoplasma-Abschnürungen führen nun zur Thrombozytenentstehung, wobei Thrombozyten durch Scherkräfte in den Blutkreislauf abgegeben werden [244]. Neuere Publikationen weisen darauf hin, dass reife Megakaryozyten „Pro-Plättchen“-artige Strukturen in die

Blutgefäße abgeben und somit die terminale Entstehung von Thrombozyten auch im Blutkreislauf erfolgt [150, 218, 246].

Da es sich bei Thrombozyten um Zytoplasma-Abschnürungen der Megakaryozyten handelt, besitzen sie keinen Zellkern und sind somit nur bedingt zur Proteinbiosynthese, durch von Megakaryozyten erhaltene messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), fähig [145, 267]. Folglich können Thrombozyten nicht durch Zellteilung proliferieren, sondern bedürfen für ihre zahlenmäßige und funktionelle Aufrechterhaltung der Neubildung mittels Megakaryopoese und Thrombopoese [128].

1.1.2 Thrombozytenmorphologie und -struktur

Die menschlichen Thrombozyten sind kleine, bikonkave und diskoide Zellen mit einer durchschnittlichen Oberfläche von $8 \mu\text{m}^2$ [82, 167]. Mit einem Durchmesser von 2-4 μm und einer Dicke von etwa 1 μm sind sie die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile [41, 202, 215]. Ein einzelner Thrombozyt hat ein mittleres Zellvolumen (*mean platelet volume*, MPV) von etwa 6-10 fl [28, 95]. Die physiologische Hauptfunktion der Thrombozyten ist die primäre Blutstillung [82]. Die diskoide Form der Thrombozyten, die Form der weiteren korpuskulären Blutbestandteile, zusammen mit dem rheologischen Verhalten des Bluts stellen die Nähe der Thrombozyten zu den Endothelzellen sicher und ermöglichen somit die nötigen Gegebenheiten zur primären Blutstillung [1, 103]. Thrombozyten sind anukleäre Zellen, weswegen sie nur bedingt zur Neusynthese von Proteinen fähig sind [41, 145, 267].

Die Struktur der Thrombozyten kann in die folgenden vier morphologischen Zonen eingeteilt werden: Die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen sowie die Zone der Membransysteme (Tabelle 1) [82, 87, 95, 151, 257].

Tabelle 1: Ultrastruktur der Thrombozyten modifiziert nach [95, 257].

Zone	Bestandteile
Periphere Zone	Plasmamembran Glykokalix
Strukturelle/Sol-Gel Zone	Mikrotubuli Aktin Myosin
Zone der Organellen	Dichte Granula α -Granula Lysosomen Glykosomen Mitochondrien
Zone der Membransysteme	Offenes kanalikuläres System Dichtes tubuläres System

Die periphere Zone besteht aus einer polarisierten Phospholipidschicht (Bilayer) mit eingelagerten Membranproteinen, umgeben von einer Glykokalix aus Glykoproteinen (GP), Proteinen und Mukopolysacchariden [95]. In dieser Zone sind somit die Oberflächenrezeptoren, welche für Adhäsion sowie die Aktivierung der Thrombozyten durch Agonisten verantwortlich sind, integriert [82, 87, 95, 151, 257].

Die strukturelle Zone besteht aus Mikrotubuli, welche submembranös liegen, sowie weiteren Strukturproteinen (Aktin, Aktinbindepoteine, Myosin), die das Zytoskelett bilden [21, 95]. Die strukturelle Zone ist verantwortlich für die typische diskoidale Form der ruhenden Thrombozyten und ist an der Formveränderung und weiteren Prozessen bei Aktivierung der Thrombozyten beteiligt [21, 95, 258, 261].

Die Zone der Organellen besteht aus den Glykosomen, bei welchen es sich um einen Glykogenspeicher handelt, den Mitochondrien und den drei verschiedenen Formen der Speichergranula [95]. Die Speichergranula beinhalten Proteine und weitere Substanzen wie Botenstoffe, sie können in die α -Granula, dichte Granula und Lysosomen unterteilt werden und sind beteiligt an den Thrombozytenfunktionen, wie zum Beispiel bei der Thrombozytenaktivierung [95]. Die Aufgaben der Granula hängen wesentlich von den in ihnen gespeicherten Stoffen ab [271]. In den dichten Granula sind unter anderem die Adeninnukleotide Adenosindiphosphat (ADP) und

Adenosintriphosphat (ATP) sowie weitere Moleküle wie Serotonin, Histamin und Kalzium (Ca^{2+}) enthalten [271]. Die α -Granula beinhalten zahlreiche Enzyme, Zytokine, Wachstums- und Koagulationsfaktoren, welche für Funktionen wie Adhäsion, Aggregation, Hämostase und thrombozytär vermittelte Inflammation benötigt werden [99, 201, 271]. Die Lysosomen der Thrombozyten enthalten hydrolytische Enzyme wie saure Hydrolasen, Glykosidasen und kationische Proteine, die bei Abbauprozessen relevant sind [271].

Die Zone des Membransystems besteht aus dem offenen kanalikulären System (*surface connected open canalicular system*, SCS) und dem dichten tubulären System (*dense tubular system*, DTS) [95]. Das SCS durchzieht die Thrombozyten, bildet ein Kanalsystem, welches sich durch Poren in die Plasmamembran eröffnet und dient dem Transport von Thrombozytenkomponenten wie Granula sowie als Reservoir für die Oberflächenvergrößerung der Plasmamembran [62, 260]. Das DTS stammt vom endoplasmatischen Retikulum des Megakaryozyten ab und dient als intrazellulärer Speicherort für freie Kalziumionen (Ca^{2+}) und Enzyme [259]. Abbildung 1 stellt die Thrombozytenmorphologie dar.

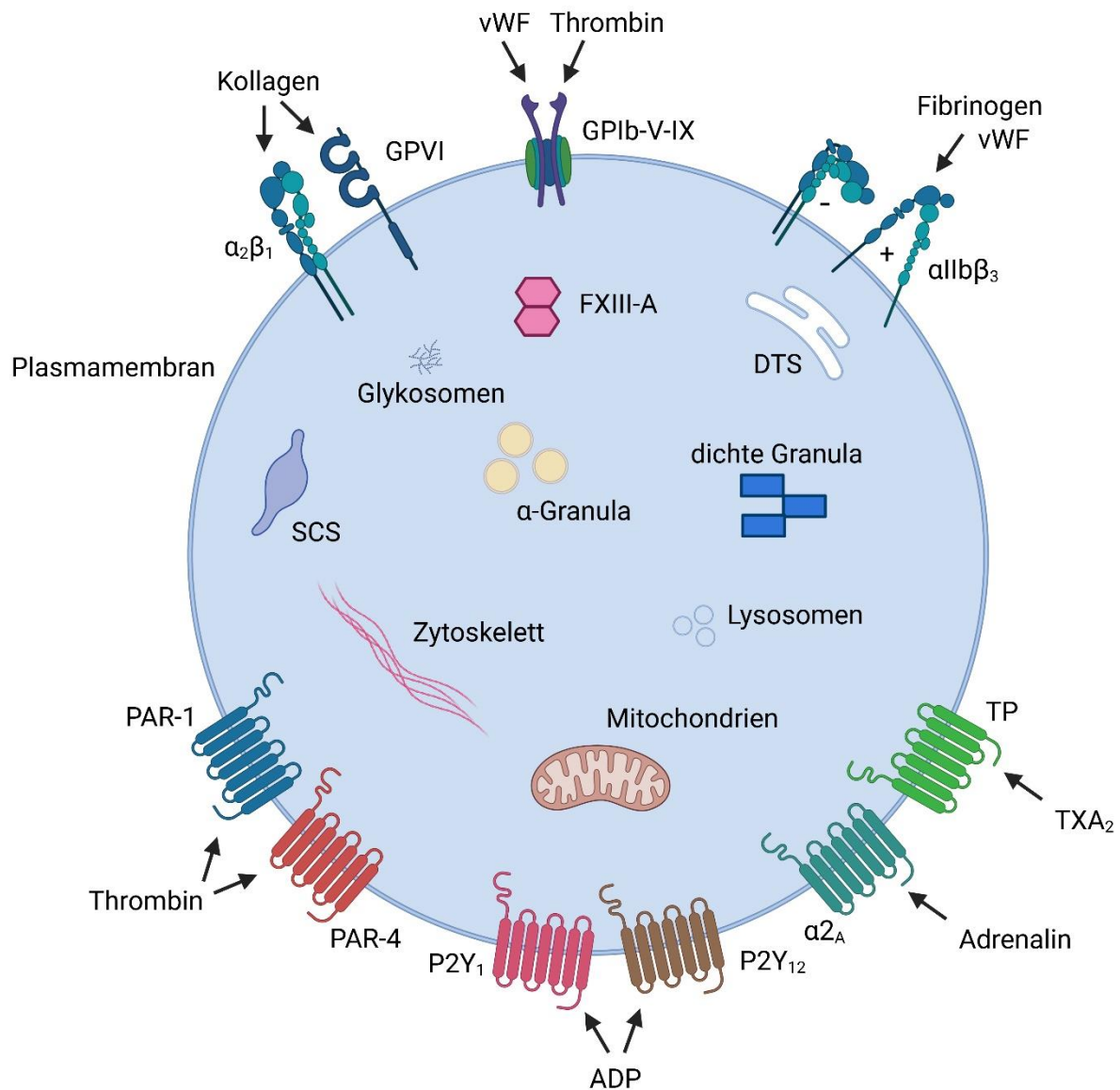


Abbildung 1: Thrombozytenmorphologie modifiziert nach [5]. Die periphere, die strukturelle sowie die Zone der Membransysteme bestehen aus einer Plasmamembran mit Rezeptoren, dem Zytoskelett und den SCS sowie dem den Thrombozyten durchspannenden DTS. Intrazellulär beinhalten die Thrombozyten die dichten Granula, die α-Granula, die Lysosomen, die Mitochondrien sowie die Glykosomen. Created with BioRender.com.

1.1.3 Thrombozytenanzahl

In gesunden erwachsenen Menschen liegt die Thrombozytenanzahl im peripheren Blut bei etwa bei 150×10^9 bis 400×10^9 pro Liter Blut [57]. Insgesamt nehmen die Thrombozyten einen Anteil von etwa 0,3 % am gesamten Blutvolumen ein. Etwa ein Drittel der Thrombozyten ist in der Milz gespeichert [57]. Um die Gesamtthrombozytenzahl aufrechtzuerhalten, müssen circa 100×10^9 Thrombozyten täglich von reifen Megakaryozyten in den Blutkreislauf abgeschnürt werden [57].

1.1.4 Thrombozytenfunktion

Die physiologische Hauptfunktion der Thrombozyten ist die Aufrechterhaltung der Hämostase [107]. Die Hämostase lässt sich in die primäre Hämostase, die sekundäre Hämostase und die Fibrinolyse einteilen. Ziel der primären Hämostase ist es, eine Gefäßwandläsion durch Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten zunächst abzudecken [252].

Im Rahmen der sekundären Hämostase wird die Koagulationskaskade, welche in intrinsisches und extrinsisches System unterteilt wird, aktiviert [252]. Beide Systeme führen zur Aktivierung des Stuart-Prower-Faktors (Faktor X) und münden somit in einem gemeinsamen Endweg: Thrombin (Faktor IIa) entsteht durch proteolytische Spaltung aus Prothrombin (Faktor II) und führt als Protease wiederum zur Spaltung von Fibrinogen (Faktor I) in Fibrin (Faktor Ia) [75]. Fibrin bewirkt durch Verfestigung des instabilen Thrombozytenaggregats die Ausbildung eines stabilen Thrombus und somit eine suffiziente Blutstillung [127]. Im Rahmen der Wundheilung wird nachfolgend ein Teil des Thrombus durch Fibrinolyse wieder aufgelöst [48].

Über die Hauptfunktion der Hämostase hinaus sind Thrombozyten auch in Mechanismen, welche die Immunabwehr betreffen, involviert [84, 233]. Thrombozyten speichern in Organellen, wie α -Granula und dichte Granula, pro-inflammatorische Substanzen wie Zytokine und Chemokine, können diese auf Aktivierung freisetzen und beeinflussen dadurch die umgebenden Zellen des Endothels sowie dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten [83, 85, 186, 254].

Thrombozytenadhäsion

Im Rahmen der primären Hämostase kommt es durch thrombozytären Kontakt mit der extrazellulären Matrix, wie zum Beispiel verschiedenen Kollagentypen, Von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin, Fibronectin und Thrombospondin, zum Abfangen und zur Anlagerung ruhender Thrombozyten an die Gefäßwandläsion [54]. Die Adhäsion von ruhenden Thrombozyten resultiert in deren Formveränderung, wodurch eine stabile Abdeckung der Gefäßwandläsion ermöglicht wird. Durch Interaktion des vWF mit seinem hochaffinen, thrombozytären Rezeptor Glykoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX) wird ein erster Kontakt zwischen Thrombozyten und der Gefäßwandläsion, bei den hohen Scherraten von mehr als 1.000 s^{-1} , durch initiales Abfangen (*tethering*) und transientes Anhaften (*rolling*) der Thrombozyten vermittelt [8, 9, 25, 211, 212]. Es erfolgt eine

Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion durch weitere Rezeptoren der Integrinfamilie [9]. Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI an Kollagen induziert eine Formveränderung und Aktivierung der adhärenen Thrombozyten [179]. Diese Formveränderung begünstigt das Abdichten der Gefäßwandläsion [179]. Die adhärenen und aktivierten Thrombozyten setzen Granulainhaltsstoffe frei, welche den Aktivierungsprozess verstärken und weitere zunächst ruhende Thrombozyten rekrutieren und somit die Aggregation induzieren [209].

Thrombozytenaggregation

Die Aggregation beschreibt die Koadhäsion von mindestens zwei Thrombozyten untereinander [116]. Sie beschreibt einen Prozess, der innerhalb von sehr kurzer Zeit (15 s bis 2 Minuten (min)) nach Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten zur Bildung eines Thrombozytenthrombus führt [82]. Die Aggregation erfolgt über das Ausbilden von Fibrinogenbrücken und findet durch die „inside-out signaling“-vermittelte Aktivierung und somit der Modifikation der Ligandenaffinität des thrombozytären Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ statt [44, 265]. Sie ist abhängig von der Scherkraft, den umgebenden Kalziumionen und dem Fibrinogen [82]. Fibrinogen ist ein bivalenter Ligand für den aktivierten thrombozytären Fibrinogenrezeptor Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) und kann somit Ca^{2+} -abhängig GPIIb/IIIa von verschiedenen Thrombozyten zunächst reversibel (primäre Aggregationsphase) und nach Freisetzung thrombozytärer Granula-Inhaltsstoffe irreversibel (sekundäre Aggregationsphase) miteinander verbinden [54, 82, 210].

Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können durch Bindung an extrazelluläre Matrixbestandteile, wie zum Beispiel Kollagen, oder durch Bindung an Agonisten, wie zum Beispiel ADP oder Thrombin, aktiviert werden [40]. Hierbei kommt es zu morphologischen und funktionellen Veränderungen. Durch das Binden von Agonisten an den entsprechenden Rezeptor kommt es über Signaltransduktionswege zur Bildung von Signalfaktoren, welche wiederum intrazelluläre Veränderungen, wie zum Beispiel die intrazelluläre Kalziumfreisetzung, veranlassen [32]. Durch das Ansteigen der intrazellulären Kalziumkonzentration erfahren die Thrombozyten eine Formveränderung mit Ausbildung von Pseudopodien (*shape change*) durch

Veränderungen und Neuorganisation des Zytoskeletts der strukturellen Zone [32]. Im Rahmen dieser Formveränderung durchlaufen die Thrombozyten eine Vergrößerung der durchschnittlichen Oberfläche auf bis zu $12 \mu\text{m}^2$ [67, 82].

Kollagen und der vWF bilden die wichtigsten Stimuli der Thrombozytenaktivierung innerhalb der Adhäsionssubstrate [210]. Zusätzlich zu diesen Komponenten der subendothelialen Matrix haben auch weitere Agonisten, wie zum Beispiel Thrombin, Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 (TXA2), eine auto- und parakrine Wirkung und können dadurch die Aktivierung der Thrombozyten induzieren [210]. In diesem Fall wird die Thrombozytenaktivierung über heterotrimere G-Proteine (G_i , G_q und $G_{12/13}$), welche an die entsprechenden Membranrezeptoren gekoppelt sind, induziert [183, 210, 228]. Nach Thrombozytenstimulation mit ADP durch den $P2Y_{12}$ -Rezeptor hemmen G_i -gekoppelte Rezeptoren die Aktivität der Adenylylcyclase und erniedrigen hierdurch die intrazelluläre Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP-Konzentration) [74, 136, 182, 262]. Die thrombinsensitiven Protease-aktivierten Rezeptoren-1 und -4 (PAR-1 und PAR-4) und der ADP-Rezeptor $P2Y_1$ sind G_q gekoppelt und es kommt durch Bindung zur Stimulation der Phospholipase C- β (PLC), Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), sowie folglich dem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und der Formänderung [74, 136, 174, 182, 191]. Der zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg stimuliert wiederum die Phospholipase A2 (PLA2), welche die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus thrombozytären Membranphospholipiden katalysiert. Cyclooxygenase-1-abhängig (COX-1) wird aus AA TXA2 synthetisiert, welches wiederum die Thrombozytenaktivierung sowohl durch Aktivierung von G_q als auch $G_{12/13}$ verstärkt [161]. $G_{12/13}$ -gekoppelte Proteine induzieren über Reaktion mit Proteinen der Rho-Familie Reorganisationsprozesse des Zytoskeletts [182]. Dieser Signalweg erfolgt Ca^{2+} -unabhängig und resultiert letztendlich wie die Ca^{2+} -abhängige G_q -vermittelte Signaltransduktionskaskade in Veränderungen des Zytoskeletts, welche die Grundlage des thrombozytären „shape change“ darstellt [20, 182, 183].

Des Weiteren kommt es während der Aktivierung der Thrombozyten zur veränderten Orientierung der Phospholipide der Plasmamembran, welches ein Anlagern von Gerinnungsfaktoren und somit die sekundäre Hämostase ermöglicht [143].

Sekretion

Während der Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten, werden die Granula in die Umgebung abgegeben und hierdurch werden weitere Thrombozyten aktiviert und rekrutiert [82]. Dies erfolgt entweder über Verschmelzung der Granula mit dem SCS oder der Plasmamembran durch Exozytose [63, 168, 235]. Es handelt sich hierbei um einen ATP- und Ca^{2+} -abhängigen Prozess. Die dichten Granula enthalten hauptsächlich ATP, ADP, Ca^{2+} , Magnesium (Mg^{2+}) und Serotonin [201]. Die α -Granula enthalten hauptsächlich Proteine, wie zum Beispiel Plättchenfaktor-4 (PF4), Wachstumsfaktoren, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), und auch membranständige Proteine wie P-Selektin (CD62P) [201]. P-Selektin wird bei der Sekretion an die Thrombozytenmembran transloziert [158, 234]. Die Lysosomen enthalten Proteasen, Hydrolasen und Kollagenasen. Diese Enzyme können nach Sekretion am pathologischen Umbau der Gefäßwände zum Beispiel bei der Arterogenese beteiligt sein [52, 144]. Der freigesetzte Inhalt der Granula wirkt sowohl autokrin, indem die Aktivierung der Thrombozyten verstärkt wird, als auch parakrin, indem weitere Thrombozyten aktiviert und rekrutiert werden [250].

1.1.5 Thrombozytenlebensdauer

Da es sich bei Thrombozyten um Zytoplasma-Abschnürungen der Megakaryozyten handelt, besitzen sie keinen Zellkern und sind somit nur bedingt zur Proteinbiosynthese, durch von Megakaryozyten erhaltene mRNA, fähig [41, 145, 267]. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt aus diesem Grund zwischen sieben und zehn Tagen [141]. Im Laufe der Lebensdauer ändert sich die Zusammensetzung der Oberflächenproteine der Thrombozyten (Expressionszunahme von Phosphatidylserin, Deglykosylierung von membranständigen Glykoproteinen), welche von Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems erkannt werden und daraufhin ein Abbau der Thrombozyten in Milz und Leber erfolgt [115].

1.2 Relevante Membranglykoproteine der Thromozyten

Zentrale Funktionen und damit einhergehende Interaktionen, wie die Adhäsion der Thrombozyten an die subendotheliale Matrix, die Aggregation der Thrombozyten untereinander und die Bindung an andere Zelltypen, wie Endothelzellen und Leukozyten, werden durch Membranglykoproteine der Thrombozyten, welche als Rezeptoren dienen, vermittelt [131, 137]. Anhand ihrer charakteristischen

Molekularstruktur werden die Membranglykoproteine der Thrombozyten in fünf verschiedene Gruppen unterteilt: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine, Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren und lysosomale integrale Membranproteine (Tabelle 2) [131].

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, welche aus einer α - und β -Untereinheit bestehen und an Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sind [82, 112].

Tabelle 2: Übersicht ausgewählter thrombozytärer Membranglykoproteine modifiziert nach [82].

Klassifizierung	Elektrophoretische Klassifizierung	CD-Nomenklatur
Integrine $\alpha_2\beta_1$ $\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIa-IIa GPIIb/IIIa	CD49b CD41/CD61
leuzinreiche Glykoproteine -	GPIb-V-IX	CD42a-b-c
Selektine -	P-Selektin	CD62P
immunglobulinähnliche Rezeptoren -	GPVI	

1.2.1 Glykoprotein VI (GPVI)

Das GPVI wurde erstmals 1982 von Clemetson *et al.* als ein 60-65 kDa glykosiliertes Membranprotein von Thrombozyten beschrieben [55]. Im Jahr 1987 erkannte Sugiyama *et al.* erstmals die Rolle von GPVI als Kollagenrezeptor durch Experimente mit Thrombozyten einer Patientin mit idiopathischer thrombozytopenischer Purpura [238]. Clemetson *et al.* gelang es im Jahr 1999 GPVI zu klonen, wodurch gezielte Erkenntnisse bezüglich der Struktur sowie weitere Forschung durch α -GPVI Antikörper und rekombinantes GPVI möglich wurden [53].

GPVI ist ein, in Thrombozyten und Megakaryozyten vorhandenes, Transmembranprotein der Immunglobulin-Rezeptor-Superfamilie und besteht aus 339

Aminosäuren [53, 117]. Anhand von Proteomanalysen wurde eine Zahl von 9.600 GPVI-Kopien in humanen Thrombozyten bestimmt, die GPVI-Oberflächenexpression beträgt 3.730 ± 453 GPVI-Kopien [29, 43]. Diese Abweichung der GPVI-Kopien kann durch einen transmissionselektronenmikroskopisch-sichtbaren internen Vorrat an GPVI in dem SCS und der α -Granula erklärt werden [242].

Menschliches GPVI besteht aus zwei Immunglobulin-ähnlichen (Ig) extrazellulären Domänen, einer Mucin-ähnlichen Region, einer transmembranären Region und einem zytoplasmatischen Anteil (Abbildung 2) [53].

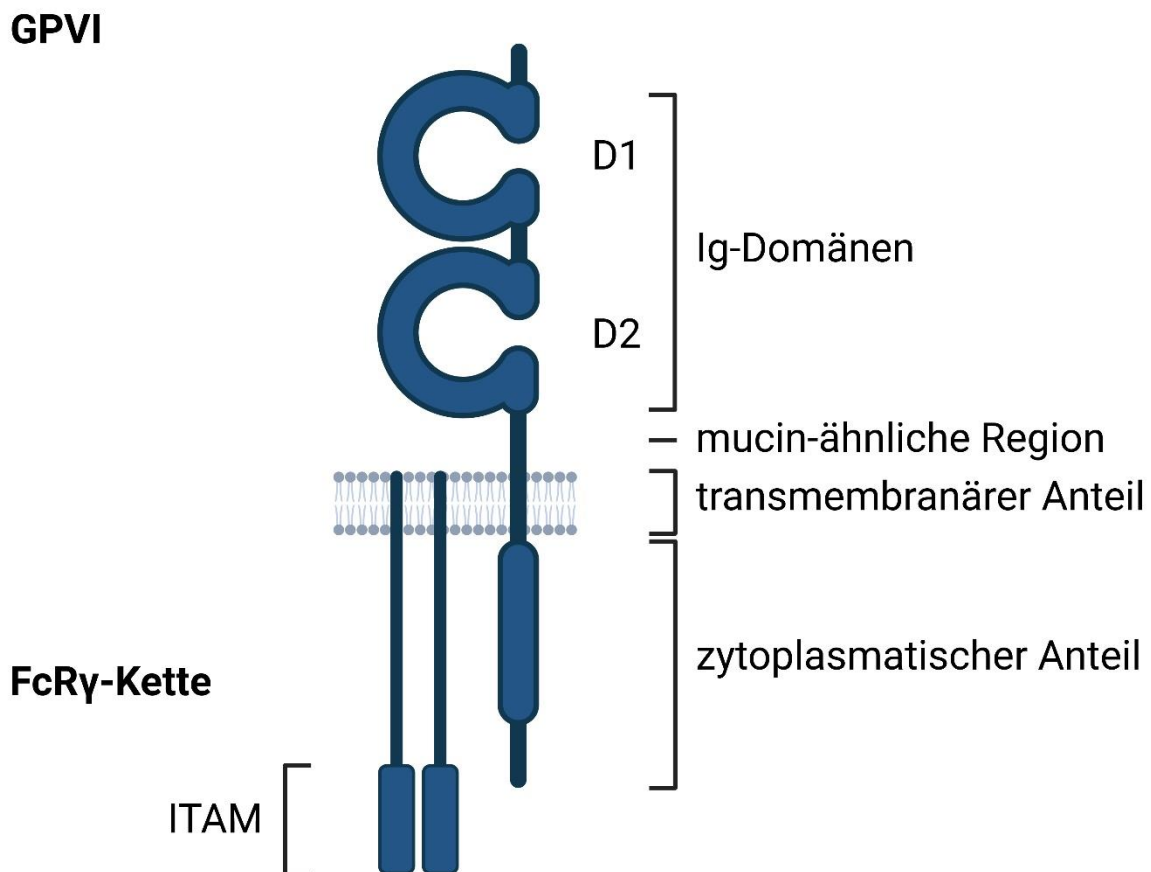


Abbildung 2: *Kollagenrezeptor GPVI* modifiziert nach [179]. GPVI besteht aus den beiden Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig) D1 und D2, einer mucin-ähnlichen Region, dem transmembranären Anteil und einem zytoplasmatischen Anteil. Der zytoplasmatische Anteil ist assoziiert mit der FcR γ -Kette, welche den zur Signalübermittlung relevanten immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) beinhaltet. Created with BioRender.com.

Der extrazelluläre Anteil beinhaltet zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen (D1, D2), welche durch Disulfidbrücken geformt, durch eine Interdomäne verbunden werden und

als Kollagenbindungsdomäne dienen [53, 179]. Auch extrazellulär befindet sich ein Mucin-ähnlicher Stiel, durch welchen die Immunglobulin-ähnlichen Domänen D1 und D2 ihre Position beibehalten [53, 179]. GPVI weist proximal der Membran eine Schnittstelle für Metalloproteasen auf, hieraus resultiert ein 55 kDa lösliches GPVI-Fragment (sGPVI) [79]. Die transmembranäre Domäne beinhaltet geladene Anteile, welche durch eine Ionenbrücke die Assoziation zu einer FcR γ -Kette ermöglicht [27, 272]. Die zytoplasmatische Domäne besteht aus 51 Aminosäuren und stabilisiert die Assoziation mit der FcR γ -Kette und beinhaltet eine Domäne für die Bindung von Calmodulin und eine Prolin-reiche Domäne, an welche Kinasen der Src-Familie, Fyn und Lyn, konstitutiv gebunden sind [11, 34, 241]. Gardiner *et al.* beschrieb 2004 und 2005, dass die Bindung von Calmodulin an GPVI eine zentrale Rolle bei der Regulation der Oberflächenexpression von GPVI spielt [78, 79]. Eine Unterbrechung der Calmodulin-Bindung an die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors durch die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor induziert einen Metalloproteinase-vermittelten Verlust von GPVI von der Thrombozytenoberfläche [78, 79].

Die Assoziation der FcR γ -Kette spielt eine entscheidende Rolle bei der Signalübermittlung des GPVI-Rezeptors [27]. Eine Agonistenbindung an GPVI führt zunächst zur Phosphorylierung zweier Tyrosin-Residuen, lokalisiert in der ITAM-Domäne, der FcR γ -Kette durch Tyrosinkinase der Src-Familie, Fyn und Lyn [65, 195]. Die ITAM-Domäne besteht aus zwei YXXL Sequenzen, welche durch sechs bis zwölf Aminosäuren getrennt sind [195]. Durch die Phosphorylierung kommt es zur Bindung und Aktivierung der Tyrosinkinase Syk, welche in der Bildung eines Signalosoms, bestehend aus Adaptor- und Effektorproteinen, wie dem *Activation of T-Cells* (LAT), resultiert [189]. Phosphoryliertes LAT rekrutiert weitere Adaptorproteine, wie zum Beispiel die *SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa* (SLP-76) und bindet die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-Kinase), welche die Entstehung von Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphat (PIP $_3$) katalysiert [89, 110]. LAT, SLP-76 und PIP $_3$ aktivieren die Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) und führen zur Phosphorylierung der PLC γ 2 [89, 240]. Die Aktivierung der PLC γ 2 führt wiederum zur Produktion der *Second Messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) und 1,2-Diacylglycerol (DAG), welche zur Freisetzung von Ca $^{2+}$ aus intrazellulären Vorräten und der Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führen [14]. Am Ende des Signalwegs, steht somit durch verschiedene Effektorenzyme die Aktivierung und Freisetzung der granulären Komponenten der Thrombozyten (Abbildung 3) [14].

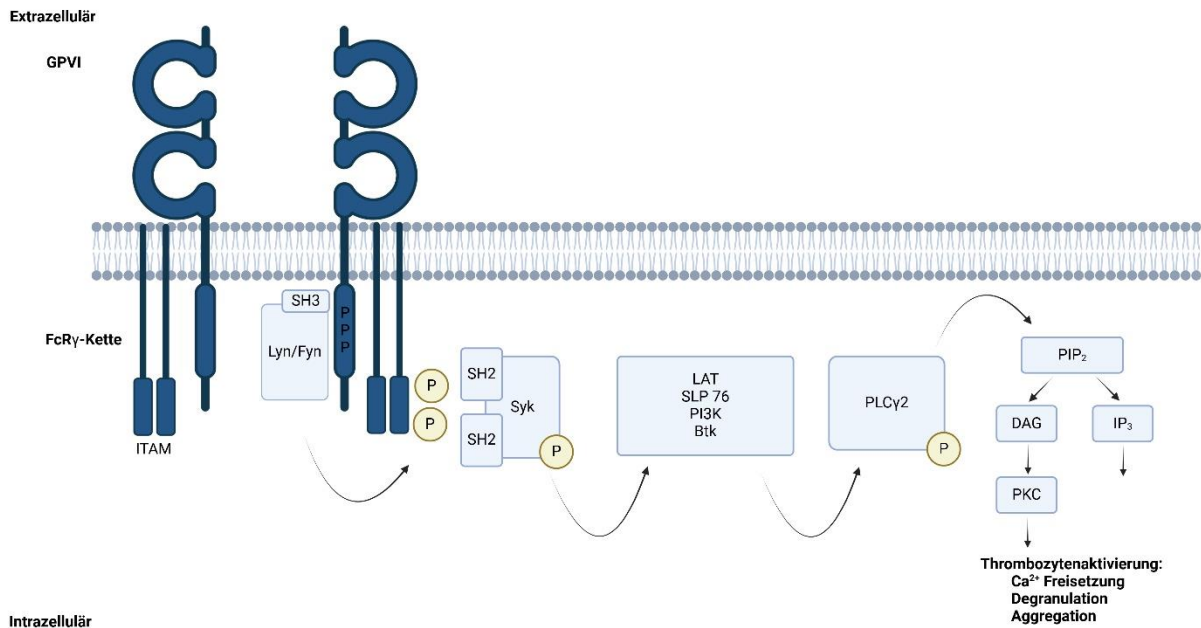


Abbildung 3: Signalkaskade bei Ligandenbindung an GPVI modifiziert nach [37, 61]. Der Transmembranteil von GPVI ist nicht kovalent an das Fragment der FcRγ-Kette gebunden, die als signalgebende Untereinheit dient. Die Kinasen der Src-Familie, Fyn und Lyn, sind mit der FcRγ-Kette assoziiert. Bei GPVI-Aktivierung veranlassen die Kinasen die Tyrosinphosphorylierung der ITAM-Domäne der FcRγ-Kette. Daraufhin folgt die Bindung an die SH2-Domänen der Tyrosinkinase Syk, was zu deren Aktivierung führt. Nachgeschaltete Adaptor- und Signalproteine wie LAT, SLP76, PI3-Kinase und Btk werden aktiviert und führen dann zur Aktivierung des Haupteffektorproteins PLCγ2. Dies führt zur Aktivierung der PKC und Mobilisierung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher, was in der Thrombozytenaktivierung resultiert. Created with BioRender.com.

Der GPVI/FcRγ-Ketten-Komplex ist von zentraler Bedeutung für die Bindung an Kollagen. Massberg *et al.* zeigte 2003, dass es in Abwesenheit von GPVI bei Mäusen zu keiner stabilen Adhäsion von Thrombozyten bei arteriellen Verletzungen kommt [156]. Goto *et al.* zeigte 2002 weiterhin, dass es bei Patienten mit fehlendem GPVI keine Adhäsion von Thrombozyten an Kollagen stattfindet [94]. Auch Nieswandt *et al.* bestätigten dies anhand von Untersuchungen, in denen Thrombozyten von Mäusen mit fehlendem GPVI-FcRγ-Kette-Komplex trotz ausreichenden Vorhandenseins der anderen Adhäsionsrezeptoren GPIb-V-IX, αIIbβ3 und α2β1 praktisch keine Adhäsion an Kollagen aufweisen [178].

GPVI bindet fibrilläres und nicht-fibrilläres Kollagen, jedoch nicht lösliche Formen [125]. Synthetische *triple-helical* Kollagen-artige Peptide (CRP-XL) wurden hergestellt und dienen in der Forschung als Agonisten von GPVI [170, 188].

Neben weiteren GPVI-Agonisten wie Convulxin, zeigte Oishi *et al.* 2021, dass GPVI zusammen mit CLEC-2 auch als Rezeptor für Hämin dient [184, 193].

Eine Proteolyse von GPVI an der extrazellulären Domäne resultiert in einem 55 kDa sGPVI und einem 10 kDa membranassoziierten Fragment und wird sowohl durch aktivierungsabhängige als auch -unabhängige Wege induziert [79]. Bender *et al.* zeigte 2011, dass das Ektodomänen-Shedding von GPVI in murinen Thrombozyten abhängig vom Stimulus durch die *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein* 10 und 17 (ADAM10/ADAM17) und eine dritte noch nicht identifizierte Protease vermittelt wird [23]. Zuvor berichtete Bergmeier *et al.* 2004, dass mitochondrielle Schädigung von murinen Thrombozyten durch *carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone* (CCCP) die proteolytische Spaltung von GPVI durch Metalloproteasen induziert [26]. Inkubation von GPVI Agonisten wie Kollagen, Convulxin und CRP-XL sowie Calmodulininhibitor W7 mit humanen Thrombozyten führte ebenfalls zur Abspaltung eines 55 kDa löslichen GPVI-Fragments, welche durch den Breitspektrum-Metalloproteaseinhibitor GM6001 verhindert werden konnte [79]. Die Dissoziation von Calmodulin von seiner Bindungsstelle an der zytoplasmatischen Domäne von GPVI führt zur Aktivierung der Proteasen der ADAM-Familie [79]. ADAM10/ADAM17 vermitteltes Ektodomänen-Shedding von GPVI erfolgte durch Behandlung der murinen Thrombozyten mit CCCP oder W7 *in vitro*, wohingegen JAQ1 Antikörper-induzierte Spaltung von GPVI *in vivo* unabhängig von ADAM10/ADAM17 erscheint [23]. Al-Tamimi *et al.* zeigte 2011 und 2012 weitergehend, dass im humanen Organismus sowohl der Koagulationsfaktor Xa als auch pathologisch hohe Scherraten ADAM10-vermitteltes das GPVI Ektodomänen-Shedding induzieren (Tabelle 3) [2, 3].

Tabelle 3: Beschriebene Proteasen, welche GPVI spalten.

GPVI spaltende Proteasen	Vorkommen	Quelle
ADAM 10	murin: Spaltung in Anwesenheit von Calmodulininhibitor (W7), aber nicht durch mitochondrielle Schädigung (CCCP) human: Spaltung induziert durch Faktor Xa und Scherkraft	[2, 3, 23]
ADAM 17	murin: Spaltung induziert durch mitochondrielle Schädigung (CCCP)	[23]
Drittes unbekanntes Enzym	murin: Spaltung induziert durch Antikörper (JAQ1) <i>in vivo</i>	[23]

Klinisch können Plasmalevel von sGPVI als Marker der *in vivo* Thrombozytenaktivierung herangezogen werden (Tabelle 4) [3].

Tabelle 4: Erhöhte Plasmawerte von sGPVI in ausgewählten Krankheitsbildern.

Krankheitsbild	Plasmalevel von sGPVI	Quelle
Koronare Herzkrankheit (KHK)	erhöht	[3]
Disseminierte intravaskuläre Koagulopathie (DIC)	erhöht	[2]
Autoimmune Anti-GPVI-Antikörper	erhöht	[77]
Aktuer ischämischer Schlaganfall	erhöht	[4]
Akutes Koronarsyndrom	erhöht	[30]
Nicht valvuläres Vorhofflimmern	erhöht	[30]

1.2.2 CLEC-2

Suzuki-Inoue *et al.* sowie Chaipan *et al.* fanden 2006 heraus, dass Megakaryozyten und Thrombozyten CLEC-2 exprimieren und der CLEC-2-Agonist Rhodocytin zur Thrombozytenaktivierung führt [49, 239]. CLEC-2 ist ein 32 kDa schweres Typ II Membranprotein bestehend aus einer extrazellulären kohlenhydratartigen Domäne, einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Schwanz [198, 239]. Der zytoplasmatische Schwanz beinhaltet eine halbe ITAM-Domäne, welcher durch Src und Syk Tyrosinkinasen phosphoryliert wird [198, 239]. Rhodocytin ist als exogener CLEC-2 Ligand beschrieben, Podoplanin als endogener Ligand [198]. 2013 wurde Fucoidan, ein sulfatierter Kohlenhydrat des *Fucus vesiculosus*, als ein weiterer Agonist von CLEC-2 und Thrombozytenaktivator von Manne *et al.* beschrieben [153]. Bourne *et al.* identifizierte 2021 Hämin als endogenen Liganden für CLEC-2, welcher ebenfalls in der Thrombozytenaktivierung resultiert [38]. Erst kürzlich wurde Katacine als ein aggregationsinduzierender Ligand von CLEC-2 identifiziert [165].

CLEC-2 gehört der HemITAM-Rezeptor-Familie an, welche eine ITAM-Domäne aus nur einer YXXL Sequenz besitzt [72]. Da CLEC-2 als Dimer exprimiert ist, sind wie bei den ITAM-Rezeptoren zwei YXXL Sequenzen vorhanden [72].

Es wurde gezeigt, dass humanes CLEC-2 auf Thrombozytenaktivierung mit Rhodocytin unabhängig von ADAM10/17 und abhängig von der Matrix-Metalloproteinase-2 (MMP-2) gespalten wird und hieraus ein 25 kDa lösliches Fragment (sCLEC-2) resultiert [113, 130].

1.2.3 P-Selektin

Das Adhäsionsmolekül P-Selektin, auch CD62P genannt, ist ein 140 kDa transmembranöses Protein, welches in den α -Granula der Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert vorliegt [73]. P-Selektin vermittelt als Adhäsionsmolekül das Rollen von Thrombozyten und Leukozyten auf aktivierten Endothelzellen sowie die Interaktion von Thrombozyten und Leukozyten [159]. P-Selektin beinhaltet eine N-terminale C-Typ Lektin-Domäne, eine dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlichen Domäne (*EGF-like motif*), eine Serie an sich wiederholenden Molekülen (*short consensus repeats*, SCRs), eine transmembranäre Domäne und einen zytoplasmatischen Anteil [123]. Nach Aktivierung der Thrombozyten oder Endothelzellen, fusionieren die Speicher mit der Plasmamembran und P-Selektin wird an der Zelloberfläche exprimiert [158, 234].

P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf Leukozyten und Thrombozyten sowie GPIb auf Thrombozyten gelten als Liganden für P-Selektin [181]. Hierdurch kommt es zur Rekrutierung von Leukozyten, um entzündetes und verletztes Gewebe zu erreichen [181].

P-Selektin wird *in vitro* durch die Serinprotease Neutrophile Elastase (NE) im Bereich der Ektodomäne gespalten, nicht jedoch *in vivo* [59, 80]. Der Ligand PSGL-1 reguliert das *in vivo* P-Selektin-Shedding auf aktivierten Thrombozyten und ein 100 kDa sP-Selektin-Fragment entsteht, eine spaltende Protease hierzu ist jedoch noch nicht bekannt [59]. sP-Selektin ist bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen erhöht, beispielsweise bei instabiler Angina pectoris und peripherer arterieller Verschlusskrankheit [46, 155, 266].

1.2.4 GPIb

Das Glykoprotein GPIb ist zusammen mit den Proteinen Glykoprotein IX (GPIX) und Glykoprotein V (GPV) Teil eines Komplexes (GPIb-V-IX-Komplex), welcher unter anderem vWF bindet [149]. Jede Komplex-Untereinheit besteht aus einem Typ I Transmembranprotein mit einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz, einer transmembranären Domäne und einem extrazellulären Anteil [149]. Jeweils zwei GPIb β Untereinheiten bilden Disulfidbrücken mit einer GPIb α Untereinheit und sind nicht-kovalent an GPIX gebunden [149]. Die GPV Untereinheit ist über die GPIb α Untereinheit durch transmembranäre Mechanismen schwach mit der GPIb-GPIX-Einheit verbunden [160]. Verantwortlich für die Bindung fast aller Liganden ist die mit 135 kDa größte Untereinheit des Komplexes, GPIb α [111]. Die wesentlich kleinere Untereinheit GPIb β (25 kDa) reagiert intrazellulär mit Calmodulin [8, 10].

Beschriebene GPIb α -Liganden sind vWF, Thrombin, Koagulationsfaktoren XI und XII sowie P-Selektin [18, 39, 70, 124, 126, 207].

Im Rahmen einer Gefäßwandläsion erfolgt die Interaktion des vWF mit dem GPIb-V-IX Komplex, wodurch eine initiale Adhäsion der Thrombozyten vermittelt wird [8, 9, 25]. Ausgehend von der GPIb-GPIX-GPV-Komplex-Aktivierung kommt es zu Signalkaskaden welche wiederum zu Integrinaktivierung und letztendlich zur Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion führen [9]. Intrazelluläre Signalkaskaden wie die Kinasen der Src Familie (Lyn, Fyn), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*

1 (Rac1), PI3-Kinase, PKC werden durch GPIb-GPIX-GPV Ligandenbindung aktiviert [64, 76, 268, 269].

Es wurde gezeigt, dass die Metalloprotease ADAM17 GPIb α proteolytisch spaltet, und damit zur Abspaltung von löslichem sGPIb α (Glykocalicin) in das Blutplasma führt [81].

1.2.5 GPIIb/IIIa

Das Transmembranprotein GPIIb/IIIa, auch bekannt als α IIb β 3, gehört zur Integrinfamilie, dient in aktivierten Thrombozyten als Rezeptor für Fibrinogen, vWF, Fibronectin sowie Vitronectin und vermittelt die Thrombozytenaggregation [24]. Der GPIIb/IIIa-Komplex besteht aus je einem GPIIb- (α -Untereinheit) und einem GPIIIa-Molekül (β -Untereinheit), welche über nicht-kovalente Bindungen assoziiert sind, und liegt als kalzium abhängiges Heterodimer mit einer Anzahl von ca. 50.000 Kopien in der Oberflächenmembran von ruhenden Thrombozyten vor [114, 121]. Weitere GPIIb/IIIa Kopien liegen in den Kompartimenten des SCS und der α -Granula vor und werden bei Aktivierung der Thrombozyten an die Oberfläche verlagert [88, 180, 255, 264].

Die Aktivierung von Thrombozyten durch Liganden wie ADP und Thrombin führt zu einer Konformationsänderung von GPIIb/IIIa woraus ein für die Fibrinogenbindung hochaffiner Zustand resultiert [213]. Die Fibrinogenbindung wiederum löst eine Rezeptor-Cluster-Bildung aus, welche eine Aktivierung des Zytoskeletts zur Folge hat [69, 132].

Shedding der β 3-Untereinheit sowie GPIIb/IIIa ist in der Literatur beschrieben: Wenger *et al.* (31) berichten von einer Abnahme des oberflächlichen Integrins β 3 durch Scherkräfte und Du *et al.* sowie Pfaff *et al.* von einer proteolytischen Spaltung von β 3 Integrin durch die kalzium-abhängige Protease Calpain [50, 60, 192, 256].

1.3 Hämolyse

Die Hämolyse ist die Auflösung der Erythrozyten durch Beschädigung der Integrität der Zellmembran und anschließende Freisetzung von intrazellulären Komponenten wie den Blutfarbstoff Hämoglobin in das Blutplasma [231]. Definiert ist die Hämolyse als die Verkürzung der Lebensdauer von Erythrozyten auf weniger als 100 Tagen bei gesteigertem Abbau [172, 230]. Physiologisch werden die regelrecht gealterten Erythrozyten nach etwa 120 Tagen hauptsächlich über das retikulohistiozytäre System

(RHS) und dessen Makrophagen in Milz, Leber und Knochenmark durch Seneszenz ausgesondert [12, 36, 106, 205].

Abhängig vom Ort des Zelluntergangs, kann eine Unterscheidung in intra- und extravasale Hämolyse erfolgen [86]. Bei der extravasalen Hämolyse erfolgt die Zerstörung der Erythrozyten überwiegend durch das Makrophagensystem in Milz und weiteren Organen [86].

Nach pathophysiologischen Aspekten kann eine Einteilung in korpuskuläre und extrakorpuskuläre Hämolyse erfolgen [42, 106]. Bei der korpuskulären Hämolyse liegt die Ursache der Hämolyse in den Erythrozyten selbst, wohingegen bei der extrakorpuskulären Hämolyse die Umgebung der Erythrozyten ursächlich ist [42, 106].

Unter korpuskulärer Hämolyse werden hereditäre Anomalien wie Membrandefekte (Sphärozytose), Enzymdefekte (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel), Hämoglobinopathien (SCD) sowie erworbene Anomalien (Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie) zusammengefasst [42, 106].

Bei der extrakorpuskulären Hämolyse handelt es sich um die überwiegend erworbene Schädigung der normal aufgebauten Erythrozyten beispielsweise immunologisch bedingt (Wärme/Kälteantikörper, iatrogen durch AB0-inkompatible Transfusionen) oder durch mechanische Kräfte (Herzklappen) [42]. Weitere Gründe für die Hämolyse sind chemische Noxen (Schlangengift), aber auch osmotische Schädigungen (hypo- oder hypermolare Flüssigkeiten), oxidativer Stress, Prostaglandin E2, Thrombozyten-Aktivierungsfaktor und Hämolsin sowie Infektionen mit z.B. Malaria, Toxoplasmose sind als Ursachen beschrieben [68]. Eine Einteilung hämolytischer Anämien ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Einteilung Hämolytische Anämien modifiziert nach [172].

Extrakorpuläre Hämolyse	Korpuläre Hämolyse	
	Angeboren	Erworben
Immunologisch induzierte Hämolysen (Autoimmunhämolyse durch Wärme-Antikörper, Autoimmunhämolyse durch Kälte-Antikörper, Medikamentenassoziierte Immunnhämolyse, Isoantikörper (Transfusionsreaktion))	Membrandefekte (Sphärozytose, Elliptozytose)	PNH
Mechanische Hämolysen (Herzklappen, Marschhämolyse)	Enzymdefekte (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel, Pyrovatkinasemangel)	
Mikroangiopathische Hämolysen (Thrombotische-thrombozytopenische Purpura, Hämolytisch-urämisches Syndrom)	Hämoglobinopathien (Thalassämie, SCD)	
Infektionen (Malaria, Toxoplasmosis)		
Toxisch (Schlangengift)		
Hypersplenismus		

Hämoglobin, welches in Erythrozyten enthalten ist, bildet das zentrale Molekül für die Bindung, den Transport und die Abgabe des Sauerstoffs [118, 154, 217]. Hämoglobin ist ein tetrameres Protein und besteht aus den Globinketten und dem sauerstoffbindenden Häm als prosthetischen Gruppe, einem Porphyrinring mit zentralem zweiwertigem Eisenatom (Abbildung 4) [275].

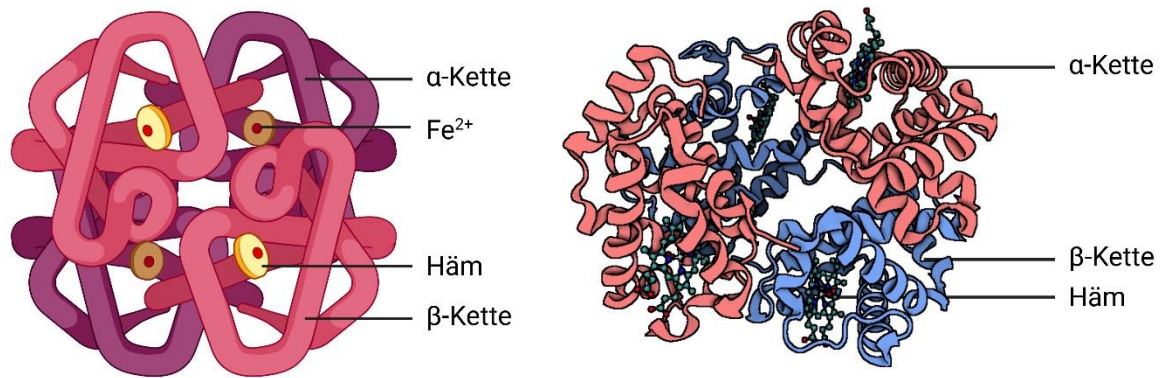


Abbildung 4: Struktur Hämoglobin. Hämoglobin besteht aus zwei α -Ketten und zwei β -Ketten mit vier Häm-Gruppen, welche je ein zentrales zweiwertiges Eisenatom (Fe^{2+}) beinhalten. **Links** Schematische Zeichnung **Rechts** Modell nach PDB 1GZX. Created with BioRender.com.

Bei einem gering ausgeprägten hämolytischen Geschehen wird das freigesetzte Hämoglobin und Häm an die Plasmaproteine Haptoglobin, Hemopexin und Albumin gebunden und daraufhin durch die Hämoxygenase-1 zu Kohlenstoffmonoxid, Biliverdin und zweiwertigem Eisen (Fe^{2+}) verstoffwechselt sowie durch Makrophagen des retikulohistiozytären Systems abgebaut [22, 38, 108, 177, 194, 208, 231]. Im Falle einer ausgeprägten Hämolyse überschreitet das abgegebene Hämoglobin und Häm die Bindungskapazität der Plasmaproteine jedoch und sie verbleiben ungebunden im Blutplasma und führen hier zu Häm-Plasmakonzentrationen von bis zu $20 \mu\text{M}$ [176, 208, 231].

Freies Hämoglobin und dessen prosthetische Gruppe Häm im Blutplasma führen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und weisen so eine proinflammatorische Aktivität auf, wirken zytotoxisch und können zu Gewebhypoxie und Zelltod führen [45, 105, 208, 221]. Freies Hämoglobin führt zu oxidativem Stress und bindet vermehrt freies Stickoxid (NO), beeinflusst hierdurch sowohl den Gefäßtonus als auch thrombotische Ereignisse resultierend in einer überschießenden Vasokonstriktion, Endotheldysfunktion und Thrombozytenaggregation [17, 119, 208, 214]. Im Rahmen der Hämolyse kommt es zur verminderten Verfügbarkeit von Stickoxid. Dies kommt einerseits durch oben erwähntes vermehrtes Binden von NO zustande, andererseits kommt es zur Freisetzung von erythrozytärer Arginase, welche das zur Stickoxidsynthese notwendige L-Arginin in Ornithin umwandelt [92, 169]. NO

reguliert physiologisch den Gefäßtonus und hemmt die Thrombozytenaktivierung [196, 197, 248].

Des Weiteren wird freies Hämoglobin in der Niere filtriert und vermag diese zu schädigen, indem Eisen im Tubulus als Hämosiderin ausfällt [17, 91, 98, 208]. Die Effekte von Häm/Hämin sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Effekte von Häm/Hämin auf verschiedene Wirkorte.

Wirkort	Mechanismus	Wirkung	Quelle
Endothel	Aktivierung der Endothelzellen durch TLR4-Signalweg und induziert somit die Expression des Gewebefaktors (via <i>transcription factor nuclear factor kappa B</i>)	Prothrombotisch Proinflammatorisch	[135, 222]
Gerinnungskaskade	Aktivierung der Gerinnungsfaktoren	Prothrombotisch	[90]
Tubuluszellen der Nieren	Verringerung des Hemopexin-Plasmalevels	Oxidativer Stress	[90]
Erythrozyten	Erhöhung des intrazellulären Kalziumlevels und Erniedrigung des intrazellulären Gluthationlevels	Apoptose und Nekroptose	[90]
Zerebrale mikrovaskuläre Zellen	Erhöhung des intrazellulären Kalziumlevels und Erniedrigung des intrazellulären Gluthationlevels	Apoptose und Nekroptose	[90]

Thrombozyten	Aktivierung der Thrombozyten und Induktion der Ferroptose	Prothrombotisch Ferroptose	[176]
--------------	---	-------------------------------	-------

1.3.1 Hämin

Freies Häm im Blutplasma wird in hohen Konzentrationen zu Hämin oxidiert, welches sich durch dreiwertiges Eisen auszeichnet [38].

Als Hämin wird eine Komplexverbindung von Häm mit oxidiertem Eisen (Fe^{3+}) und einem Chloridion (Cl^-) bezeichnet (Abbildung 5) [96].

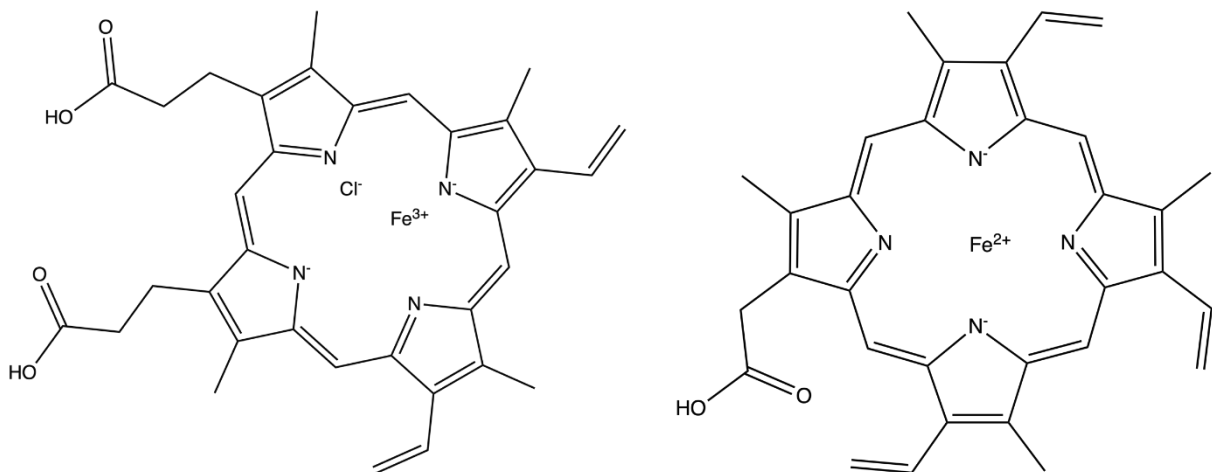


Abbildung 5: Strukturformel Hämin und Häm. Links Hämin Rechts Häm. Strukturformel erstellt in ChemDraw 22.2.0.3348.

1.3.2 Hämin in Thrombozyten

NaveenKumar *et al.* beschrieb 2018 erstmalig, dass das Hämolyseabbauprodukt Hämin Thrombozyten aktiviert und zum Thrombozytenuntergang durch Ferroptose führt [176]. NaveenKumar *et al.* stellte 2018 dar, dass Hämin in Thrombozyten nicht die Apoptose auslöst, sondern die Ferroptose [176]. Die Ferroptose ist ein Eisen-abhängiger programmierter Zelltod, welchen es von der Apoptose, der Nekroptose und der Autophagie abzugrenzen gilt, und der sich durch Akkumulation von ROS, Lipidperoxidation und Verlust von intrazellulärem Glutathion auszeichnet [58, 237]. Hämin induziert die Thrombozytenaktivierung durch einen ITAM-Rezeptor-basierten Weg [199]. Bourne *et al.* beschrieben 2021 die Hämin-induzierte Thrombozytenaggregation, Phosphorylierung der Proteine Syk und PLC γ 2 sowie die

Hämin-konzentrationsabhängige Laktatdehydrogenaseaktivität und die Phosphatidylserin-Oberflächenexpression der Thrombozyten und identifizierten CLEC-2 als einen thrombozytenaktivierenden Rezeptor für Hämin [38]. Des Weiteren wurde Hämin als thrombozytenaktivierender Ligand für GPVI beschrieben [184]. Die Effekte von Hämin in Thrombozyten sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: In der Literatur beschriebene Hämineffekte in Thrombozyten.

Konzentration	Effekt	Quelle
2-12 μM $\geq 25 \mu\text{M}$	Schnelle Thrombozytenaggregation Verzögerte, weniger ausgeprägte Thrombozytenaggregation, Thrombozytenagglutination	[38, 184]
2-12 μM $\geq 25 \mu\text{M}$	Erhöhte P-Selektin Oberflächenexpression Erhöhte GPIIb/IIIa Oberflächenexpression Erniedrigte P-Selektin Oberflächenexpression im Vergleich zu 6,25 μM Hämin Erniedrigte GPIIb/IIIa Oberflächenexpression im Vergleich zu 6,25 μM Hämin	[38]
$\geq 25 \mu\text{M}$	Erhöhte Phosphatidylserin Oberflächenexpression	[38]
$\geq 25 \mu\text{M}$	Erhöhte Laktatdehydrogenase-Aktivität im aktivierten Thrombozytenüberstand (APS)	[38]
$\geq 25 \mu\text{M}$	Induziert ROS-Produktion, Lipidperoxidation und Ferroptose	[176]
$> 2 \mu\text{M}$	Phosphorylierung der Proteine Syk und PLC γ 2, Src Family Kinase (SFK)	[38, 184]

1.4 Furin

1.4.1 Furin als Protease

Die Endoprotease Furin gehört zu der *subtilisin-like proprotein convertase* Familie, deren Hauptfunktion in der Spaltung von Proproteinen in deren aktive Form besteht und ist ein Typ I Transmembranprotein [175]. Bereits beschriebene Substrate für die Protease Furin sind Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, extrazelluläre Matrixproteine sowie weitere Protease-Systeme [245]. So ist Furin involviert in der Spaltung von Pro-Parahormon, TGF β 1, Proalbumin, Pro- β -Sekretase, MMP-1, β -NGF, Thrombozytenintegrin α IIb β 3, Koagulationsfaktor X, vWF, der Virushülle-Polyprotein-Präkursoren HIV gp160 zu gp120 und gp41 und, neuerdings bekannt, auch beteiligt bei der Spaltung der Spike-Proteine des SARS-CoV-2 [56, 142, 157, 162, 219, 220, 245]. Es wurde auch beschrieben, dass Furin ADAM10 und ADAM17 aus ihrer Proform aktiviert [7, 245].

Die Protease Furin besteht aus:

- einer katalytischen Domäne, mit Aspartat-, Histidin- und Serinresten,
- einem Signalpeptid, das die Translokation des Proenzym in das Endoplasmatische Retikulum (ER) vermittelt,
- einer Prodomäne, welche für Proteinfaltung, Aktivierung, Transport und Regulierung zuständig ist,
- einer P-Domäne welche notwendig für die Enzymaktivität, die Anpassung an den pH-Wert und die Rekrutierung von Ca²⁺ als Cofaktor ist,
- einer zytoplasmatischen Domäne, welche die Lokalisierung und das Protein *Sorting* in den Recycling Loops bestimmt [245, 273].

Furin ist als Protease Ca²⁺-abhängig und ist innerhalb eines pH-Wert-Bereichs von 5 bis 8 aktiv [162, 245]. Die Furin-Schnittstelle befindet sich C-terminal von gepaarten basischen Aminosäuren (Beispielsweise: -Arg-Arg-II-, -Lys-Arg-II-) und benötigt zusätzlich einen Argininrest an der P4-Position [162, 163, 245, 249]. Die basische Aminosäure an der P2-Position ist nicht essenziell, steigert jedoch die Effizienz der Spaltung, sodass sich als Mindestanforderung die Sequenz -Arg-X-X-Arg-II- ergibt (Tabelle 8) [134, 162, 163, 245].

Tabelle 8: Furin Schnittstellen nach [162]

-Arg-X-X-Arg-Il-	Mindestanforderung Schnittsequenz
-Arg-X-Arg-Arg-Il- -Arg-X-Lys-Arg-Il-	Schnittsequenz
-Arg-X-X-X-Lys/Arg-Il-	Ausnahmeschnittsequenz

Das breite Spektrum der Furin-Substrate wird ermöglicht, da Furin in allen Geweben vorhanden ist und hier in drei unterschiedlichen Kompartimenten, dem TGN, den Endosomen und der Zellmembran, wirksam ist [162]. Die Lokalisation von Furin wird durch Sequenzen innerhalb der zytoplasmatischen Domäne bestimmt [162].

Furin-Transport-Modelle beinhalten zwei lokale Recycling Loops: der TGN Loop führt die Knospung von Furin durch und der Zelloberflächen/frühe Endosomen Loop übernimmt das Recycling in die Plasmamembran und die Internalisierung (Abbildung 6) [162]. Die Caseinkinase II (CKII) phosphoryliert Sequenzen (AC, acid cluster) im Bereich der zytoplasmatischen Domäne von Furin und ist hierdurch das entscheidende Enzym, um Furin in den Cycling Loops zu bewahren [162]. Der Wechsel zwischen den beiden Cycling Loops wird durch Dephosphorylierung der Sequenzen im Bereich der zytoplasmatischen Domäne von Furin durch die Phosphatase 2A (PP2A) vermittelt [162].

Im Rahmen des TGN Cycling Loops findet die Knospung von Vesikeln, die Furin enthalten, vom TGN zu post-TGN Endosomen statt und wird durch die Bindung von Tyrosin-basierten Motifs an *clathrin-coated pits* (CCP)-Adaptor Komplex AP-1 vermittelt [162]. Die Rückgewinnung von Furin von den post-TGN Endosomen zum TGN erfolgt AC-vermittelt. Sie ist abhängig vom Phosphorylierungsgrad und involviert das *phosphofurin acidic cluster sorting protein 1* (PACS-1) [162].

Im Rahmen des Zelloberflächen/Endosomen Cycling Loops findet das Recycling von Furin in den Endosomen zur Zelloberfläche statt, welches abhängig vom Phosphorylierungsgrad ist, sowie die Internalisierung von Furin in die Endosomen durch die Bindung von Tyrosin-basierten Motifs an CCP-Adaptor Komplex AP-2 [162].

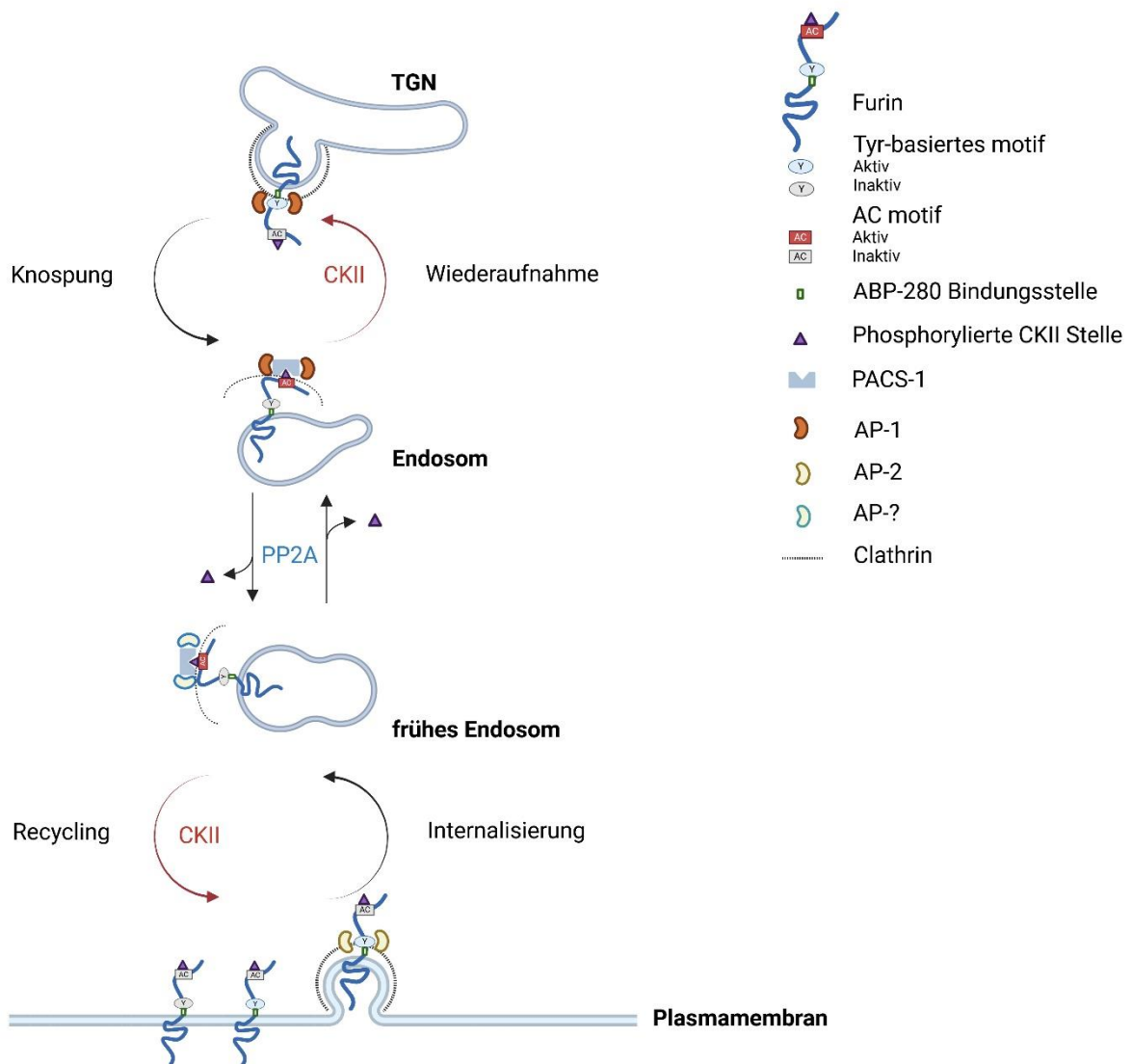


Abbildung 6: Furin Cycling Loops modifiziert nach [162, 164]. TNG/Endosom: Die Knospung von Furin aus dem TGN in das post-TGN endosomale Kompartiment wird durch die Bindung der Tyrosin-basierten CCP-Motive an das Clathrin-assoziierte Adaptor AP-1 vermittelt. Der acidic cluster (AC) ist während des Knospungsschritts inaktiv. Für die Wiederaufnahme in das TGN, verbindet PACS-1 die CKII-phosphorylierte AC mit Clathrin. Zelloberfläche/Endosom: Die Clathrin-abhängige Internalisierung von Furin auf der Zelloberfläche wird durch CCP-Motive vermittelt, an die AP-2 bindet. In den frühen Endosomen werden CKII-phosphorylierte Furin-Moleküle zurück zur Plasmamembran in einem PACS-1-abhängigen Schritt wiederverwendet. Zwischen den bi-cycling-Schleifen: Furin wird durch die Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert.

1.4.2 Furin in Thrombozyten

Leblond *et al.* berichtete 2018, dass Thrombozyten die Proproteinkonvertase Furin enthalten [139]. In Folge der Thrombozytenaktivierung wird Furin aktiviert und die Furin-Oberflächenexpression erhöht [138].

Furin ist assoziiert mit Organversagen bei Patienten mit erstem Atemstillstand durch eine SARS-Cov1 Infektion [138].

1.5 Zielsetzung der Dissertation

Die vorliegende Dissertation strebt an die Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung weitergehend zu untersuchen und daher den Einfluss von Hämin auf den Kollagenrezeptor GPVI und das Zusammenspiel mit verschiedenen Inhibitoren festzustellen.

Hierdurch sollen das aktuelle Wissen über die Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung erweitert und die grundlagenforschungs-bezogenen Erkenntnisse bezüglich der Bedeutung des Kollagenrezeptors GPVI bei Hämin-induzierter Thrombozytenaktivierung sowie den Beeinflussungsmöglichkeiten vorangebracht werden.

Derartige Forschungsergebnisse könnten zukünftig die Möglichkeit bieten, prothrombotische Zustände in Krankheiten mit umfangreicher Hämolyse besser einschätzen und gezielter behandeln zu können.

Zu diesem Zweck erfolgt in der nachfolgend dargestellten Studie eine Überprüfung der Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung mit Kontrolle der Beeinflussung des GPVI-Rezeptors *in vitro*.

Die Untersuchung einer Wirkung von Hämin auf Thrombozyten erfolgt anhand durchflusszytometrischer Beurteilung der Thrombozyten auf charakteristische Oberflächenrezeptoren. Im Rahmen weiterführender Versuche wird nach der initialen Bestätigung eines Hämin-abhängigen GPVI-Verhaltens eine weitere Aufschlüsselung des Mechanismus durch Immunblotting angestrebt sowie durch funktionelle Methoden wie der Aggregometrie und der *in vitro* Thrombusformation mögliche klinische Relevanz erforscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Folgende, in Tabelle 9 aufgeführten Geräte wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 9: Verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aqua-Dest. Gerät	Barnstead GenPure Pro	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Durchflusszytometer	BD FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ
Flusskammer	Flusskammer	Maastricht Instruments B.V., Maastricht, Niederlande
Hämatologiegerät	KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland
Kleinschüttler	IKA® MS3 basic IKA® VF2	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Lichtmikroskop	Nikon Eclipse Ti2-A	Ikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Lichttransmissions- Aggregometer	CHRONO-LOG Aggregometer 490-X	Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA
Magnetrührer	IKAMAG®RET-GS	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroplatten Reader	Glomax Multi Detection System	Promega Corporation, Fitchburg, WI, USA

Odyssey® Infrarot Scanner	Li-Cor Odyssey®	Li-Cor® Biosciences, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
pH-Meter	HI 9025 microcomputer pHmeter	HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Roller	RS-TR05 Assistent RM 5	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & CO KG, Assistent, Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Schüttler	IKA K2 260 basic	IKA Werke GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
SDS-PAGE Apparatur	XcellSure™Lock	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, USA
Sonifiziergerät	Sonopuls GM mini20	Bandelin electrojic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Stromversorgung – SDS-PAGE	PS 304 Electrophoresis Power Supply	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Stromversorgung – Wet-Blot	Bio-RAD PowerPac Basic	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort und compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	Sprout Minizentrifuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Western Blot Apparatur - West Blot	Bio-RAD MiniPROTEAN® Tetra Cell	Bio-RAD Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 1 s	Heraeus, Hanau, Deutschland

	Heraeus Multifuge 3S+	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Lösungen

Folgende, in Tabelle 10 aufgeführten Chemikalien und Lösungen wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien und Lösungen und deren Hersteller.

Reagent	Hersteller
ADP	Chrono-Log Corporation, Havertown, Pennsylvania, USA
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Applicem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
<i>collagen-related peptide</i> (CRP-XL)	CambCol Laboratories, Ely, UK
CX-4945	Adooq Bioscience LLC, Irvine, CA, USA
D-(+)-Glucose	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
DiOC ₆	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
<i>Doxycycline hyclate</i>	Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA
<i>Dubecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
<i>Dubecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) mit Ca ²⁺	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
EDTA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Fibrinogen aus humanem Plasma	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
Formaldehyd-Lösung 4%	Otto Fischar GmbH & Co. Kg, Saarbrücken, Deutschland

Fucoidan	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
GI254023X	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
GM6001	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
GPVI-Fc	Meinrad P. Gawaz
Hämin	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hexa-D-Arginin	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
Isopropanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Katacine	Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland
Kollagenreagens Horm	Takeda Pharmaceutical Company, Tokyo, Japan
Leupeptin Hemisulfat	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Mono-Natriumcitrat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin A	Carl Roth GmbH & Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland
PP2	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
<i>Precision Plus Protein Standards</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Protein Standard	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
PRT060318	MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA
Recombinantes humanes Furin	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA

Roti®-Block	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti®fair TBS 7,6	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SSM3 Trifluoroacetat	Tocris Bioscience, Bristol, UK
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	F. Hoffmann La Roche AG, Basel, Schweiz
Tris (Trizma (base))	Sigma Aldrich Co., St. Luis, CA, USA
Tween®20	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Zitronensäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA
2',7'-Dichlorfluoreszein-Diacetat (DCF DA)	Sigma Aldrich Co., St. Luis, Missouri, USA

2.1.3 Lösungen

Folgende, in Tabelle 11 aufgeführten Lösungen wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 11: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung.

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACD-Puffer	12,5 g 116 mM mono-Natriumcitrat 6,82 g 70 mM Zitronensäure 10 g 110 mM Glukose <i>Ad 500 ml Aqua dest.</i> Auf pH 4,69 (NaOH) einstellen, steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren
Annexin V-Puffer	2,381 g HEPES 10 nM 8,1816 g NaCl 140 mM 0,3676 g CaCl ₂ x 2H ₂ O <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>

	Mit NaOH 1 N auf pH 7,4, steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren
10x Blotpuffer	20 mM Trizma Base 150 mM Glycin <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>
1x Blotpuffer	100 ml 10x Blotpuffer 100 ml Methanol <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>
Ladepuffer (5x Lämmli)	6,5 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8 2 ml 10%iges SDS 1 ml Glycerin 1 Spatelspitze Bromphenolblau vor Gebrauch + 25 µl β- Mercaptoethanol
10x Laufpuffer	25 mM Trizma Base 192 mM Glycin 0,1% SDS <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>
1x Laufpuffer	100 ml 10x Laufpuffer <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,1 50 mM NaCl 1% Triton X 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS
1 M Tris-Puffer pH 6,8	12,21 g Trizma Base in 70 ml <i>Aqua dest.</i> lösen Mit HCl auf pH 6,8 <i>Ad 100 ml Aqua dest.</i>
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	45,4 g Trizma Base in 200 ml <i>Aqua dest.</i> lösen Mit HCl auf pH 8,8 <i>Ad 250 ml Aqua dest.</i>
TTBS	2 TTBS Tabletten

	1ml Tween®20 <i>Ad 1.000 ml Aqua dest.</i>
10x Tyrodes-Puffer	80 g 1,34 M NaCl 10,15 g 119 mM NaHCO ₃ 1,95 g 2,68 mM KCl <i>Ad 1.000 ml Aqua dest., steril filtrieren, bei 4 °C aufbewahren</i>
1x Tyrodes pH 7,4	10 ml 10x Tyrodes <i>Ad 100 ml Aqua dest.</i> 0,1 g BSA 0,1 g D-(+)-Glucose pH einstellen mit Hepes auf 7,4
1x Tyrodes pH 6,5	90 ml 1x Tyrodes pH 7,4 pH einstellen mit HCl auf 6,5
1x Tyrodes pH 7,4 modifiziert ohne BSA	10 ml 10x Tyrodes <i>Ad 100 ml Aqua dest.</i> 0,1 g D-(+)-Glucose pH einstellen mit Hepes auf 7,4 pH einstellen mit HCl auf 6,5
1x Tyrodes pH 6,5 modifiziert ohne BSA	90 ml 1x Tyrodes pH 7,4 modifiziert ohne BSA pH einstellen mit HCl auf 6,5

2.1.4 Gebrauchsgüter

Folgende, in Tabelle 12 aufgeführten Gebrauchsgüter wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 12: Gebrauchsgüter und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACS Tubes	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

15 ml Falcons	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
50 ml Falcons	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Glasküvette für Aggregometrie	Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA
Kanülen	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Membranadapter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Novex Plastikkassetten 1,5 mm	Novex by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
96-well Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
PVDF Membran	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Rührfische für Aggregometrie	Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA
Safety-Multifly	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
10 ml Spritzen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
20 ml Spritzen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper

Folgende, in Tabelle 13 aufgeführten primären Antikörper wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 13: Verwendete Primäre Antikörper und deren Hersteller.

Bezeichnung	Klon	Verwendung	Hersteller	Verdünnung
anti-Aktin	-	Immunoblot	Abcam, Cambridge, UK	1:1000

anti-CD42b PE	SZ2	Durchflusszytometrie	Beckman-Coulter, Brea, CA, USA	1:10
anti-CD62P PE	CLB-Thromb/6	Durchflusszytometrie	Beckman Coulter, Brea, CA, USA	1:10
anti-CLEC-2/CLEC-1B APC	219133	Durchflusszytometrie	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	1:10
anti-GPVI	1A5	Immunoblot	Meinrad P. Gawaz	1:10000
anti-GPVI FITC	4C9	Durchflusszytometrie	Meinrad P. Gawaz	1:10000
anti-human Furin 488	222722	Durchflusszytometrie	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	1:20
anti-phospho-Src (Tyr527)	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:750
anti-phospho-Zap-70 (Tyr319)/Syk (Tyr352)	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:1000
anti-PLCy2	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:750

anti-phospho-PLCy2 (Tyr1217)	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:750
anti- α -Tubulin	DMA1 α	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:10000
anti-Src (32G6)	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:750
anti-Syk (D3Z1E)	-	Immunoblot	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:1000
anti-PAC-1 FITC	PAC-1	Durchflusszytometrie	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA	1:10
Annexin V FITC	-	Durchflusszytometrie	ImmunoTools, Deutschland	1:10

Sekundäre Antikörper

Folgende, in Tabelle 14 aufgeführten sekundären Antikörper wurden im Rahmen der Versuche dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 14: Verwendete Sekundäre Antikörper und deren Hersteller.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Lösung
<i>Donkey anti-rabbit</i> IRDye 680RD	Immunoblot	Li-Cor Biosciences GmbH, Nebraska, USA	1:15000
<i>Goat anti-rat</i> IRDye 800CW	Immunoblot	Li-Cor Biosciences GmbH, Nebraska, USA	1:15000

2.1.6 Software

Folgende, in Tabelle 15 aufgeführte Software wurden im Rahmen dieser Dissertation verwendet.

Tabelle 15: Verwendete Software und deren Hersteller.

Bezeichnung	Hersteller
AggroLink 8	Chrono-Log Corp., Havertown, PA, USA
EndNote 20	Clarivate Analytics, London, UK
FACS Calibur Software	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FlowJo V.10.6.2	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
GraphPad Prism 9.1.2	Graphpad Prism Software, La Jolla, CA, USA
NIS-Elements AR 5.21.00	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande

2.2 Methoden

Die nachfolgend beschriebene und durchgeführte experimentelle Studie einschließlich der Isolation der Thrombozyten durch die Blutentnahme an gesunden Probanden ist von der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen geprüft und genehmigt (141/2018B02).

2.2.1 Isolation von Thrombozyten

Die humanen Thrombozyten, welche für die unten beschriebenen Versuche benötigt wurden, wurden aus *acid citrate dextrose* (ACD)-antikoagulierte Vollblut isoliert. Das venöse Vollblut entstammte freiwilligen und gesunden Probanden und wurde in einer 20 ml Spritze mit 4 ml aufgewärmtem ACD-Puffer abgenommen. Die Spritze wurde vorsichtig invertiert, je 10 ml in ein 15 ml Falcon überführt und für 20 min bei 206 xg bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die weitere Zentrifugation erfolgte abhängig von der angewendeten Methodik.

Für die Durchflusszytometrie, die Aggregometrie und die *in vitro* Thrombusformation wurde der hierbei entstandene Überstand – *platelet-rich-plasma* (PRP) – mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon mit 35 ml Tyrode-Hepes-Puffer pH 6,5 überführt. Dies wurde für 10 min bei 836 xg bei RT mit Bremse erneut zentrifugiert.

Für die Immunoblots wurde das abgesetzte PRP mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Falcon mit 35 ml modifiziertem Tyrode-Hepes-Puffer pH 6,5 ohne *bovine serum albumin* (BSA) überführt. Dies wurde für 10 min bei 836 xg bei RT mit Bremse erneut zentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Thrombozyten-Pellet in 250 µl Tyrode-Hepes-Puffer pH 7,4 resuspendiert. Für die Immunoblots wurde modifizierter Tyrode-Hepes-Puffer ohne BSA verwendet. Die Thrombozytenzahl wurde am Sysmex bestimmt und dann auf die benötigte Anzahl mit Tyrode-Hepes-Puffer pH 7,4 oder modifiziertem Tyrode-Hepes-Puffer pH 7,4 eingestellt.

Die Überführungs- und Resuspensionsschritte erfolgten sehr langsam und vorsichtig, um eine vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern.

2.2.2 Herstellung von Thrombozytenlysaten

Thrombozytenlysate wurden hergestellt, um den GPVI-Rezeptor und die Kinasen Syk, Src und PLC γ 2 nach unterschiedlichen Behandlungen durch Immunoblots nachzuweisen und darzustellen. Für jede Probe wurden $12,5 \times 10^7$ isolierte Thrombozyten in modifiziertem Tyrode-Hepes-Puffer pH 7,4 ohne BSA mit 1 mM CaCl $_2$ gelöst und unterschiedlich behandelt.

Für die Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung wurden die Thrombozyten mit 25 µM Hämin für 30 min, 60 min und 120 min bei RT inkubiert. Um die inhibitorischen Effekte von SSM3 zu erforschen, wurden die Thrombozyten, wenn indiziert, zunächst mit 25 µM SSM3 für 10 min präinkubiert, daraufhin folgte eine Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung, wie oben beschrieben.

Um die Eigenschaften von Furin zu erforschen, wurden die isolierten Thrombozyten mit 2 mM MgCl₂ und 200 ng/ml rekombinanten humanen Furin für 60 min bei 37° C inkubiert.

Den Proben wurde zur Lyse RIPA-Puffer mit 1:100 verdünntem Proteaseinhibitor Cocktail hinzugefügt und es erfolgte für 10 min eine Inkubation auf Eis. Anschließend erfolgte für insgesamt 60 s eine Ultraschallbehandlung bei 40 W, 0,5 s Puls mit Lagerung auf Eis alle 10 s. Die dabei entstandenen Zelltrümmer wurden für 5 min bei 2.500 xg bei 4 °C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und einer Bestimmung der Proteinkonzentration unterzogen.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch anhand eines Bradford-Assays. Hierzu wurden die hergestellten Lysate 1:10 verdünnt und mit dem Bradford-Reagenz vermischt. Im Glomax wurde dann die Verschiebung des Absorptionsspektrums von 470 nm zu 595 nm gemessen. Eine Proteinstandardkurve dient der quantitativen Berechnung des Proteingehalts der Lysate. Die Proteinbestimmung erfolgte für jede Probe in Doppelbestimmung.

2.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem molekularen Gewicht wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) verwendet.

Hierzu wurde jede Probe 1:4 mit 5x Ladepuffer mit β-Mercaptoethanol (Lämmli) verdünnt und durch Inkubation für 10 min bei 96 °C denaturiert. Durch die negative Ladung des Natriumdodecylsulfats wurde die Eigenladung der denaturierten Proteine überdeckt, was eine anschließende Auftrennung nach Größe durch elektrische Spannung ermöglicht. Daraufhin wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die verwendeten Polyacrylamidgele bestehen aus einem 5 %igen Sammelgel und einem 8 %igen Trenngel (Tabelle 16 und 17) und wurden für jeden Versuch frisch hergestellt.

Tabelle 16: Zusammensetzung 2x Sammelgel 5 %.

Substanzen	Volumen
Aqua dest.	6,8 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	1,25 ml
Acrylamid/bis-acrylamid (30 %)	1,70 ml
SDS 10 %	100 µl
APS 10 %	100 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 17: Zusammensetzung 2x Trenngel 8 %.

Substanzen	Volumen
Aqua dest.	9,30 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5,00 ml
Acrylamid/bis-acrylamid (30 %)	5,30 ml
SDS 10 %	200 µl
APS 10 %	160 µl
TEMED	20 µl

Im Sammelgel werden die Proteine der Probe zunächst fokussiert, bevor dann die Auftrennung nach molekularem Gewicht im Trenngel erfolgt. APS 10 % und TEMED dienen hierbei als Polymerisationsinitiator und wurden erst unmittelbar vor dem Gießen der Gele hinzugegeben. Zum Gießen des Gels wurden 1,5 mm dicke Plastikkassetten verwendet und nach Zusammenpipettieren der Chemikalien und vorsichtigem Mischen zunächst das Trenngel mit einer Pasteurpipette gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisationszeit wurde das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel mittels einer Pasteurpipette über das Trenngel geschichtet. Die Geltaschen wurden durch einen in diesem Schritt

eingefügten Kamm geformt. Die gegossenen Gele wurden über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer gelagert.

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden die Proben aufgetaut und kurz anzentrifugiert. Die Gekassetten wurden in eine Elektrophorese-Kammer eingebaut und nach Entfernen des Kamms wurden die Geltaschen mit 1x Laufpuffer gespült. Daraufhin wurden die Geltaschen mit 5 µl *Precision Plus Protein Standard* (Bio-Rad) oder 75 µg Protein der Proben befüllt. Damit die Proben in der Elektrophorese gerade laufen, wurden alle Geltaschen mit 1x Ladepuffer auf das gleiche Volumen aufgefüllt. Die Elektrophorese-Kammer wurde für etwa 30 min an eine Spannung von 80 V angelegt. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde für circa 90 min die Spannung auf 120 V erhöht, bis die Proben die Lauffront vollständig durchlaufen haben.

2.2.5 Proteinnachweis durch Immunoblot-Analyse

Durch Immunoblot-Analyse werden die durch eine SDS-Page aufgetrennten Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert und durch eine chemolumineszente Enzymreaktion sichtbar gemacht. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Immunoblots wurden in der *Wet-Blot*-Technik angefertigt. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde für 5 min in Methanol äquilibriert. Anschließend wurde von der Anode zur Kathode ohne Luftabschluss zuerst ein Filter, dann die Membran, daraufhin das Gel und zuletzt erneut ein Filter gestapelt. Hierdurch wanderten die Proteine beim Anlegen von Spannung vom Gel zur Membran in Richtung Anode. Hierzu wurden die Proteine unter Kühlung durch einen Kühlakku für 65 min (GPVI, sGPVI, Syk, Src) bis zu 70 min (PLCy2) bei 100 V auf die Membran transferiert.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen für 60 min auf dem Rotationsschüttler bei RT in 5% BSA in *Tris-Tween-Buffered-Solution* (TTBS) blockiert. Daraufhin wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht auf einem Rollschüttler mit dem entsprechenden primären Antikörper gelöst und entsprechend der Konzentrationsangabe verdünnt in 3% BSA-TTBS inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TTBS wurde der entsprechende farbstoffmarkierte sekundäre Antikörper (LI-COR IRDye) 1:15.000 in 3% BSA in TTBS verdünnt, dieser auf die Membranen gegeben und für 90 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen erneut dreimalig mit

10 ml TTBS gewaschen und daraufhin für 240 min zwischen zwei Filterpapieren im Dunkeln vollständig getrocknet. Die durch Antikörper markierten Proteine wurden daraufhin im LICOR Odyssey detektiert und analysiert.

Ladekontrolle

Zur Kontrolle der beladenen Proteinmenge für die spätere statistische Analyse erfolgte eine Ladekontrolle mittels Aktin oder Tubulin. Hierzu wurden die Membranen 30 min in TTBS rehydriert und anschließend zweimal mit 10 ml TTBS gewaschen. Primärer Antikörper gegen Aktin wurde 1:1.000 oder gegen Tubulin 1:10.000 in 3% BSA in TTBS verdünnt, auf die Membranen gegeben und bei 4 °C über Nacht auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TTBS wurde der entsprechende farbstoffmarkierte infrarote sekundäre Antikörper (LI-COR IRDye) 1:15.000 in 3% BSA in TTBS verdünnt, dieser auf die Membranen gegeben und für 90 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen erneut dreimalig mit 10 ml TTBS gewaschen und daraufhin für 240 min zwischen zwei Filterpapieren im Dunkeln getrocknet. Die durch Antikörper markierten Proteine wurden daraufhin im LICOR Odyssey detektiert und zur statistischen Auswertung mit der Proteinmenge verrechnet.

2.2.6 Durchflusszytometrie humaner Thrombozyten

Die durchflusszytometrische Messung erfolgte für sämtliche Versuchsdurchführungen am Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson. Für die anschließende Analyse der gesammelten Rohdaten wurde die FlowJo Software V.10.6.2. eingesetzt.

Für jede Probe wurden 1×10^6 isolierte Thrombozyten mit *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS), welches 0,5 mM $MgCl_2$ und 0,9 mM $CaCl_2$ beinhaltet, und einem fluoreszenzmarkierten Primärantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Verwendete Primärantikörper waren hierbei anti-CD42b PE, anti-CD62P PE, anti-CLEC-2/CLEC-1B APC, anti-GPVI FITC, anti-Furin 488, anti-Annexin V FITC. Die ROS-Produktion wurde durch den Farbstoff 2',7'-Dichlorfluoreszein-Diacetat (DCF DA) bestimmt.

Wo indiziert, wurden die isolierten Thrombozyten zunächst für 5 bis zu 30 min mit einem Proteaseinhibitor vorinkubiert. Verwendete Proteaseinhibitoren mit entsprechenden Konzentrationen waren hier: 5 min Präinkubation: 20 μ M PP2, 20 μ M PRT060318; 10 min Präinkubation: Proteaseinhibitor Cocktail 5871S 1:100, 1 μ M Leupeptin Hemisulfat, 1 μ M Pepstatin A, 50 μ g/ml Doxycyclin, 5 μ M CX-4945, 25 μ M SSM3 trifluoroacetate, 25 μ M Hexa-D-Arginin und 25 μ M TAPI-0; 30 min Präinkubation; 100 μ M GM6001, 10 μ M GI254023X.

Die Aktivierung von isolierten Thrombozyten erfolgte mit den Stimuli Hämin, CRP-XL, Thrombin und ADP zeitgleich zur Inkubation mit PBS und fluoreszierendem Primärantikörper für 30 min bei RT im Dunkeln. Die verwendeten Hämin Konzentrationen betragen von 1,5 bis 50 μ M. Die verwendeten CRP-XL Konzentrationen betragen von 1,5 bis 50 μ g/ml. Die verwendeten Thrombin-Konzentrationen betragen von 0,25 bis 1 U/ml. Die verwendeten ADP-Konzentrationen betragen von 5 bis 20 μ M.

Nach dem Inkubationsintervall wurden die Proben mit 0,5 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und eine Messung am FACSCalibur durchgeführt. Bei Versuchen mit ROS und TMRE wurde die Thrombozytenaktivierung mit PBS gestoppt, bei Versuchen mit Annexin V wurde die Thrombozytenaktivierung mit Annexin V-Puffer gestoppt und es erfolgte eine direkte Messung am FACSCalibur.

2.2.7 *In vitro* Thrombusformation (Flusskammer)

Die Messung der *in vitro* Thrombusformation erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse Ti2-A mithilfe einer Flusskammer. Für die anschließende Analyse der gesammelten Rohdaten wurde die NIS-Elements AR Software eingesetzt.

Die Versuche zur Messung der Thrombusformation durch Verwendung der Flusskammer sowie die hierzu erfolgte Probenherstellung und Analyse erfolgte durch Dr. M. Kremser und wird lediglich zum besseren und vollständigeren Verständnis der Daten hier aufgeführt.

Deckgläser wurden mit 100 μ g/ml Kollagenlösung beschichtet und für 2 Stunden bei RT inkubiert oder über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Um unspezifische molekulare Bindungen an das Kollagen zu verhindern, wurden die Deckgläser in 1% BSA in PBS blockiert. Für jede Probe wurden isolierte Thrombozyten 4:5 mit PBS mit Ca^{2+} verdünnt

und daraufhin für 10 min mit 0,5 μM des Fluorochroms 3,3'-*Dihexyloxacarbo-cyanine iodine* (DiOC_6) inkubiert. Um inhibitorische Effekte zu erforschen, wurden, wo indiziert, die Proben mit 25 μM SSM3 für 10 min oder mit 10 μM PP2 für 5 min präinkubiert. Nach Zugabe von 1 mM CaCl_2 wurde, wo indiziert, 6,25 μM Hämin hinzugegeben, die Flusskammer zusammengebaut und die Perfusion bei einer Flussrate von 500 s^{-1} durchgeführt. Die Flusskammer wurde nach erfolgter Perfusion mit PBS gespült, um nicht adhäsive Rückstände auszuwaschen. Pro Probe wurden Bilder in vier bis fünf unabhängigen Arealen angefertigt.

Als Abweichung vom Standardprotokoll wurden statt Vollblut isolierte Thrombozyten verwendet, um das Binden und damit Neutralisieren von Hämin durch die Plasmaproteine Haptoglobin, Hemopexin und Albumin zu verhindern [13, 22, 108, 177].

2.2.8 Lichttransmissionsaggregometrie

Die aggregometrische Messung erfolgte für sämtliche Versuchsdurchführungen am Lichttransmissionsaggregometer 490 X der Firma Chrono-Log Corp.. Für die anschließende Analyse der gesammelten Rohdaten wurde die AggroLink8 Software eingesetzt.

Für jede Probe wurden 4×10^7 isolierte Thrombozyten mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibrinogen, 2 mM CaCl_2 und 0,5 mM MgCl_2 bei 37 °C in einer Glasküvette mit Rührfisch inkubiert. Wo indiziert, wurden die isolierten Thrombozyten zuvor mit SSM3, in Konzentrationen von 6,25 μM bis 25 μM , oder 1 μM Leupeptin für 10 min oder alternativ mit 20 μM PP2 oder 20 μM PRT060318 für 5 min bei 37 °C präinkubiert.

Nach Kalibrierung wurde als Aggregationsstimulus entweder 25 μM Hämin oder 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL hinzugegeben und daraufhin für 7 min bei 37 °C und 1.000 rpm die Aggregation gemessen. Das Maß der Aggregation wurde anhand der prozentualen Veränderung der ursprünglich durchgelassenen Lichtmenge im Vergleich zur Lichtmenge nach Hinzufügen des Aggregationsstimulus berechnet.

2.2.9 Statistik

Die im Rahmen der Versuche erhobenen Daten werden nachfolgend als arithmetischer Mittelwert \pm Standardabweichung (S.D.) wiedergegeben. Deren

statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung der Statistiksoftware GraphPad Prism der Firma GraphPad Software Inc.. Die Daten der Versuche wurden jeweils komplett und ohne die Anwendung von Ein- oder Ausschlusskriterien analysiert. Die statistische Auswertung mehrerer (>2) unabhängiger Gruppen wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) oder einer *mixed-effects* Analyse mit einem Tukey's Test, Dunnett's Mehrfachvergleichstest oder Šidak's Mehrfachvergleichstest als Post-hoc-Test durchgeführt. Für die Signifikanzanalyse zweier unabhängiger Gruppen wurde ein gepaarter oder ungepaarter t-Test, je nach experimentellem Aufbau, herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde als * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$ definiert. n gibt die Anzahl der durchgeführten Versuche mit Thrombozyten von unterschiedlichen Probanden innerhalb einer Untersuchung an.

3 Ergebnisse

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der Publikation veröffentlicht: *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI* [66].

3.1 Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung, Aggregation und *in vitro* Thrombusformation vom ITAM-Signalweg abwärts von GPVI und CLEC-2

3.1.1 Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung

Um den Einfluss von Hämin im Vergleich zu klassischen Agonisten wie CRP-XL auf Thrombozyten zu untersuchen, wurden zunächst Durchflusszytometrieexperimente mit ruhenden und aktivierten Thrombozyten durchgeführt. Nach Inkubation mit den aktivierenden Agonisten 6,25 μ M Hämin und 1 μ g/ml CRP-XL, erfolgte eine Färbung der Thrombozyten mit Antikörpern gegen P-Selektin, GPVI, GPIb und GPIIb/IIIa, um deren Oberflächenexpression zu detektieren.

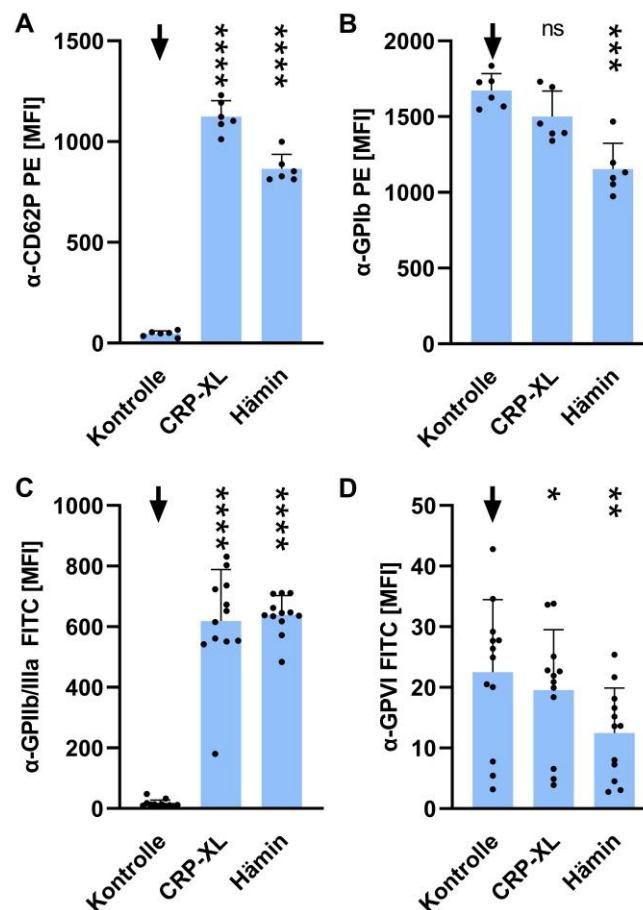


Abbildung 7: Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung. Statistische Analyse der Oberflächenexpression verschiedener Rezeptoren auf Thrombozyten nach Stimulation mit 6,25 μ M Hämin oder 1 μ g/ml CRP-XL im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten (Kontrolle). **A** Als Antikörper wurde α -CD62P PE verwendet, welcher die Degranulation der α -Granula widerspiegelt (n=6). **B** Als Antikörper wurde α -GPIb PE verwendet (n=6). **C** Als Antikörper wurde α -GPIIb/IIIa FITC, welcher als Aktivierungsmarker dient, da der Antikörper nur an die aktivierte Form des GPIIb/IIIa binden kann. (n=12). **D** Als Antikörper wurde α -GPVI FITC verwendet (n=12). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Sowohl Hämin (Kontrolle versus Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 46,42 \pm 14,61 % vs. 865,7 \pm 71,24 %, $p < 0,0001$) als auch CRP-XL (Kontrolle versus CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 46,42 \pm 14,61 % vs. 1.125 \pm 78,18 %, $p < 0,0001$) führen zu einer signifikant erhöhten P-Selektin Oberflächenexpression im Vergleich zur Kontrolle, da es durch Aktivierung zur Degranulation der α -Granula kommt (Abbildung 7A). Hämin (Kontrolle versus Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 16,49 \pm 11,84 % vs. 639 \pm 63,98 %, $p < 0,0001$) und CRP-XL (Kontrolle versus CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 16,49 \pm 11,84 % vs. 618,5 \pm 170 %, $p < 0,0001$) führten ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression des GPIIb/IIIa Rezeptors (Abbildung 7B). Hierbei dient der Antikörper α -GPIIb/IIIa FITC als Aktivierungsmarker, da dieser nur an die aktivierte Form des Rezeptors GPIIb/IIIa binden kann. Im Gegensatz hierzu führt Hämin, jedoch nicht CRP-XL zu einer signifikanten Verminderung der Oberflächenexpression von GPIb (Kontrolle versus Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.673 \pm 111,7 % vs. 1.154 \pm 171,1 %, $p = 0,0007$; Kontrolle versus CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.673 \pm 111,7 % vs. 1.501 \pm 169,1 %, $p = 0,08$) (Abbildung 7C). Sowohl Hämin als auch CRP-XL lösen eine signifikante Verminderung der GPVI Oberflächenexpression aus (Kontrolle versus Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 22,53 \pm 11,95 % vs. 12,5 \pm 7,41 %, $p = 0,005$; Kontrolle versus CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 22,53 \pm 11,95 % vs. 19,55 \pm 9,95 %, $p = 0,03$) (Abbildung 7D).

3.1.2 Hämin-induzierte Thrombozytenaggregation

Um die funktionellen Aspekte von Hämin auf Thrombozyten zu bestimmen, wurde die Lichttransmissionsaggregation von isolierten Thrombozyten nach Aktivierung mit Hämin und CRP-XL bestimmt. Isolierte Thrombozyten wurden mit 2 mM CaCl_2 und

100 µg/ml Fibrinogen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 25 µM Hämin oder 1 µg/ml CRP-XL aktiviert und die Aggregation für 7 min gemessen. Hämin führte zu einer starken Aggregation der Thrombozyten von $81,24 \pm 5,7$ % (arithmetischer Mittelwert \pm S.D.). CRP-XL führte ebenfalls zu einer Aggregation der Thrombozyten von $68,1 \pm 16,8$ % (arithmetischer Mittelwert \pm S.D.).

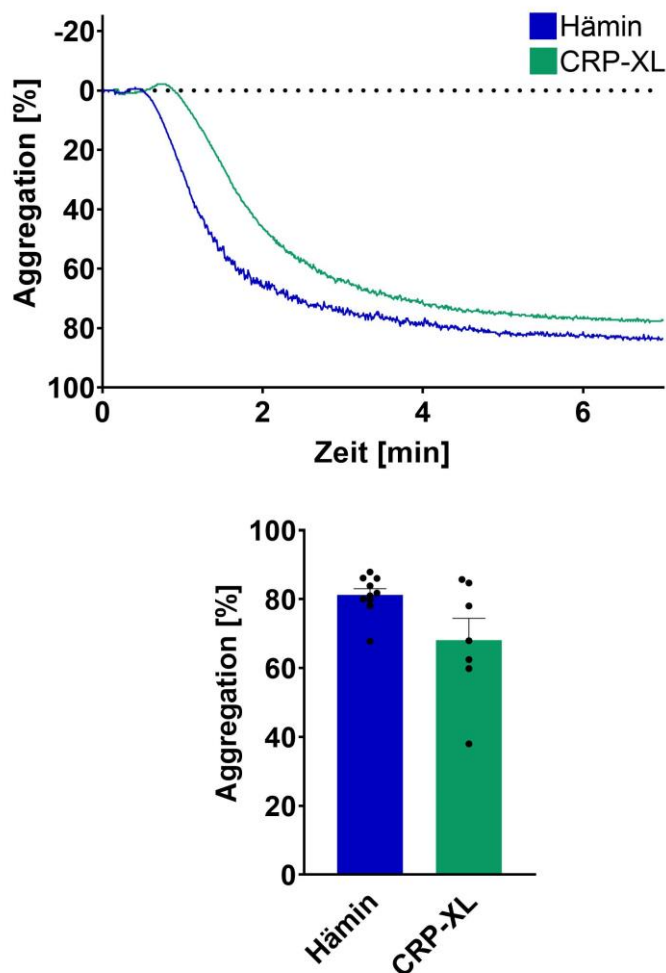


Abbildung 8: Hämin-induzierte Aggregation von Thrombozyten. Obere Reihe Repräsentative Hämin- und CRP-XL-induzierte Thrombozytenaggregationskurve. Die Proben wurden aus isolierten Thrombozyten, Fibrinogen und Kalzium hergestellt. Als Häminkonzentration wurde 25 µM, als CRP-XL-Konzentration 1 µg/ml verwendet. **Untere Reihe** Statistische Analyse der Hämin- und CRP-XL-induzierten Thrombozytenaggregation. Details: $n \geq 7$; Dargestellt: Mittelwert \pm S.D..

3.1.3 Hämin-induzierte *in vitro* Thrombusformation

Der folgende Versuch wurde durch Dr. M. Kremser durchgeführt.

Um weitere funktionelle Aspekte von Hämin auf Thrombozyten zu bestimmen, erfolgte die Perfusion von isolierten Thrombozyten auf immobilisiertem Kollagen und die *in vitro* Thrombusformation wurde bei Scherraten von 500 s^{-1} durch Mikroskopie visualisiert und bestimmt. Den isolierten Thrombozyten wurde CaCl_2 hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben mit Hämin in den Konzentrationen $1,56 \mu\text{M}$ bis $12,5 \mu\text{M}$ aktiviert. Die Aufnahmen zeigen die repräsentative *in vitro* Thrombusformation.

Auf Kontrollniveau sind vereinzelte, kleine Thromben sichtbar. Dies nimmt durch Zugabe von Hämin in steigenden Konzentrationen stetig zu. Bereits $1,56 \mu\text{M}$ Hämin zeigt vereinzelte größere Thromben, bei $3,1 \mu\text{M}$ sind bereits mehrere Aggregatformationen der Thrombozyten sichtbar. Die beiden höchsten Häminkonzentrationen ($6,25$ und $12,5 \mu\text{M}$) führen zu einer ausgeprägten, großflächigen Thrombenbildung. Statistisch induzierte Hämin in den Konzentrationen $6,25 \mu\text{M}$ und $12,5 \mu\text{M}$ im Vergleich zu der Kontrolle ohne Hämin eine signifikant erhöhte Thrombusformation (Kontrolle versus $6,25 \mu\text{M}$ Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $1,15 \pm 0,31 \%$ vs. $31,1 \pm 11,6 \%$, $p=0,035$; Kontrolle versus $12,5 \mu\text{M}$ Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $1,15 \pm 0,31 \%$ vs. $29,98 \pm 7,57 \%$, $p=0,011$).

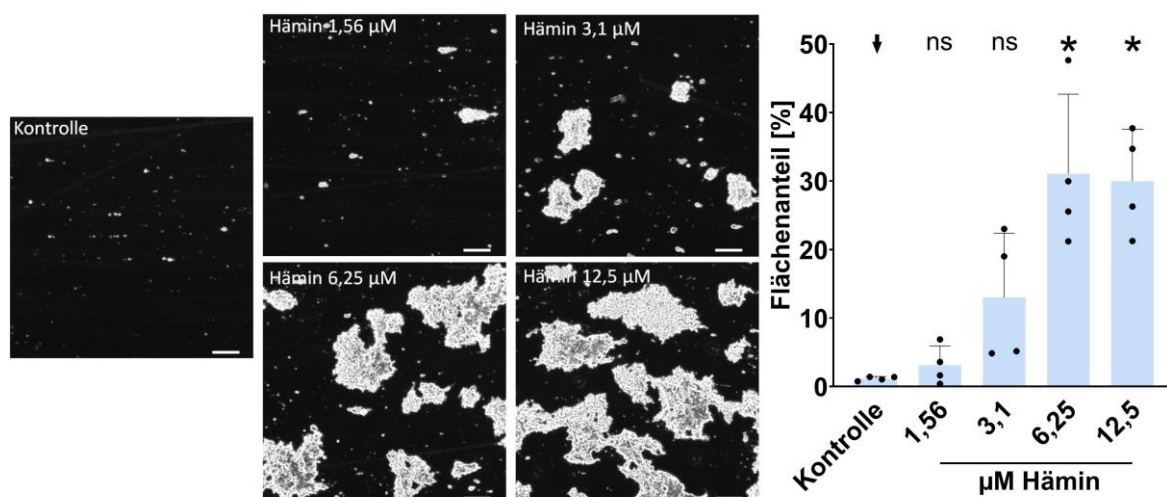


Abbildung 9: Hämin-induzierte Thrombusformation *in vitro*. Links Repräsentative Aufnahmen der Thrombusformation durchgeführt mit isolierten Thrombozyten. Die Proben wurden mit $1,56 \mu\text{M}$ bis $12,5 \mu\text{M}$ Hämin aktiviert. Skala: $100 \mu\text{M}$ Rechts Statistische Analyse der Thrombusformation ($n=4$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA, Dunnett's

Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle ↓; ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$.

3.1.4 Hämin-induzierte Änderung des Phosphorylierungsgrades von Syk und PLC γ 2

Um den Signalweg der Hämin-induzierten Aktivierung zu bestimmen, wurden Immunoblots angefertigt bezüglich der Fragestellung, ob Hämin zur Phosphorylierung von den Kinasen Syk und PLC γ 2 führt und somit eine Aktivierung des ITAM-Signalwegs von GPVI und CLEC-2 vorliegt. Hierzu wurden Lysate aus isolierten Thrombozyten, aktiviert mit Hämin für 2,5 min in den Konzentrationen 3,1 μ M und 25 μ M, hergestellt. Für die Herstellung der Immunoblots wurden Tyrosin-Phosphorylierung-spezifische monoklonale Antikörper pSyk Y352 / Syk und PLC γ 2 Y1217 / PLC γ 2 verwendet. Diese detektieren eine Phosphorylierung an der Tyrosinposition 352 und 1.217. Hämin phosphoryliert Syk und PLC γ 2 konzentrationsabhängig, was indiziert, dass die ITAM-Signalkaskade von GPVI und CLEC-2 durch Hämin aktiviert wird. Bereits eine Konzentration von 3,1 μ M führt zur Phosphorylierung von sowohl Syk als auch PLC γ 2, eine Erhöhung der Hämin-Konzentration auf 25 μ M führt zur weiteren zur Verstärkung der Phosphorylierung von Syk und PLC γ 2. Die gezeigte Hämin-induzierte Phosphorylierung der Kinasen Syk und PLC γ 2 lässt somit auf eine Hämin-abhängige Aktivierung des ITAM-Signalweges abwärts von GPVI und CLEC-2 schließen.

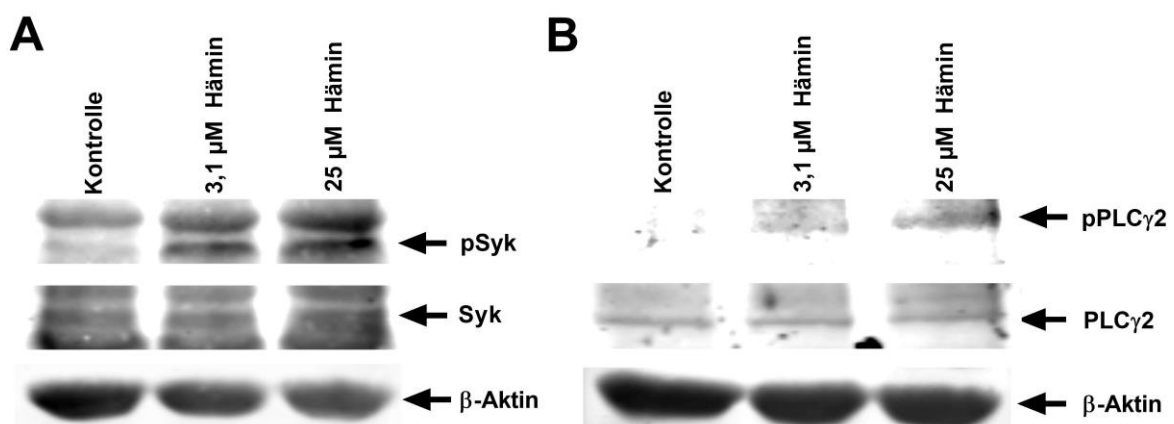


Abbildung 10: Hämin-induzierte Änderung des Phosphorylierungsgrads von Syk und PLC γ 2. A Repräsentativer Immunoblot, der die Hämin-induzierte Änderung der Phosphorylierung von Syk darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 2,5 min mit 3,1 μ M oder 25 μ M μ M Hämin inkubiert wurden,

hergestellt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **B** Repräsentativer Immunoblot, der die Hämin-induzierte Änderung der Phosphorylierung von PLC γ 2 darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 2,5 min mit 3,1 μ M oder 25 μ M μ M Hämin inkubiert wurden, hergestellt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Details: n=4.

3.1.5 Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombozytenaggregation von Syk und Src

Um die Relevanz der Kinasen Syk und Src und somit des ITAM-Signalwegs von GPVI und CLEC-2 auf die Hämin-induzierte Aggregation von Thrombozyten zu bestimmen, wurde die Lichttransmissionsaggregation von isolierten Thrombozyten bestimmt. Isolierte Thrombozyten wurden für 5 min entweder mit dem Src-Inhibitor PP2, in der Konzentration 20 μ M, oder mit dem Syk-Inhibitor PRT060318, in der Konzentration 20 μ M, inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 25 μ M Hämin und 1 μ g/ml CRP-XL aktiviert und die Aggregation für 7 min gemessen. Hämin als Kontrolle führte zu einer starken Aggregation der Thrombozyten von $79,93 \pm 6,93$ % (arithmetischer Mittelwert \pm S.D.). Diese Aggregation konnte durch Behandlung mit sowohl PP2 als auch PRT060318 signifikant reduziert werden (Kontrolle versus PP2: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $79,93 \pm 6,93$ % vs. $0,68 \pm 0,35$ %, $p=0,001$; Kontrolle versus PRT060318: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $79,93 \pm 6,93$ % vs. $2,07 \pm 1,68$ %, $p=0,0002$). CRP-XL als Kontrolle führte zu einer Aggregation der Thrombozyten von $70,98 \pm 14,19$ % (arithmetischer Mittelwert \pm S.D.). Diese Aggregation konnte ebenfalls durch Behandlung mit sowohl PP2 als auch PRT060318 signifikant reduziert werden (Kontrolle versus PP2: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $70,98 \pm 14,19$ % vs. $6,71 \pm 4,74$ %, $p=0,002$; Kontrolle versus PRT060318: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $70,98 \pm 14,19$ % vs. $2,9 \pm 1,38$ %, $p=0,01$). Um eine Beeinflussung des Lösungsmittels DMSO der Inhibitoren PP2 und PRT060318 auszuschließen, erfolgte eine Lösungsmittelkontrolle (Kontrolle versus PP2: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $79,93 \pm 6,93$ % vs. $82,93 \pm 4,2$ %, $p=0,37$). Die vollständige Hemmung der Hämin-induzierten Aggregation durch PP2 und PRT060318 lässt somit auf eine Korrelation der Hämin-abhängigen Aggregation und des ITAM-Signalweges abwärts von GPVI und CLEC-2 schließen.

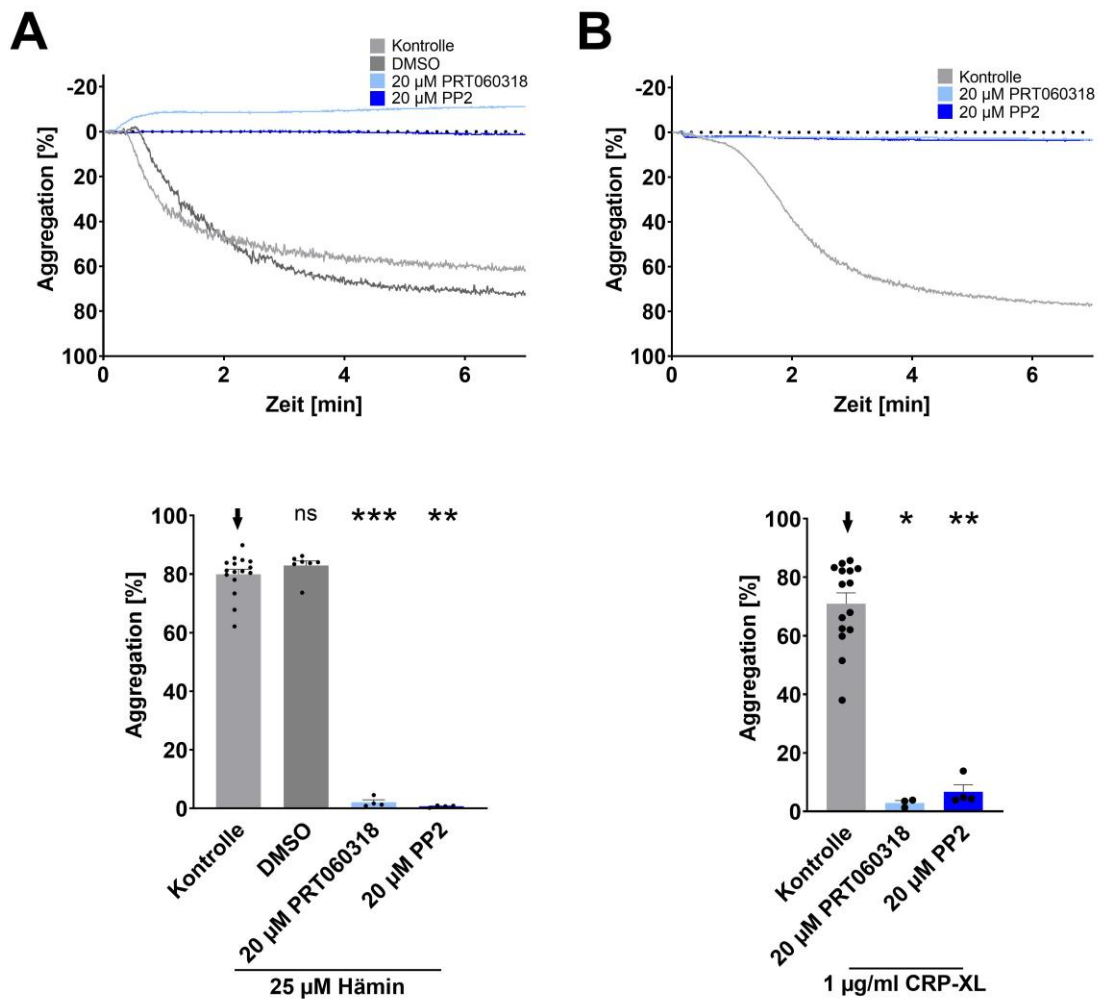


Abbildung 11: Beeinflussung der Häm-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Syk und Src. **A Obere Reihe** Repräsentative Häm-induzierte Thrombozytenaggregationskurve. Die Proben wurden aus isolierten Thrombozyten, Fibrinogen und Ca^{2+} hergestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden für 5 min entweder mit 20 μ M PP2 (Src-Inhibitor) oder mit 20 μ M PRT060318 (Syk-Inhibitor) vorinkubiert. Als Häminkonzentration wurde 25 μ M verwendet ($n \geq 4$). **Untere Reihe** Statistische Analyse der Häm-induzierten Thrombozytenaggregation ($n \geq 4$). **B Obere Reihe** Repräsentative CRP-XL-induzierte Thrombozytenaggregationskurve. Die Proben wurden aus isolierten Thrombozyten, Fibrinogen und Ca^{2+} hergestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden für 5 min entweder mit 20 μ M PP2 (Src-Inhibitor) oder mit 20 μ M PRT060318 (Syk-Inhibitor) vorinkubiert. Als CRP-XL-konzentration wurde 1 μ g/ml verwendet ($n \geq 3$). **Untere Reihe** Statistische Analyse der CRP-XL-induzierten Thrombozytenaggregation ($n \geq 3$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: Mixed-effects Analyse, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.6 Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombusformation *in vitro* von Src

Der folgende Versuch wurde durch Dr. M. Kremser durchgeführt.

Um die Relevanz von Src und somit des ITAM-Signalwegs von GPVI auf die Hämin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten zu bestimmen, erfolgte die Perfusion von isolierten Thrombozyten auf immobilisiertem Kollagen und die *in vitro* Thrombusformation bei Scherraten von 500 s^{-1} wurde durch Mikroskopie visualisiert und bestimmt. Den isolierten Thrombozyten wurde CaCl_2 hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben mit $6,25\text{ }\mu\text{M}$ Hämin aktiviert und, wenn indiziert, mit $10\text{ }\mu\text{M}$ PP2 für 5 min vorinkubiert.

Die Aufnahmen zeigen die *in vitro* Thrombusformation. Auf Kontrollniveau sind vereinzelte, kleine Thromben sichtbar. Dies nimmt durch Zugabe von $6,25\text{ }\mu\text{M}$ Hämin deutlich zu. Man sieht eine ausgeprägte, großflächige Thrombenbildung. Die Zugabe vom Src-Inhibitor PP2 reduziert die Thrombenbildung fast vollständig. Statistisch induzierte Hämin im Vergleich zur Kontrolle ohne Hämin eine erhöhte Thrombusformation (Kontrolle versus $6,25\text{ }\mu\text{M}$ Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $1,15\pm 0,31\%$ vs. $31,1\pm 11,6\%$, $p=0,041$). Hemmung von Src durch PP2 reduzierte die Hämin-induzierte Thrombusformation signifikant ($6,25\text{ }\mu\text{M}$ Hämin versus $6,25\text{ }\mu\text{M}$ Hämin + PP2: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $31,1\pm 11,6\%$ vs. $0,53\pm 0,13\%$, $p=0,039$). Als Versuchskontrolle wurden isolierte Thrombozyten mit $10\text{ }\mu\text{M}$ PP2 für 5 min inkubiert. Dies führte ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der *in vitro* Thrombusformation im Vergleich zu den isolierten Thrombozyten (Kontrolle versus PP2: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $1,15\pm 0,31\%$ vs. $0,35\pm 0,07\%$, $p=0,02$). Da sich die Hämin-abhängige Thrombusformation durch den Src-Inhibitor PP2 vollständig hemmen lässt, deutet dies auch hier auf eine Abhängigkeit der *in vitro* Thrombusformation vom ITAM-Signalweg abwärts von GPVI und CLEC-2 hin.

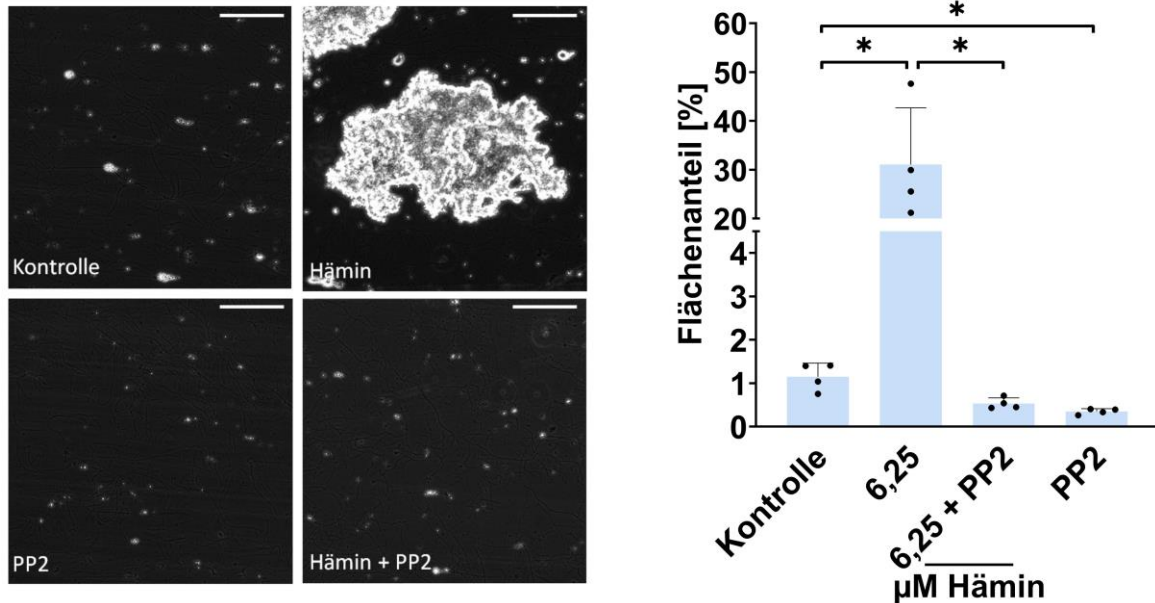


Abbildung 12: Beeinflussung der Hämin-induzierten Thrombusformation durch Src in vitro. Links Repräsentative Aufnahmen der Thrombusformation durchgeführt mit isolierten Thrombozyten. Die Proben wurden behandelt mit 6,25 µM Hämin und vorinkubiert für 5 min mit 10 µM PP2. Skala: 100 µM Rechts Statistische Analyse der Thrombusformation (n=4). Details: Dargestellt: Mittelwert ± S.D.; Statistik: one-way ANOVA, Šidak's Mehrfachvergleichstest; * p<0,05.

3.2 Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI

3.2.1 Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Oberflächenexpression von P-Selektin, GPIb und GPVI

Um den Effekt von Hämin und CRP-XL auf die Thrombozytenaktivierung zu untersuchen, wurden im Anschluss verschiedene Konzentrationen der beiden aktivierenden Agonisten verwendet und die Oberflächenexpression von P-Selektin, GPVI und GPIb anhand der Durchflusszytometrie gemessen. Bei Häminstimulation nahm die P-Selektin Oberflächenexpression in niedrigen Häminkonzentrationen zunächst signifikant zu (Kontrolle versus 3,1 µM Hämin: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 102,1±64,87 % vs. 675,9±162,3 %, p=0,0098). In höheren Häminkonzentrationen war die P-Selektin Oberflächenexpression jedoch signifikant herabgesetzt (3,1 µM Hämin versus 25 µM Hämin: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 675,9±162,3 %, vs. 36,9±14,96, p=0,002). Bei der CRP-XL-Stimulation nahm die P-Selektin-Oberflächenexpression konzentrationsunabhängig zu (Kontrolle versus 1,6 µg/ml CRP-XL: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 145,5±109,2 % vs. 849,5±76,8 %, p=0,02; Kontrolle versus 25 µg/ml CRP-XL: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 145,5±109,2 % vs. 808,8±94,42 %, p=0,04) (Abbildung 13A).

Auf die Stimulation mit Hämin blieb die GPVI-Oberflächenexpression in niedrigen Konzentrationen zunächst unverändert (Kontrolle versus 3,1 μ M Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 28,44 \pm 6,34 % vs. 28,15 \pm 6,19 %, $p=0,9$), wohingegen in höheren Häminkonzentrationen, parallel zu P-Selektin, die GPVI-Oberflächenexpression signifikant verringert war (Kontrolle versus 25 μ M Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 28,44 \pm 6,34 % vs. 2,69 \pm 0,31 %, $p<0,0001$). Bei CRP-XL-Stimulation blieb die GPVI Oberflächenexpression konzentrationsunabhängig unverändert im Vergleich zur Kontrolle. (Kontrolle versus 1,6 μ g/ml CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 30,85 \pm 6,67 % vs. 33,63 \pm 5,09, $p=0,4$; Kontrolle versus 25 μ M: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 30,85 \pm 6,67 % vs. 28,55 \pm 6,21, $p=0,7$) (Abbildung 13B).

Bei der Häminstimulation nahm die GPIb-Oberflächenexpression mit steigender Häminkonzentration signifikant ab (Kontrolle versus 6,25 μ M Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.656 \pm 108,4 % vs. 1.206 \pm 103,5 %, $p=0,01$; Kontrolle versus 25 μ M Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.656 \pm 108,4 % vs. 905 \pm 216,4 %, $p=0,003$). Bei CRP-XL-Stimulation nahm die GPIb-Oberflächenexpression ebenfalls konzentrationsunabhängig ab (Kontrolle versus 1,6 μ g/ml CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.642 \pm 151,9 % vs. 1.584 \pm 68,32 %, $p=0,99$; Kontrolle versus 25 μ g/ml CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1.642 \pm 151,9 % vs. 1.383 \pm 148,4 %, $p=0,04$) (Abbildung 13C).

Die Häminstimulation führte somit in hohen Konzentrationen ($>6,25$ μ M) bei allen drei Rezeptoren, P-Selektin, GPVI und GPIb, zu einem Verlust der Oberflächenexpression.

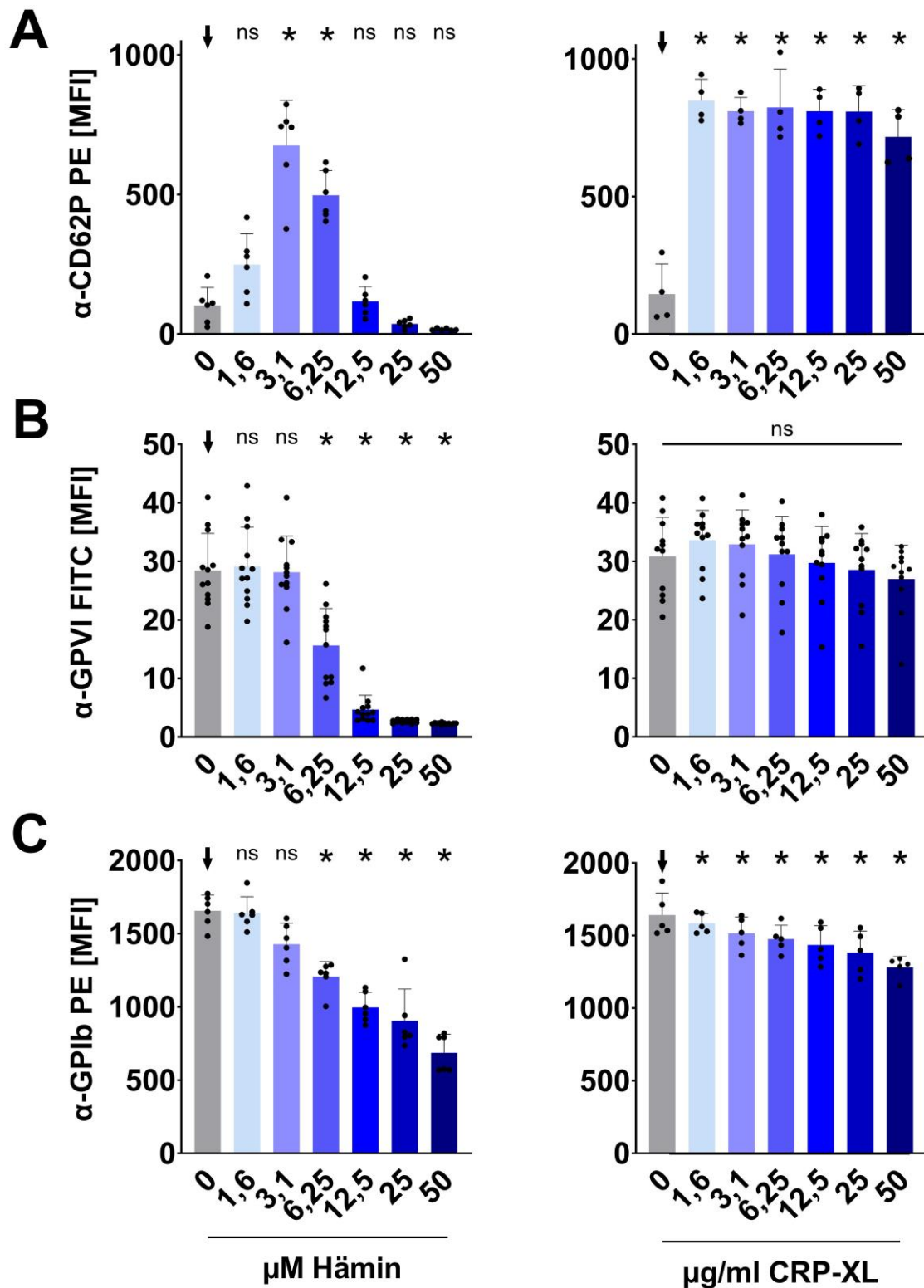


Abbildung 13: Hämmin-Konzentrationsabhängigkeit der Oberflächenexpression von P-Selektin, GPIb und GPVI. A Statistische Analyse der Oberflächenexpression von P-Selektin nach Aktivierung mit **links** Hämmin (n=6) und **rechts** CRP-XL (n=4). **B** Statistische Analyse der Oberflächenexpression von GPVI nach Aktivierung mit **links** Hämmin (n=12) und **rechts** CRP-XL (n=11). **C** Statistische Analyse der Oberflächenexpression von GPIb nach Aktivierung mit **links** Hämmin (n=6) und **rechts**

CRP-XL (n=5). Häminkonzentrationen wurden von 1,6 μM bis 50 μM und CRP-XL-Konzentrationen von 1,6 $\mu\text{g/ml}$ bis 50 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$.

3.2.2 Konzentrationsunabhängigkeit der Oberflächenexpression von CLEC-2 von Hämin

Um den Effekt von Hämin und CRP-XL auf die CLEC-2 Oberflächenexpression zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen der beiden aktivierenden Agonisten verwendet und die Oberflächenexpression durch Durchflusszytometrie gemessen. Bei Häminstimulation erfolgte keine signifikante Veränderung der CLEC-2 Oberflächenexpression in den verwendeten Häminkonzentration (0 μM Hämin versus 25 μM Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $72,83 \pm 26,68$ % vs. $71,82 \pm 15,17$ %, $p > 0,99$) Bei CRP-XL-Stimulation gab es ebenfalls keine Änderung der CLEC-2 Oberflächenexpression (0 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL versus 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $72,83 \pm 26,68$ % vs. $68,17 \pm 18,1$ %, $p = 0,96$).

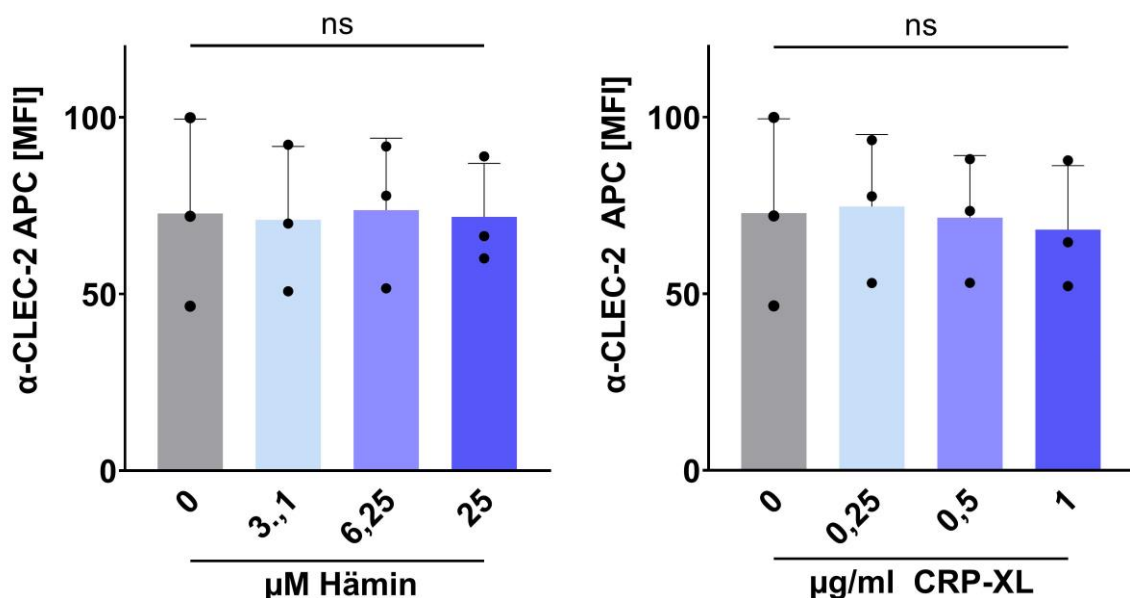


Abbildung 14: Konzentrationsunabhängigkeit der Oberflächenexpression von CLEC-2 von Hämin. Statistische Analyse der Oberflächenexpression von CLEC-2 nach Aktivierung mit *links* Hämin (n=3) und *rechts* CRP-XL (n=3). Häminkonzentrationen wurden von 3,1 μM bis 25 μM und CRP-XL-Konzentrationen von 0,25 $\mu\text{g/ml}$ bis 1 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik:

one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant.

3.2.3 Unabhängigkeit der Oberflächenexpression von GPVI von den CLEC-2-Agonisten Fucoidan und Katakine

Um zu untersuchen, ob der Hämin-induzierte Verlust der GPVI-Oberflächenexpression ein CLEC-2 Aktivierungs-spezifischer Effekt ist, wurden isolierte Thrombozyten mit den CLEC-2 Agonisten Fucoidan und Katakine aktiviert und anschließend die Oberflächenexpression durch Durchflusszytometrie erfasst. Sowohl Fucoidan, als auch Katakine induzierten keine signifikante Abnahme der GPVI-Oberflächenexpression (0 µg/ml Fucoidan versus 50 µg/ml Fucoidan: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 31,42±12,46 % vs. 31,94±7,87%, $p>0,99$; 0 µM Katakine versus 30 µM Katakine: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 15,74±4,28 % vs. 20,33±3,81%, $p=0,75$), wie in Abbildung 13B durch Hämin gezeigt (0 µM Hämin versus 12,5 µM Hämin: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 28,44±6,34 % vs. 4,66±2,46%, $p<0,0001$). Somit scheint der Hämin-induzierte Verlust der GPVI-Oberflächenexpression ein rein Hämin-spezifisches Phänomen zu sein.

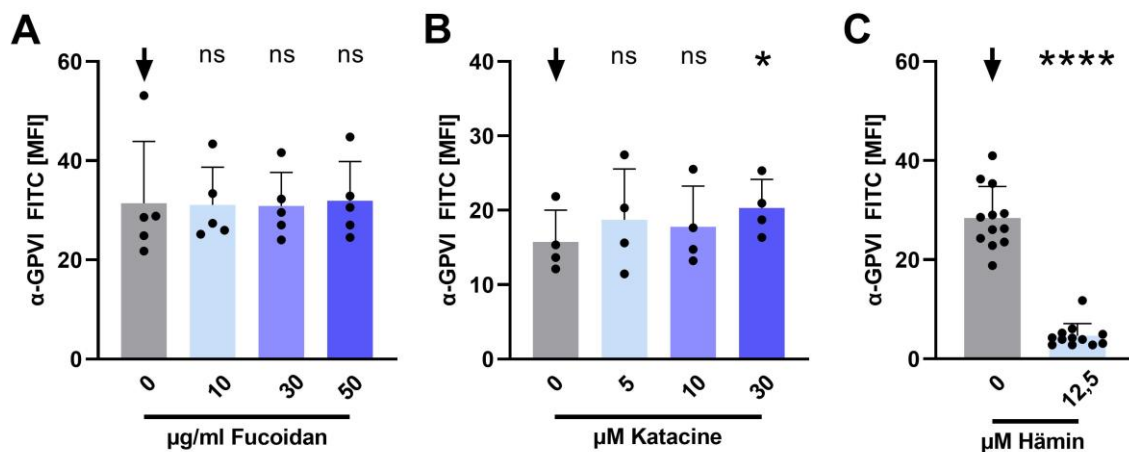


Abbildung 15: Unabhängigkeit der Oberflächenexpression von GPVI von den CLEC-2-Agonisten Fucoidan und Katakine. Statistische Analyse der Oberflächenexpression von GPVI nach Aktivierung mit **A** 10-50 µg/ml Fucoidan (n=5), **B** 5-30 µM Katakine (n=4) und **C** 12,5 µM Hämin (n=12). Details: Dargestellt: Mittelwert ± S.D.; Statistik: **A** Mixed-effects Analyse, Tukey's Mehrfachvergleichstest **B** one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest **C** gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle ↓; ns=nicht signifikant; * $p<0,05$, **** $p<0,0001$.

3.2.4 Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI

Um die zuvor beschriebene Abnahme der GPVI Oberflächenexpression auf Häminstimulation zu erklären, wurden Immunoblots von Lysaten aus humanen isolierten Thrombozyten angefertigt. Die isolierten Thrombozyten wurden zuvor mit 25 μM Hämin für 30 min, 60 min oder 120 min inkubiert. GPVI ist ein 36,9 kDa schweres Protein, welches sich glykosyliert zwischen 63 und 68 kDa befindet. Im repräsentativen Immunoblot ist sichtbar, dass die GPVI-Bande bei ca. 65 kDa in einer zeitlichen Abhängigkeit bei Häminstimulation abnimmt und eine korrespondierende GPVI-Bande bei ca. 55 kDa sichtbar wird. Das 55 kDa GPVI Fragment stimmt mit der bereits beschriebenen löslichen Form des GPVI (sGPVI), welches durch Ektodomänen-Shedding von ADAM10 und ADAM17 entsteht, überein. Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Zunahme des sGPVI sowie Abnahme des GPVI nach 60 min und 120 min (Kontrolle versus 60' Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $0,4 \pm 0,2$ % vs. $1,58 \pm 0,53$ %, $p=0,025$; Kontrolle versus 120' Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $0,4 \pm 0,2$ % vs. $2,0 \pm 0,9$ %, $p=0,03$) (Abbildung 16). Diese deutet darauf hin, dass Hämin konzentrationsabhängig Ektodomänen-Shedding von GPVI induziert.

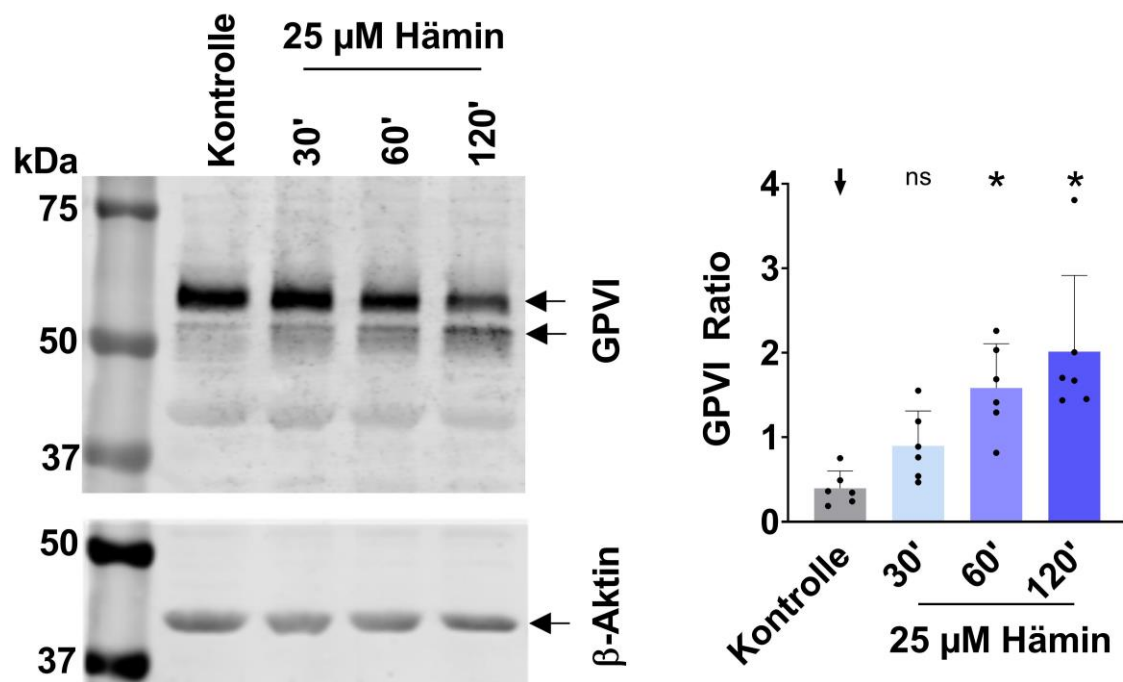


Abbildung 16: Hämin-induziertes Ektodomänen-Shedding von GPVI. Links Repräsentativer Immunoblot, der das Hämin-induzierte GPVI Ektodomänen-Shedding darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 30 min

oder 120 min mit 25 μM Hämin inkubiert wurden, hergestellt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **Rechts** Statistische Auswertung der GPVI Spaltung, welche in dem Immunoblot dargestellt ist ($n=6$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p<0,05$.

3.3 Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren

Um herauszufinden, ob verschiedene Proteaseinhibitoren die Hämin-induzierte Spaltung von GPVI hemmen können, wurden weitere durchflusszytometrische Experimente durchgeführt. Isolierte Thrombozyten wurden zunächst für 10 min oder 30 min mit einem Inhibitor vorinkubiert und anschließend für 30 min mit Hämin aktiviert. Die Proben wurden mit α -GPVI FITC gefärbt und anschließend im FACS die GPVI Oberflächenexpression bestimmt. Der Breitbandspektrum-Inhibitor Protease Inhibitor Cocktail (PIC) besteht aus 4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfluorid (AEBSF), Aprotinin, Bestatin, E64, Leupeptin und Pepstatin A und inhibiert hierdurch endogene Proteasen. Der spezifische Inhibitor Leupeptin inhibiert Cystein-, Serin- und Threoninpeptidasen wie z.B. Trypsin, Plasmin, Papain, Cathepsin B oder Endoproteinase Lys-C. Der Aspartylproteaseinhibitor Pepstatin A inhibiert z.B. Pepsin, Cathepsin D und E. Weder der Protease Inhibitor Cocktail (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus PIC: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 5,97 \pm 4,05 % vs. 8,41 \pm 5,53 %, $p=0,2$) noch Leupeptin (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus Leupeptin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 8,51 \pm 4,97 % vs. 6,77 \pm 1,54 %, $p=0,47$) oder Pepstatin (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus Pepstatin A: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 8,51 \pm 4,97 % vs. 6,89 \pm 2,78 %, $p=0,25$) hatten einen Effekt auf die Hämin-induzierte GPVI-Spaltung (Abbildung 17A-C).

Die bereits beschriebenen GPVI-Sheddases ADAM 10 und ADAM17, gehören der Familie der Metalloproteinasen an. Metalloproteinasen können unspezifisch durch Doxycyclin gehemmt werden. Interessanterweise wurde die Hämin-induzierte GPVI-Spaltung durch Doxycyclin nicht inhibiert (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus Doxycyclin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 6,64 \pm 1,86 % vs. 6,07 \pm 2,0 %, $p=0,56$) (Abbildung 17D). Auch GM6001, ein MMP-Inhibitor mit Breitbandwirkung, (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus GM6001: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 16,5 \pm 3,72 % vs. 14,93 \pm 1,81 %, $p=0,27$) sowie GI254023X, ein spezifischer ADAM10-Inhibitor, (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus GI254023X: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 15,43 \pm 2,69 % vs. 18,68 \pm 3,17 %, $p=0,12$) hatten keinen Effekt auf die Hämin-induzierte

proteolytische Spaltung von GPVI (Abbildung 17E-F). Der Chelator EDTA hatte ebenfalls keinen Effekt auf die Hämin-induzierte GPVI-Spaltung (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus EDTA: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 15,1 \pm 2,67 % vs. 17,1 \pm 3,38 %, $p=0,29$) (Abbildung 17G). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keiner der konventionellen Proteaseinhibitoren die durch Hämin ausgelöste Reduktion der GPVI Oberflächenexpression verringern oder verhindern konnte.

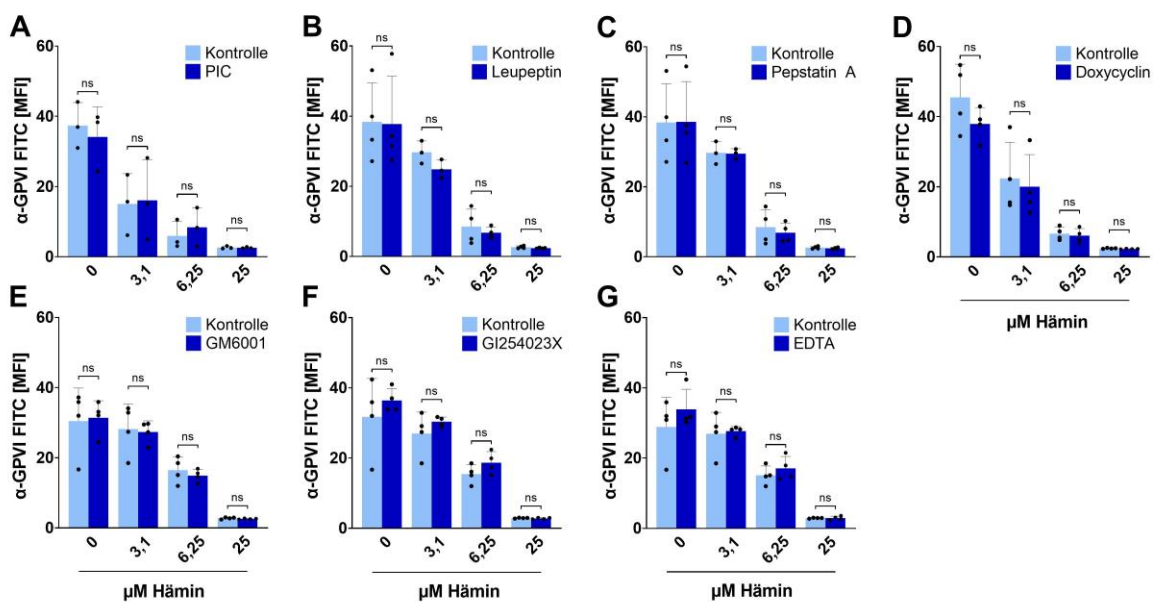


Abbildung 17: Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren. Statistische Analyse der GPVI Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen von 3,1 μ M bis 25 μ M. Die isolierten Thrombozyten wurden für **A-D** 10 min oder **E-G** 30 min mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert. **A** Protease Inhibitor Cocktail (PIC) 1:100 ($n=3$), **B** 1 μ M Leupeptin ($n\geq 3$), **C** 1 μ M Pepstatin A ($n\geq 3$), **D** 50 μ g/ml Doxycyclin ($n=4$), **E** 100 μ M GM6001 ($n=4$), **F** 10 μ M GI254023X ($n=4$), **G** 25 μ M EDTA ($n=4$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's *t*-test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant.

Da für P-Selektin ebenfalls eine Abnahme der Oberflächenexpression in hohen Häminkonzentrationen (Abbildung 13A) zu beobachten war, wurde auch hier die Oberflächenexpression nach Häminaktivierung in Zusammenhang mit der Behandlung mit konventionellen Proteaseinhibitoren bestimmt. Weder der Protease Inhibitor Cocktail (25 μ M Hämin: Kontrolle versus PIC: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 26,62 \pm 4,65 % vs. 14,62 \pm 6,67 %, $p=0,19$) noch Leupeptin (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus Leupeptin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 252,2 \pm 99,2 % vs. 209,8 \pm 43,53 %, $p=0,29$) (Abbildung 17H-I) hatten einen Einfluss auf die P-Selektin-Oberflächenexpression.

p=0,3), Pepstatin (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus Pepstatin A: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 252,2 \pm 99,2 % vs. 200,4 \pm 70,29 %, p=0,25) oder Doxycyclin (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus Doxycyclin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 131,8 \pm 38,48 % vs. 109,3 \pm 45,44 %, p=0,46) hatten einen reduzierenden Effekt auf die konzentrationsabhängige Hämin-induzierte Abnahme der P-Selektin Oberflächenexpression (Abbildung 18A-D). Der Protease Inhibitor Cocktail führte zu einer signifikanten Reduktion der P-Selektin-Oberflächenexpression bei 6,25 μ M Hämin und könnte daher einen hemmenden Effekt auf die Degranulation haben (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus PIC: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 284,3 \pm 15,46 % vs. 53,75 \pm 9,19 %, p=0,004).

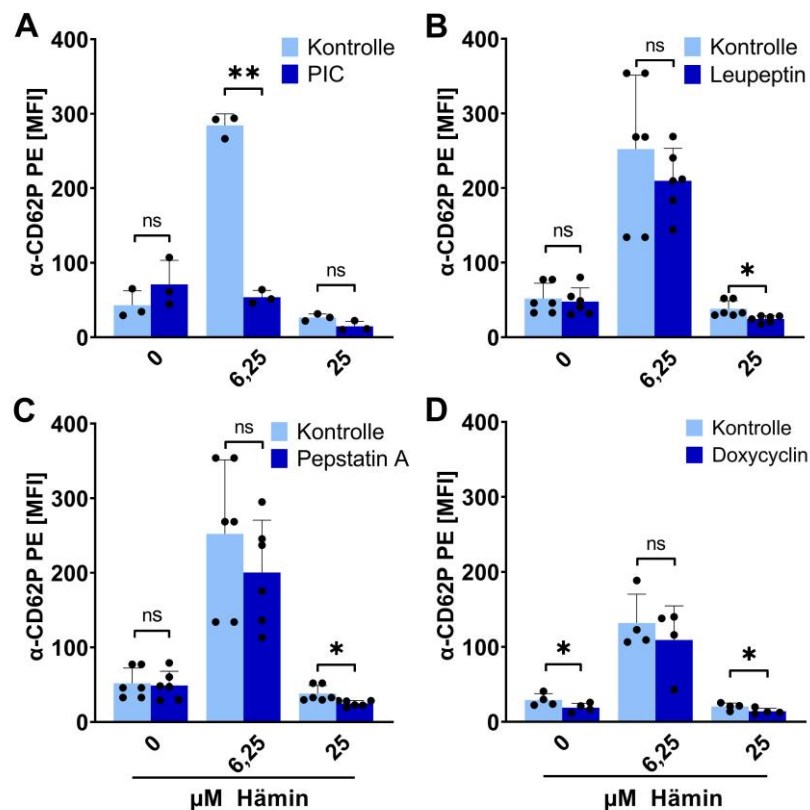


Abbildung 18: Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Abnahme der P-Selektion-Oberflächenexpression von GPVI von den üblichen Proteaseinhibitoren. Statistische Analyse der P-Selektin-Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen von 6,25 μ M bis 25 μ M. Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit dem entsprechenden Inhibitor vorinkubiert. **A** PIC 1:100 (n=3), **B** 1 μ M Leupeptin (n=6), **C** 1 μ M Pepstatin A (n=6), **D** 50 μ g/ml Doxycyclin (n=4). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant; * p<0,05; ** p<0,01.

3.3.1 Unabhängigkeit der Hämin-induzierten Spaltung von GPVI von Syk und Src

Der folgende Versuch wurde in Zusammenarbeit mit Z. Laspa durchgeführt.

Um herauszufinden, ob die durch Hämin induzierte Spaltung von GPVI abhängig vom ITAM-Signalweg abwärts von GPVI und CLEC-2 und somit von den Kinasen Src und Syk ist, wurde die GPVI-Oberflächenexpression nach Behandlung der Thrombozyten durch Durchflusszytometrie bestimmt. Isolierte Thrombozyten wurden zunächst für 5 min mit 20 μM des Src-Inhibitors PP2 und 20 μM des Syk-Inhibitors PRT060318 vorinkubiert und anschließend für 30 min mit Hämin aktiviert. Die Proben wurden mit α -GPVI FITC gefärbt und anschließend im FACS die GPVI-Oberflächenexpression bestimmt. Weder der Src-Inhibitor PP2 (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus PIC: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 3,56 \pm 0,99 % vs. 3,1 \pm 0,54 %, $p=0,4$) noch der Syk-Inhibitor PRT060318 (6,25 μM Hämin: Kontrolle versus Leupeptin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 3,25 \pm 0,83 % vs. 3,15 \pm 0,54 %, $p=0,87$) hatten einen Effekt auf die Hämin-induzierte GPVI-Spaltung (Abbildung 19). Die Hämin-induzierte Abnahme der GPVI-Oberflächenexpression scheint somit unabhängig von der ITAM-Signalkaskade abwärts von CLEC-2 und GPVI zu sein.

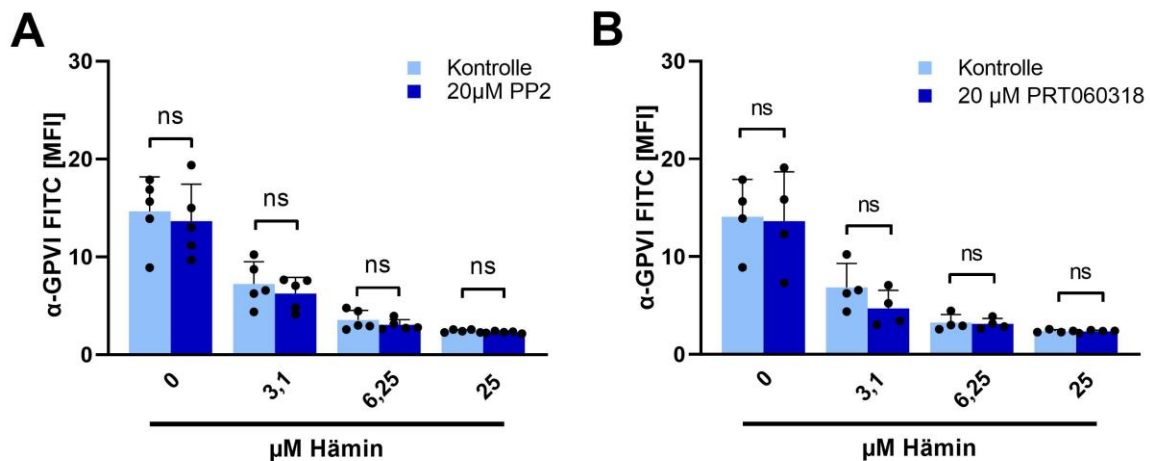


Abbildung 19: Unabhängigkeit der Hämin-induzierten Spaltung von GPVI von Syk und Src. Statistische Analyse der GPVI Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM . Die isolierten Thrombozyten wurden **A** mit 20 μM PP2 (Src-Inhibitor) und **B** 20 μM PRT060318 (Syk-Inhibitor) für 5 min vorinkubiert. Details: $n \geq 4$; Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant.

3.4 Furin-Abhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI

3.4.1 Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Furin-Oberflächenexpression

Die *subtilisin-like* Protease Furin ist in Thrombozyten vorhanden und aktiviert die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17. Da ADAM10 und ADAM17 zum jetzigen Stand die beiden bekannten Sheddasen für GPVI sind und die Furin-Aktivierung und -Oberflächenexpression bei aktivierten Thrombozyten erhöht ist, wurde im Folgenden versucht, einen Zusammenhang zwischen Furin und Hämin bei Thrombozyten herzustellen.

Isolierte Thrombozyten wurden mit Hämin in den Konzentrationen 3,1 μM bis 25 μM und 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL für 30 min aktiviert und mit α -Furin 488 gefärbt. Die Furin Oberflächenexpression wurde daraufhin durchflusszytometrisch bestimmt. Die Furin Oberflächenexpression ist bei Aktivierung mit 25 μM Hämin signifikant erhöht (Kontrolle versus 25 μM Hämin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 71,4 \pm 42,1 % vs. 110,7 \pm 57,9 %, $p=0,03$), ebenso, wie bereits bekannt, bei der Aktivierung mit CRP-XL (Kontrolle versus CRP-XL: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 71,4 \pm 42,1 % vs. 102,9 \pm 56,59 %, $p=0,026$).

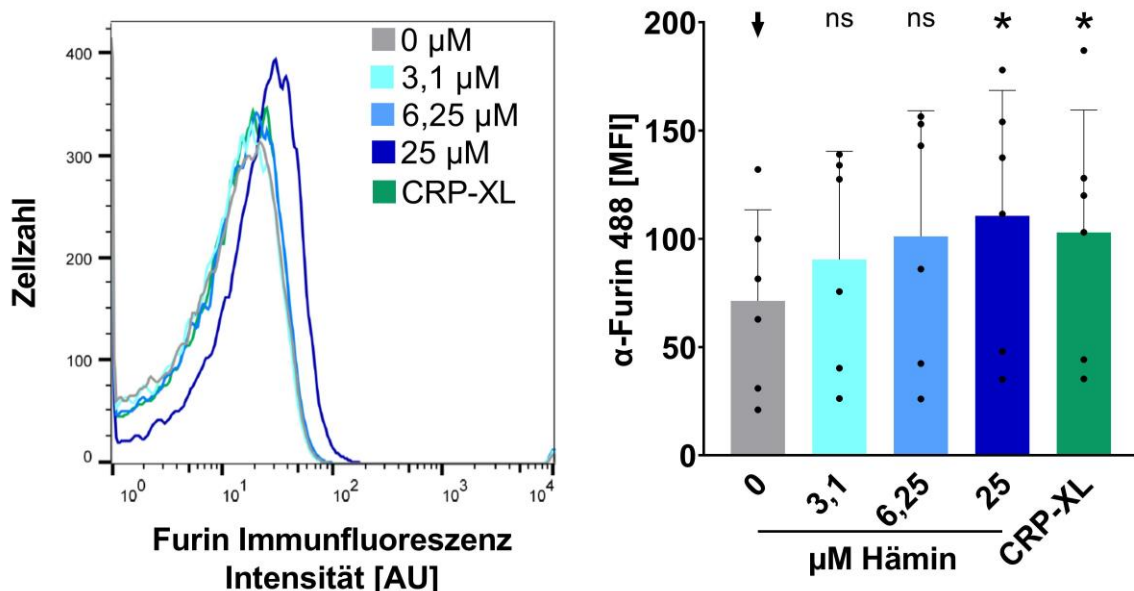


Abbildung 20: Hämin-Konzentrationsabhängigkeit der Furin-Oberflächenexpression. Repräsentatives Histogramm und statistische Analyse der Furin Oberflächenexpression von Thrombozyten nach Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM und 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL. Details: Dargestellt:

Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA; Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p<0.05$.

3.4.2 Beeinflussung der Hämin-induzierten Veränderung der GPVI-Oberflächenexpression durch Furin

Um weiterhin herauszufinden, ob Furin das Hämin-induzierte Ektodomänen-Shedding von GPVI reguliert, wurden isolierte Thrombozyten mit dem furinspezifischen Inhibitor SSM3 trifluoroacetate (SSM3) 25 μ M für 10 min vorinkubiert und anschließend mit aktivierenden Agonisten wie Hämin, Thrombin, CRP-XL und ADP für 30 min aktiviert sowie mit α -GPVI FITC und α -CD62P PE gefärbt. Daraufhin wurde die GPVI- und P-Selektin Oberflächenexpression durchflusszytometrisch ermittelt.

Sowohl die GPVI als auch die P-Selektin Oberflächenexpression nahm bei steigender Häminkonzentration ab, wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben (Abbildung 13A-B und Abbildung 21A). Im Gegensatz hierzu blieb die GPVI sowie die P-Selektin Oberflächenexpression bei Stimulation mit steigenden Konzentrationen der aktivierenden Agonisten Thrombin, CRP-XL und ADP weitestgehend unverändert (Abbildung 21B-D).

Im Gegensatz zu den zuvor getesteten Proteaseinhibitoren (Abbildung 17 und 18), wurde der durch Hämin induzierte Verlust der GPVI-Oberflächenexpression durch SSM3 signifikant reduziert (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 6,5 \pm 1,7 % vs. 37,8 \pm 4,8 %, $p=0,001$). Hieraus ergibt sich, dass Furin aktiv beim Hämin-induzierten Ektodomänen-Shedding von GPVI beteiligt ist (Abbildung 21A).

Aus Abbildung 21A sowie zuvor aus Kapitel 3.2.1 folgt eine zweiphasige Veränderung der P-Selektin-Konzentration auf Stimulation mit Hämin. Niedrige Konzentrationen (<6,25 μ M Hämin) von Hämin erhöhen die Degranulation und Aktivierung der Thrombozyten und hierdurch die P-Selektion-Oberflächenexpression. Bei höheren Hämin-Konzentrationen (>6,25 μ M Hämin) erfolgt ebenfalls eine starke Aktivierung der Thrombozyten (Aggregometrie und Flusskammer), die Oberflächen-Expression von P-Selektin nimmt jedoch ab, da es vermutlich ebenfalls zu einer Degradation des Rezeptors kommt.

Um diese Hypothese zu testen, wurden auch inhibitorische Experimente mit SSM3 durchgeführt, bei denen die Oberflächenexpression vom P-Selektin nach Häminaktivierung bestimmt wurde. Die P-Selektin-Oberflächenexpression bei

isolierten Thrombozyten, welche für 10 min mit 25 μ M SSM3 vorinkubiert wurden, wurde durch Durchflusszytometrie bestimmt.

Analog zu GPVI wurde in den höheren Häminkonzentrationen 6,25 μ M und 25 μ M durch 25 μ M SSM3 die Abnahme der P-Selektin-Oberflächenexpression signifikant reduziert (6,25 μ M Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 162 \pm 34,02 % vs. 295,5 \pm 101,7 %, $p=0,056$; 25 μ M Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 19,08 \pm 1,98 % vs. 216,5 \pm 30,1 %, $p<0,0001$). Somit wird die Degradation von P-Selektin gehemmt.

In der niedrigen Häminkonzentration 3,1 μ M ist die P-Selektin-Oberflächenexpression nach SSM3-Behandlung signifikant erniedrigt im Vergleich zur Kontrolle (3,1 μ M Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 420,4 \pm 69,19 % vs. 135,2 \pm 85,75 %, $p=0,0027$). Dies deutet an, dass SSM3 einen inhibitorischen Effekt auf die Degranulation hat.

SSM3 hat keinen oder einen reduzierenden Effekt auf die GPVI- und P-Selektin-Oberflächenexpression in Thrombozyten, die durch Thrombin stimuliert wurden (α -GPVI FITC: 0,5 U/ml Thrombin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 60,18 \pm 5,37 % vs. 49,65 \pm 4,98 %, $p=0,05$; α -CD62P PE: 0,5 U/ml Thrombin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 817 \pm 64,99 % vs. 912,8 \pm 135,2 %, $p=0,2$). Dieses Verhalten ist ebenfalls bei durch CRP-XL aktivierten Thrombozyten zu sehen (α -GPVI FITC: 0,5 μ g/ml CRP-XL: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 33,78 \pm 2,2 % vs. 25,73 \pm 2,02 %, $p=0,002$; α -CD62P PE: 0,5 μ g/ml CRP-XL: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 648,8 \pm 172,3 % vs. 574 \pm 200 %, $p=0,019$). SSM3 hat auch keinen Effekt auf die GPVI- und P-Selektin-Oberflächenexpression in Thrombozyten, die durch ADP stimuliert wurden (α -GPVI FITC: 10 μ M ADP: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 36,75 \pm 7,53 % vs. 35 \pm 7,16 %, $p=0,3$; α -CD62P PE: 10 μ M ADP: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 329,3 \pm 133,7 % vs. 236 \pm 120,8 %, $p=0,08$).

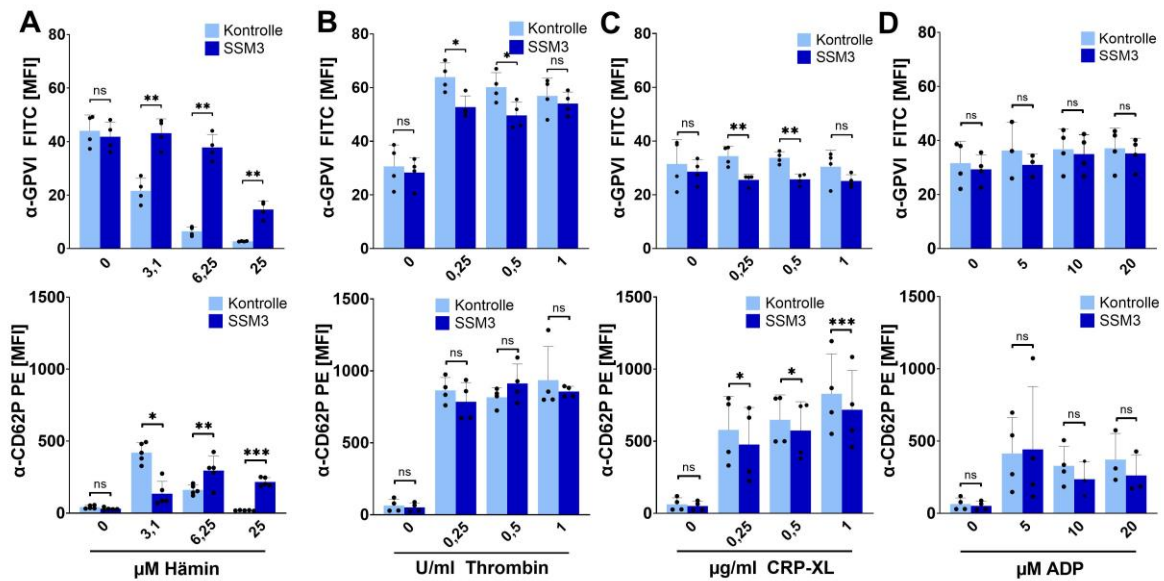


Abbildung 21: Beeinflussung der Hämin-induzierten Veränderung der GPVI-Oberflächenexpression durch Furin. Statistische Analyse der **Obere Reihe** GPVI-Oberflächenexpression und **Untere Reihe** P-Selektin-Oberflächenexpression nach Aktivierung mit unterschiedlichen Agonisten. Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit dem Furininhibitor SSM3 vorinkubiert. **A** Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen vom 3,1 µM bis 25 µM **Obere Reihe** (n=4) **Untere Reihe** (n=4), **B** Aktivierung mit Thrombin in Konzentrationen vom 0,25 U/ml bis 1 U/ml **Obere Reihe** (n=4) **Untere Reihe** (n=4), **C** Aktivierung mit CRP-XL in Konzentrationen vom 0,25 µg/ml bis 1 µg/ml **Obere Reihe** (n=4) **Untere Reihe** (n=4), **D** Aktivierung mit ADP in Konzentrationen vom 5 µM bis 20 µM **Obere Reihe** (n=4) **Untere Reihe** (n=4). Details: Dargestellt: Mittelwert ± S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant; * p<0,05, ** p<0,01; *** p<0,001.

Um die optimale Wirkkonzentration von SSM3 zu bestimmen, wurde eine Konzentrationsreihe von 50 nM bis 25 µM via Durchflusszytometrie durchgeführt.

Hierfür wurden isolierte Thrombozyten mit SSM3, in den Konzentrationen von 50 nM bis 25 µM, für 10 min vorinkubiert und anschließend mit Hämin, in den Konzentrationen 3,1 µM bis 25 µM, für 30 min aktiviert und mit α-GPVI FITC gefärbt.

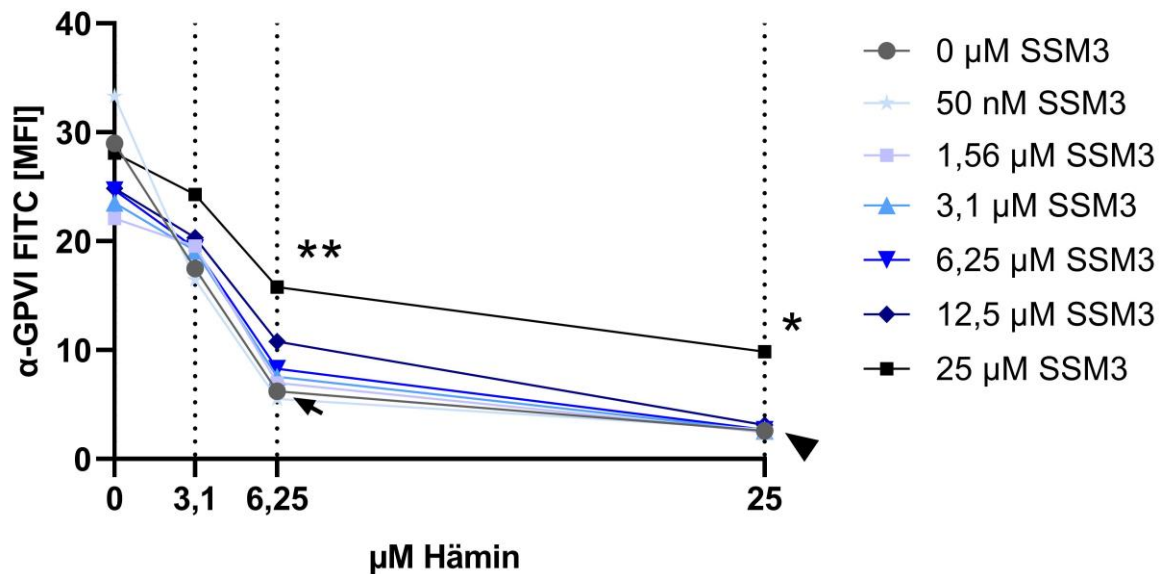


Abbildung 22: Konzentrationsreihe zur Ermittlung der SSM3-Konzentration. Effekte von SSM3 in steigenden Konzentrationen (50 nM - 25 µM) auf das GPVI-Shedding induziert durch Hämin. Diese Ergebnisse wurden durch Durchflusszytometrie erfasst, indem die Oberflächenexpression von GPVI nach Aktivierung mit Hämin bestimmt wurde. Die isolierten Thrombozyten wurden mit SSM3 in der entsprechenden Konzentration präinkubiert für 10 min. Details: $n \geq 5$; Dargestellt: Mittelwert; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle (6,25 µM Hämin / 0 µM SSM3 - Pfeil versus 6,25 µM Hämin / 25 µM SSM3 ** $p < 0,01$; 25 µM Hämin / 0 µM SSM3 - Pfeilkopf versus 25 µM Hämin / 25 µM SSM3 * $p < 0,05$); wenn nicht beschriftet, ist die Statistik nicht signifikant.

Die GPVI Oberflächenexpression bei isolierten Thrombozyten, welche für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen SSM3 vorinkubiert wurden, wurde durch die Durchflusszytometrie bestimmt. Die unstimulierten Thrombozyten wiesen keine wesentlichen Unterschiede in der GPVI-Oberflächenexpression auf konzentrationsabhängige SSM3-Behandlung auf. Bei Stimulation der Thrombozyten mit 3,1 µM Hämin führte keine SSM3-Konzentration zu einer signifikanten Veränderung der GPVI-Oberflächenexpression. Die durch 6,25 µM Hämin stimulierten Thrombozyten wiesen in den SSM3-Konzentrationen von 50 nM bis 12,5 µM SSM3 keine signifikanten Veränderungen auf. SSM3 in einer Konzentration von 25 µM führte zu einer signifikanten Erhöhung der GPVI-Oberflächenexpression im Vergleich zur 0 µM SSM3-Kontrolle (6,25 µM Hämin / 0 µM SSM3 - Pfeil versus 6,25 µM Hämin / 25 µM SSM3 ** $p < 0,01$). Die durch 25 µM Hämin stimulierten Thrombozyten wiesen in den SSM3-Konzentrationen von 50 nM bis 12,5 µM SSM3 ebenfalls keine signifikanten Veränderungen auf. SSM3 in einer Konzentration von 25 µM führte zu einer

signifikanten Erhöhung der GPVI-Oberflächenexpression im Vergleich zur 0 μM SSM3-Kontrolle (25 μM Hämin / 0 μM SSM3 - Pfeilkopf versus 25 μM Hämin / 25 μM SSM3 * $p < 0,05$).

Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass es keine inhibitorischen Effekte von SSM3 auf die Hämin-induzierte GPVI-Oberflächenexpression in den nM und niedrigen μM Bereichen von SSM3 gibt. Eine SSM3 Konzentration von 25 μM führt zur signifikanten Verminderung der durch Hämin-induzierten Spaltung von GPVI und dient als Arbeitskonzentration der weiteren Versuche.

In Kapitel 3.2.1 ist für GPIb als weiterer Rezeptor ebenfalls eine Häminkonzentrationsabhängige Abnahme der Oberflächenexpression beschrieben. Aus diesem Grund wurden Durchflusszytometrieexperimente durchgeführt, bei denen die isolierten Thrombozyten mit Hämin aktiviert und, wenn indiziert, mit SSM3 vorinkubiert sowie mittels $\alpha\text{-GPIb PE}$ gefärbt wurden. Der durch Hämin induzierte Verlust der GPIb-Oberflächenexpression wird durch SSM3 signifikant reduziert (25 μM Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $959,1 \pm 192,6$ % vs. $1287 \pm 165,0$ %, $p = 0,025$).

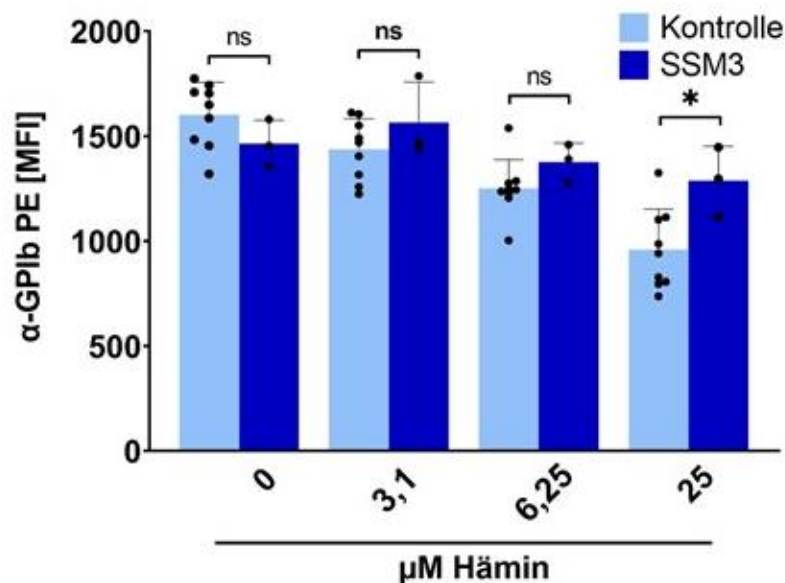


Abbildung 23: Effekt von SSM3 auf die GPIb Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämin. Statistische Analyse der GPIb-Oberflächenexpression nach

Aktivierung mit Hämin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM . Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit 25 μM SSM3 vorinkubiert ($n \geq 3$) Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: ungepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$.

3.4.3 Beeinflussung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin

Die Rolle von Furin beim Hämin-induzierten Ektodomänen-Shedding von GPVI wurde weiterhin im Rahmen von Immunoblots von Thrombozyten-Lysaten dargestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden zunächst, wenn indiziert, mit 25 μM SSM3 für 10 min vorinkubiert. Anschließend wurden die isolierten Thrombozyten mit 25 μM Hämin für 30 min, 60 min oder 120 min inkubiert. Im repräsentativen Immunoblot ist sichtbar, dass die GPVI-Bande bei ca. 65 kDa in einer zeitlichen Abhängigkeit bei Häminstimulation abnahm und die korrespondierende sGPVI-Bande bei ca. 55 kDa sichtbar wurde. Bei Behandlung mit SSM3 ist sichtbar, dass die GPVI-Bande in einer zeitlichen Abhängigkeit bei Häminstimulation im Vergleich ohne Behandlung zunimmt und die sGPVI-Bande abnimmt. Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Abnahme des sGPVI sowie Zunahme des GPVI nach 120 min (Hämin versus Hämin+SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: 1,9 \pm 1,0 % vs. 1,2 \pm 0,48 %, $p=0,04$) (Abbildung 24).

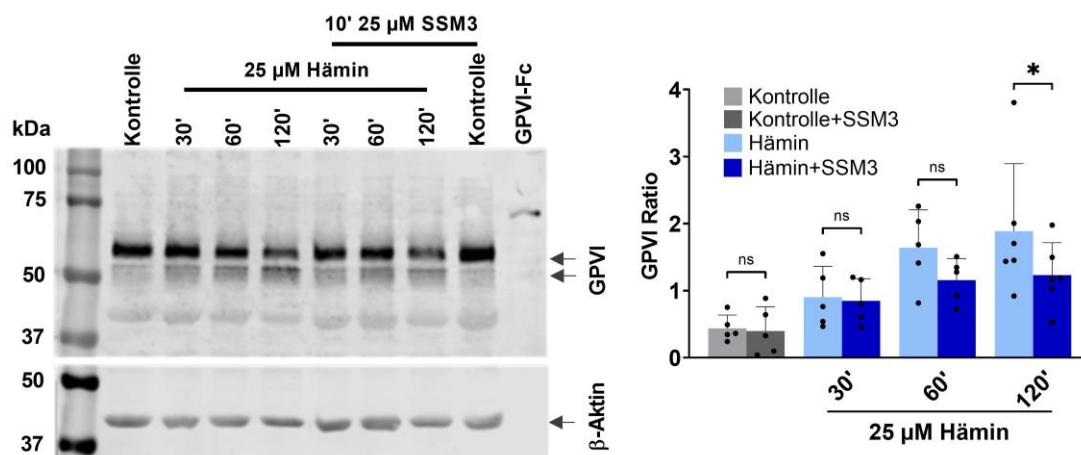


Abbildung 24: Beeinflussung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin. Links Repräsentativer Immunoblot, der das von SSM3 beeinflusste Hämin-induzierte GPVI Ektodomänen-Shedding darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 30 min, 60 min oder 120 min mit 25 μM Hämin inkubiert wurden, hergestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden zuvor mit

25 μ M SSM3 vorinkubiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **Rechts** Statistische Auswertung der GPVI Spaltung, welche in dem Immunoblot dargestellt ist ($n \geq 5$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$.

Um die Bedeutung von Furin für das Ektodomänen-Shedding von GPVI zu verdeutlichen, wurden humane isolierte Thrombozyten mit rekombinanten humanen Furin (rhFurin) für 60 min inkubiert und anschließend Thrombozyten-Lysate hergestellt. In dem repräsentativen Immunoblot wird deutlich, dass durch Zugabe von rhFurin die GPVI-Bande bei ca. 65 kDa abnahm und die korrespondierende sGPVI-Bande bei ca. 55 kDa zunahm. Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Zunahme des sGPVI sowie Abnahme des GPVI nach 60 min Inkubation mit rhFurin (Kontrolle versus rhFurin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $0,8 \pm 0,1$ % vs. $1,1 \pm 0,2$ %, $p = 0,04$) (Abbildung 25). Hieraus kann gefolgert werden, dass Furin aktiv in das Ektodomänen-Shedding von GPVI involviert ist.

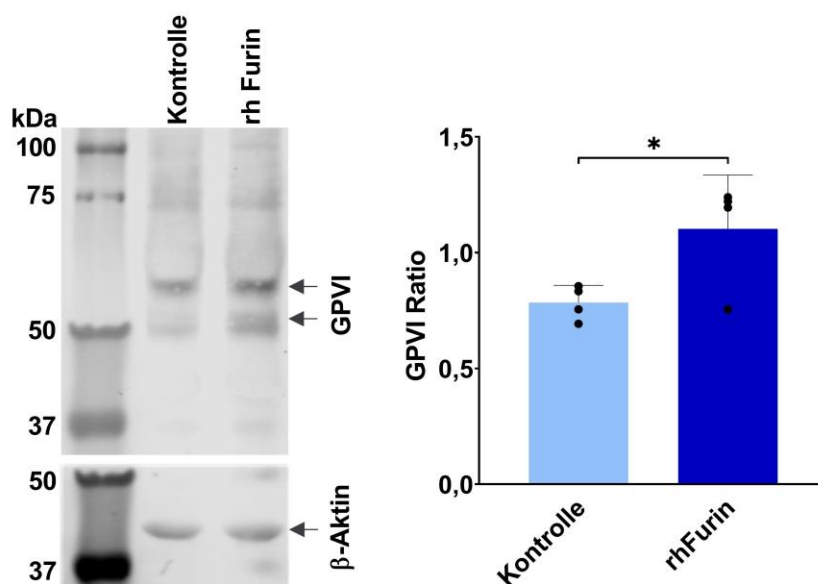


Abbildung 25: Induktion von Ektodomänen-Shedding von GPVI durch rekombinantes humanes Furin. Links Repräsentativer Immunoblot, der das von Furin induzierte GPVI Ektodomänen-Shedding darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 60 min mit rekombinanten humanen Furin inkubiert wurden, hergestellt. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **Rechts** Statistische Auswertung der GPVI Spaltung, welche in dem Immunoblot dargestellt ist ($n = 4$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: ungepaarter Student's t-Test; Statistik bezieht sich auf die Kontrolle; * $p < 0,05$.

3.4.4 Unabhängigkeit des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von der CKII

Die Protease Furin kann in verschiedenen Kompartimenten vorhanden sein: dem TGN, der Zelloberfläche und den Endosomen. Hierbei bestehen verschiedene Zyklen. Furin wird durch die CKII phosphoryliert, CKII reguliert somit das Vorhandensein von Furin in TGN und der Zelloberfläche.

In Kapitel 3.5 wurde Zunahme der Oberflächenexpression von Furin in Thrombozyten durch Hämin beschrieben. Die Oberflächenexpression von Furin wird durch die CKII reguliert. Um den Einfluss der CKII auf die Hämin-abhängige GPVI-, P-Selektin- und Furin-Oberflächenexpression zu erforschen, wurden isolierte Thrombozyten mit dem CKII-Inhibitor CX-4945 für 10 min und 30 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung durch Hämin, in den Konzentrationen 3,1 μM bis 25 μM , sowie die Färbung mit α -GPVI FITC, α -CD62P PE und α -Furin FITC für 30 min. Die Bestimmung der Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Der CKII-Inhibitor CX-4945 hatte keinen Einfluss auf die Furin Oberflächenexpression, weder nach 10 min noch nach 30 min Inkubation (Abbildung 26). Ebenfalls hat der CKII-Inhibitor CX-4945 keinen Einfluss auf den Hämin-induzierten Verlust der Oberflächenexpression von GPVI und P-Selektin (Abbildung 26).

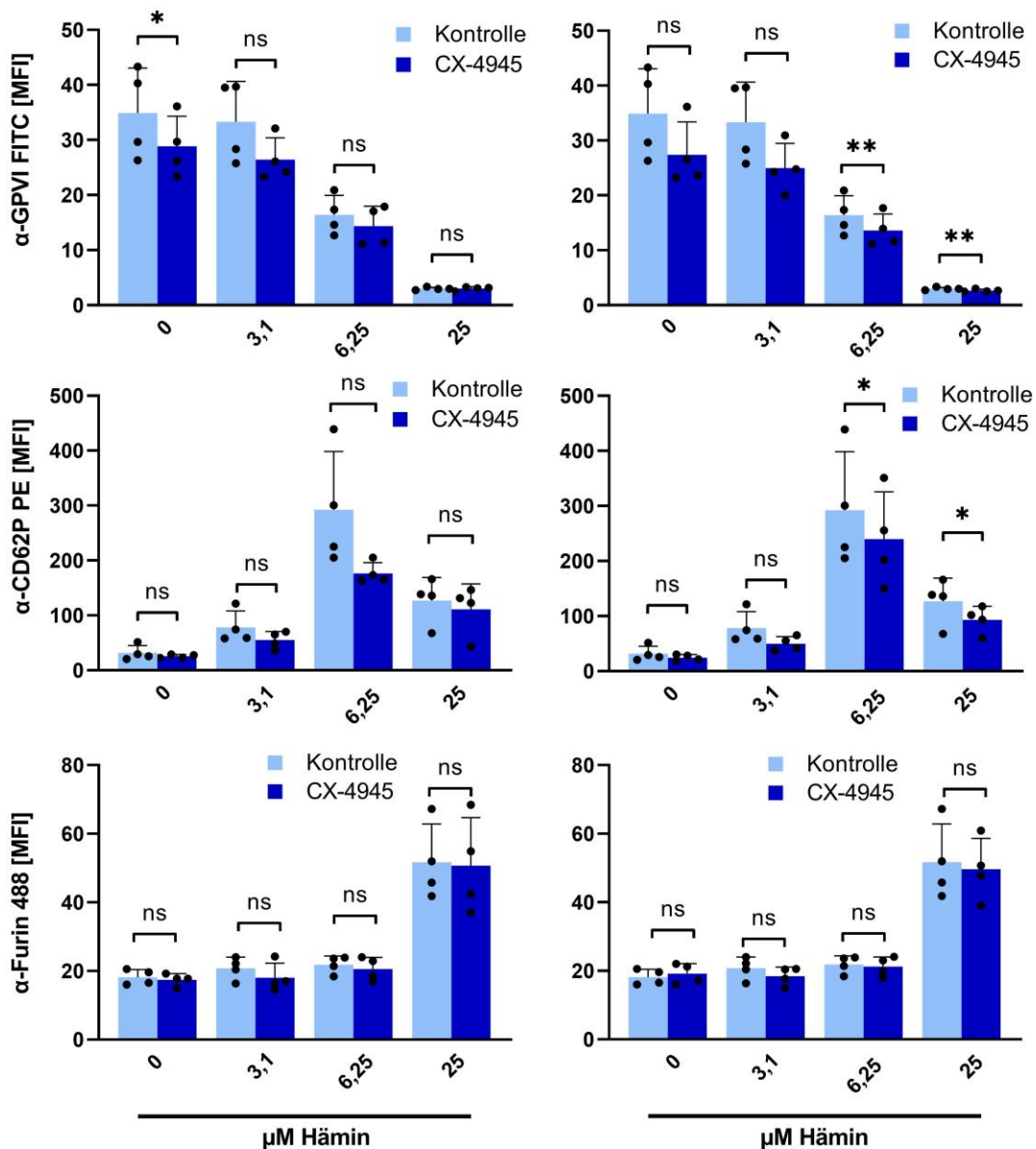


Abbildung 26: Unabhängigkeit des Hämmin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI von der CKII. Obere Reihe Statistische Analyse der GPVI Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämmin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM. **Rechts** Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. **Links** Die isolierten Thrombozyten wurde für 30 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. **Mittlere Reihe** Statistische Analyse der P-Selektin-Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämmin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM. **Rechts** Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. **Links** Die isolierten Thrombozyten wurde für 30 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. **Untere Reihe** Statistische Analyse der Furin-Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämmin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM. **Rechts** Die Isolierten Thrombozyten wurden für 10 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. **Links** Die isolierten Thrombozyten wurde für 30 min mit 100 μM CX-4945 vorinkubiert. Details: Dargestellt: Mittelwert ± S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik bezieht sich für jede Probe auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant; * p<0,05; ** p<0,01.

3.4.5 Vermittlung des Hämin-induzierten Ektodomänen-Sheddings von GPVI durch Furin unabhängig von Syk und PLC γ 2

Um den Mechanismus von SSM3 auf das Hämin-induzierte GPVI-Shedding weiter zu erforschen, wurden Immunoblots zur Beurteilung der Phosphorylierung von Syk und PLC γ 2 angefertigt. Die genaue Fragestellung lautete hierbei: Ist der SSM3-Effekt auf das GPVI-Shedding abhängig vom ITAM-Signalweg von GPVI und CLEC-2? Hierzu wurden Lysate aus isolierten Thrombozyten, aktiviert mit 25 μ M Hämin für 2,5 min, hergestellt. Wenn indiziert, wurden die Thrombozyten für 10 min mit 25 μ M SSM3 vorinkubiert. Für die Herstellung der Immunoblots wurden Tyrosin-Phosphorylierungsspezifische monoklonale Antikörper pSyk Y352 / Syk und PLC γ 2 Y1217 / PLC γ 2 verwendet. Wie bereits in Kapitel 3.1.4 beschrieben, phosphoryliert Hämin Syk und PLC γ 2 und aktiviert somit die ITAM-Signalkaskade von GPVI und CLEC-2. SSM3 hat jedoch keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad sowohl von Syk als auch von PLC γ 2, weder in der unstimulierten Kontrolle noch in der Aktivierung mit 25 μ M SSM3. Somit scheint das Furin-abhängige GPVI-Shedding, das durch Hämin ausgelöst wird, unabhängig von dem GPVI/CLEC-2 ITAM-Signalweg zu sein.

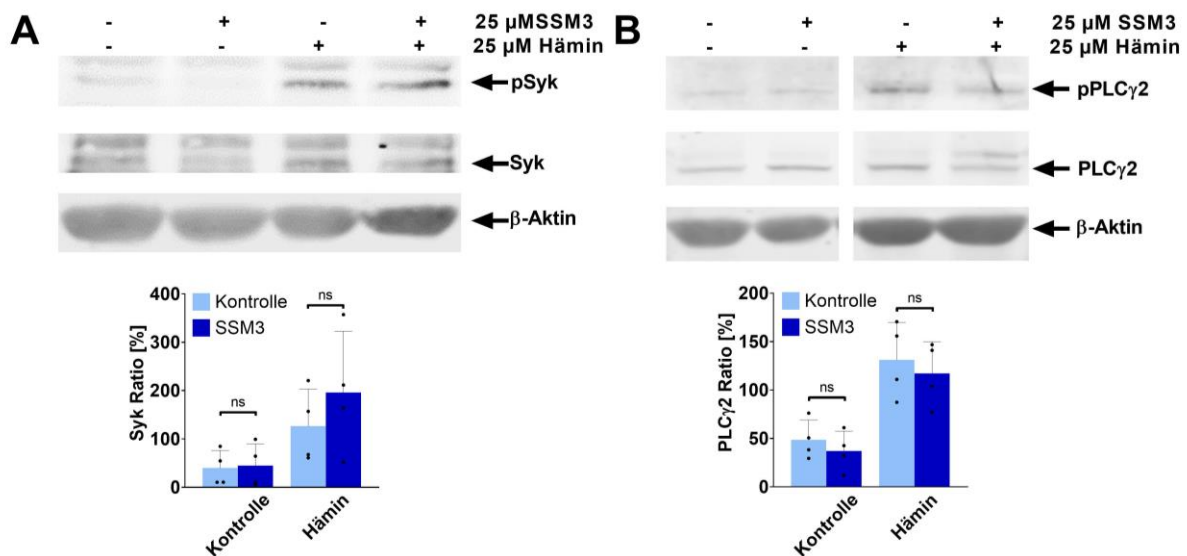


Abbildung 27: Fehlender Einfluss von Furin auf die Hämin-induzierte Phosphorylierung von Syk und PLC γ 2. **A** Repräsentativer Immunoblot, der die Hämin-induzierte Änderung der Phosphorylierung von Syk und den Einfluss von SSM3 darstellt. Die Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 2,5 min mit 3,1 μ M oder 25 μ M μ M Hämin inkubiert wurden, hergestellt. Wenn indiziert, wurden die isolierten Thrombozyten mit 25 μ M SSM3 für 10 min vorinkubiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. **B** Repräsentativer Immunoblot, der die Hämin-induzierte Änderung der Phosphorylierung von PLC γ 2 und den Einfluss von SSM3 darstellt. Die

Lysate wurden aus isolierten Thrombozyten, welche für 2,5 min mit 3,1 μM oder 25 μM Häm in inkubiert wurden, hergestellt. Wenn indiziert, wurden die isolierten Thrombozyten mit 25 μM SSM3 für 10 min vorinkubiert. β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Details: $n \geq 4$; Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's t-Test; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle; ns=nicht signifikant.

3.5 Modulation der Thrombozytenfunktion durch Furininhibition

3.5.1 Beeinflussung der Häm in-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Häm in

Um die funktionellen Aspekte von Furin auf die Häm in-induzierte Aktivierung von Thrombozyten zu bestimmen, wurde die Lichttransmissionsaggregation von isolierten Thrombozyten bestimmt. Isolierte Thrombozyten wurden für 10 min mit SSM3, in den Konzentrationen 6,25 μM bis 25 μM , inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 25 μM Häm in oder 1 $\mu\text{g/ml}$ CRP-XL aktiviert und die Aggregation für 7 min gemessen. Häm in führte zu einer starken Aggregation der Thrombozyten von $81,2 \pm 16,8$ % (Kontrolle: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.). Diese Aggregation konnte durch Behandlung mit SSM3 signifikant reduziert werden (Kontrolle versus 25 μM SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $81,2 \pm 5,7$ % vs. $4,0 \pm 2,0$ %, $p < 0,0001$). Die Behandlung mit Leupeptin hatte keinen Effekt auf die Häm in-induzierte Aggregation (Kontrolle versus Leupeptin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $81,2 \pm 5,7$ % vs. $82,2 \pm 9,2$ %, $p = 0,999$). CRP-XL führte zu einer Aggregation der Thrombozyten von $68,1 \pm 16,8$ % (Kontrolle: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.). Diese Aggregation konnte durch Behandlung mit SSM3 nicht reduziert werden (Kontrolle versus 25 μM SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $68,1 \pm 16,8$ % vs. $75,5 \pm 4,2$ %, $p = 0,5$). Die Behandlung mit Leupeptin hatte ebenfalls keinen Effekt auf die CRP-XL-induzierte Aggregation (Kontrolle versus Leupeptin: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $68,1 \pm 16,8$ % vs. $63,02 \pm 22,09$ %, $p = 0,69$).

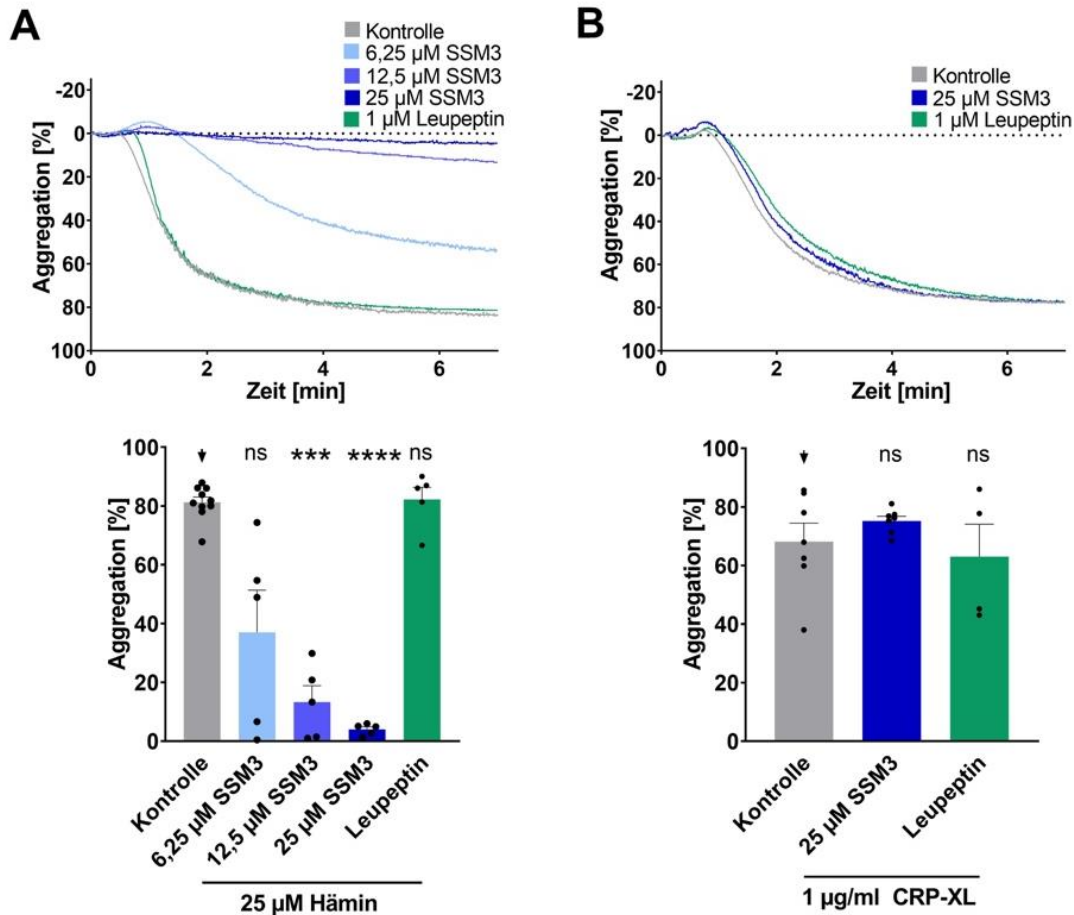


Abbildung 28: Beeinflussung der Hämin-induzierten Aggregation von Thrombozyten durch Hämin. **A Obere Reihe** Repräsentative Hämin-induzierte Thrombozytenaggregationskurve. Die Proben wurden aus isolierten Thrombozyten, Fibrinogen und Kalzium hergestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min entweder mit SSM3 in Konzentrationen von 6,25 μ M bis 25 μ M oder mit 1 μ M Leupeptin vorinkubiert. Als Häminkonzentration wurde 25 μ M verwendet ($n \geq 5$). **Untere Reihe** Statistische Analyse der Hämin-induzierten Thrombozytenaggregation ($n \geq 5$). **B Obere Reihe** Repräsentative CRP-XL-induzierte Thrombozytenaggregationskurve. Die Proben wurden aus isolierten Thrombozyten, Fibrinogen und Kalzium hergestellt. Die isolierten Thrombozyten wurden für 10 min entweder mit 25 μ M SSM3 oder mit 1 μ M Leupeptin vorinkubiert. Als CRP-XL-Konzentration wurde 1 μ g/ml verwendet ($n \geq 4$). **Untere Reihe** Statistische Analyse der CRP-XL-induzierten Thrombozytenaggregation ($n \geq 4$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: one-way ANOVA; Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle \downarrow ; ns=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.5.2 Furin beeinflusst die Hämin-induzierte *in vitro* Thrombusformation

Der folgende Versuch wurde durch Dr. M. Kremser durchgeführt.

Um die funktionellen Aspekte von Furin auf die Hämin-induzierte Aktivierung von Thrombozyten zu bestimmen, erfolgte die Perfusion von isolierten Thrombozyten auf

immobilisiertem Kollagen und die *in vitro* Thrombusformation bei Scherraten von 500 s⁻¹ wurde durch Mikroskopie visualisiert und bestimmt.

Hämin induzierte im Vergleich zur Kontrolle ohne Hämin eine erhöhte Thrombusformation (Kontrolle versus 6,25 µM Hämin: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 0,02±0,02 % vs. 0,4±0,1 %, p=0,003). Hemmung von Furin durch SSM3 reduzierte die Hämin-induzierte Thrombusformation signifikant (6,25 µM Hämin versus 6,25 µM Hämin+SSM3: arithmetischer Mittelwert ± S.D.: 0,4±0,1 % vs. 0,02±0,01 %, p=0,005). Als Versuchskontrolle wurden isolierte Thrombozyten mit 25 µM SSM3 für 10 min inkubiert. Dies führte zu keinem Effekt im Vergleich zu den isolierten Thrombozyten.

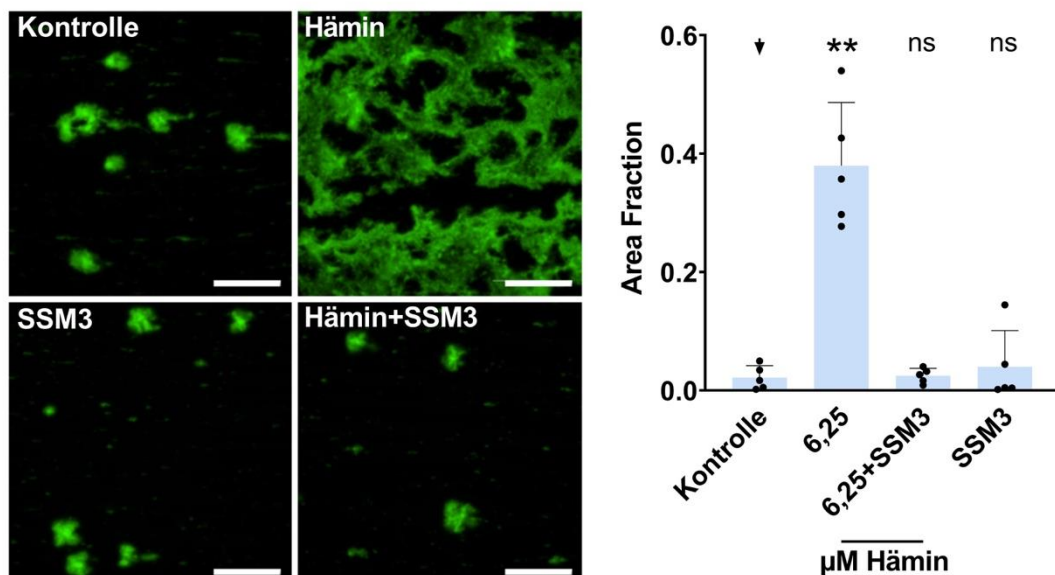


Abbildung 29: Beeinflussung der Hämin-induzierten Thrombusformation *in vitro* durch Furin. Links Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen der Thrombusformation durchgeführt mit isolierten Thrombozyten. Die Proben wurden behandelt mit 6,25 µM Hämin und vorinkubiert für 10 min 25 µM SSM3. Skala: 200 µM Rechts Statistische Analyse der Thrombusformation (n=5). Details: Dargestellt: Mittelwert± S.D. Statistik: one-way ANOVA, Tukey's Mehrfachvergleichstest; Statistik für jede Probe bezieht sich auf die Kontrolle ↓; ns=nicht signifikant; ** p<0.01.

3.6 Hämin-induzierte Produktion von ROS und Phosphatidylserin-Oberflächenexpression und Modulation der ROS Produktion durch Furin bei niedriger Hämin-Konzentration

Um den Einfluss von Hämin auf die Produktion von ROS sowie die Beeinflussung durch Furin zu bestimmen, wurden isolierte Thrombozyten mit dem Furin-Inhibitor

SSM3 für 10 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung durch Hämin, in den Konzentrationen 3,1 μM bis 25 μM , sowie die Färbung mit Farbstoff DCF DA, um ROS darzustellen für 30 min. Die Bestimmung der Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt Hämin signifikant zur Produktion von ROS (0 μM Hämin Kontrolle versus 25 μM Hämin Kontrolle: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $8,01 \pm 1,75$ % vs. $71,18 \pm 18,24$ %, $p=0,0047$). Interessanterweise führt die Furin-Inhibition durch SSM3 zur Reduktion der ROS-Produktion bei niedrigen Häminkonzentrationen (3.1 μM Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $28,4 \pm 8,96$ % vs. $23,21 \pm 7,04$ %, $p=0,019$; 6,25 μM Hämin: Kontrolle versus SSM3: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $59,6 \pm 18,76$ % vs. $38,1 \pm 14,86$ %, $p=0,015$).

Der Furin-Inhibitor SSM3 hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die ROS-Produktion bei Aktivierung der Thrombozyten durch 25 μM Hämin.

Um den Einfluss von Hämin auf die Oberflächenexpression von Phosphatidylserin und somit der Einleitung der Apoptose sowie die Beeinflussung durch Furin zu bestimmen, wurden isolierte Thrombozyten mit dem Furin-Inhibitor SSM3 für 10 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Aktivierung durch Hämin, in den Konzentrationen 3,1 μM bis 25 μM , sowie die Färbung mit α -Annexin V FITC für 30 min. Die Bestimmung der Oberflächenexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Wie bereits in der Literatur beschrieben, führt Hämin signifikant zur erhöhten Phosphatidylserin-Oberflächenexpression repräsentiert durch die Annexin V-Bindung (0 μM Hämin Kontrolle versus 25 μM Hämin Kontrolle: arithmetischer Mittelwert \pm S.D.: $1,68 \pm 0,28$ % vs. $5,37 \pm 2,04$ %, $p=0,028$). Die Furin-Inhibition durch SSM3 hat keinen signifikanten Effekt auf die Phosphatidylserin-Oberflächenexpression in Hämin-aktivierten Thrombozyten.

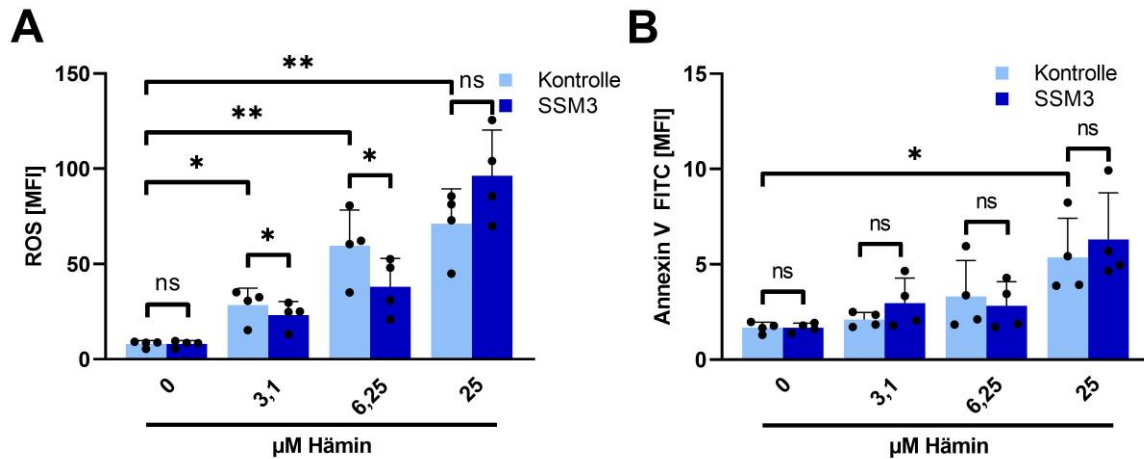


Abbildung 30: Hämhin-induzierte Produktion von ROS und Phosphatidylserin-Oberflächenexpression und Modulation dieser durch Furin. A Statistische Analyse der ROS-Oberflächenexpression nach Aktivierung mit Hämhin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM und Vorinkubation der Thrombozyten mit 25 μM SSM3 für 10 min ($n=4$). **B** Statistische Analyse der Annexin V-Bindung repräsentativ für die Phosphatidylserin-Expression nach Aktivierung mit Hämhin in Konzentrationen von 3,1 μM bis 25 μM und Vorinkubation der Thrombozyten mit 25 μM SSM3 ($n=4$). Details: Dargestellt: Mittelwert \pm S.D.; Statistik: gepaarter Student's *t*-Test; ns=nicht signifikant; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Hauptergebnisse dieser Dissertation sind [66]:

- i. Hämin induziert die Aktivierung von Thrombozyten sowie die *in vitro* Thrombusformation auf immobilisiertem Kollagen.
- ii. Die Aktivierung der Thrombozyten mit Hämin verringert die Oberflächenexpression des Kollagenrezeptors GPVI durch Ektodomänen-Shedding.
- iii. Das Hämin-induzierte Ektodomänen-Shedding von GPVI ist abhängig von Furin und unabhängig von ADAM10 und ADAM17.
- iv. Das Furin-abhängige GPVI Ektodomänen-Shedding ist unabhängig vom thrombozytenaktivierenden ITAM-Signalweg von GPVI und CLEC-2.

Die beschriebenen Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation implizieren, dass Hämin, im Gegensatz zu anderen klassischen Thrombozytenagonisten wie CRP-XL, ADP und Thrombin, eine Furin-abhängige Spaltung von GPVI induziert und weiterführend zur Degradation zusätzlicher Oberflächenrezeptoren von Thrombozyten führt [66]. Dies kann ein wichtiger prothrombotischer Mechanismus in Krankheiten mit umfangreicher Hämolyse sein [66].

4.2 Diskussion der Methoden

Die innerhalb dieser Dissertation durchgeführte und aufgezeigte Studie stellt in Gänze *in vitro* Versuche dar. Eine Überprüfung im Rahmen tierexperimenteller Versuche oder Experimente *in vivo* ist nicht erfolgt. Die Übertragung der gewonnenen Kenntnisse auf die *in vivo* Situation, ebenso wie die Ableitung möglicher klinischer Konsequenzen muss daher mit Vorsicht erfolgen und die Einschränkung des *in vitro* Versuchsaufbaus berücksichtigen.

Zur Durchführung der in den vorherigen Kapiteln beschriebenen Experimente, wurden humane Thrombozyten von gesunden Probanden verwendet. Es scheint jedoch denkbar, dass Thrombozyten *in vivo* im Falle von hämolytischen Krankheiten eine veränderte Anfälligkeit gegenüber Furin sowie abgewandelte funktionelle Aspekte

aufweisen. Mögliche Diskrepanzen zwischen Proben von gesunden Probanden und Patienten mit hämolytischen Erkrankungen werden durch den vorliegenden Versuchsaufbau nicht berücksichtigt, sollten jedoch für weitere Verwendungen der Daten bedacht werden.

Für die im Rahmen dieser Dissertation erfolgten Experimente, wurden isolierte Thrombozyten eingesetzt. Der Grund hierfür sind die zu erforschenden intrinsischen Eigenschaften und Reaktionen der Thrombozyten und des Kollagenrezeptors GPVI auf Hämin ohne Beeinträchtigung durch die Umgebung wie das Blutplasma und der darin enthaltenen Plasmaproteine und Koagulationsfaktoren [102]. Bei gesunden Menschen werden freies Hämoglobin und Häm normalerweise von den Plasmaproteinen Haptoglobin, Hämopexin sowie Albumin abgefangen, um die schädlichen Auswirkungen extrazellulärer Hämoglobinvarianten einzugrenzen [13, 22, 108, 177]. Fink *et al.* zeigte, dass in Versuchen mit Hämin und *platelet poor plasma* (PPP) und Vollblut die Wirkung von Hämin auf die Thrombozyten praktisch nicht vorhanden war [66].

Isolierte Thrombozyten wurden im Tyrode-HEPES-Puffer mit physiologischem pH-Wert resuspendiert und beinhalten somit durch ihre Herstellung eine plasmaitone Kalziumkonzentration von 2 mM [47]. Im Rahmen der Thrombozytenforschung wird alternativ PRP aus Citrat-antikoaguliertem Blut gewonnen [47, 102]. PRP weist eine limitierte Stabilität auf und beinhaltet Plasmaproteine, welche Experimente beeinflussen können [47]. Es gilt somit zu berücksichtigen, dass die im Rahmen dieser Studie erfolgten Experimente und die hieraus gewonnenen Erkenntnisse mit Sicherheit lediglich auf isolierte Thrombozyten zutreffen. Interaktionen und Prozesse, die physiologischerweise *in vivo* zwischen Thrombozyten und weiteren Zellarten, dem Blutplasma und dessen Bestandteilen erfolgen, werden in dieser Studie nicht erfasst.

Jedoch kann insbesondere bei Patienten mit einer schweren hämolytischen Krise die freie Häminkonzentration im Blutplasma auf bis zu 50 μM ansteigen [171, 214]. Es wird somit spekuliert, dass während einer Hämolyse oder nach einer muskelschädigungsinduzierten Myoglobinfreisetzung (z.B. im Herz- oder Skelettmuskel) die lokale Häminkonzentration in kleinen Gefäßen die Pufferkapazität des Blutes übersteigt und es dadurch zu einer lokalisierten Wirkung von Hämin auf die Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Thrombusbildung kommen kann [66].

Bezüglich der verwendeten Puffer wurden die Experimente so gestaltet, dass die Versuchsbedingungen dem physiologischen System möglichst nahekommen. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Thrombozyten bei Raumtemperatur isoliert und inkubiert wurden. Messungen erfolgten ebenfalls, mit Ausnahme der Lichttransmissionsaggregometrie, bei Raumtemperatur. Eine durchgehende Lagerung sowie Verwendung der Thrombozyten bei 37 °C hätte einen wesentlich umfangreicheren und erschwerten Versuchsaufbau erfordert.

Alle Experimente der jeweiligen Versuchsreihe fanden unter Einschluss von Kontrollgruppen statt und wurden mehrfach mit Verwendung von Thrombozyten verschiedener Probanden wiederholt. Dies dient dazu, dass verfälschte und abweichende Messwerte erkannt werden und das Risiko fehlerhafter und ungültiger Ergebnisse minimiert wird.

Zur Ergebnisfindung im Bereich des Themas dieser Dissertation fanden in der Thrombozytenforschung etablierte und validierte Methoden ihre Anwendung [152, 173, 206, 263]. Die Durchflusszytometrie einschließlich der Fluoreszenzfärbungen ist eine gängige Methode zur Zellvermessung und diente in dieser Dissertation dem Nachweis und der Anzahl von bestimmten Oberflächenrezeptoren [19, 146, 232, 263]. Die Markierung der Thrombozyten mit Fluoreszenzfarbstoffen sowie die durchflusszytometrische Messung wurden anhand von modifizierten und validierten Protokollen durchgeführt. Bei der Lichttransmissionsaggregometrie sowie der *in vitro* Thrombusformation handelt es sich um gängige und etablierte Methoden zur funktionellen Untersuchung der Thrombozyten, welche nach modifizierten Versuchsprotokollen durchgeführt wurden [35, 152, 173]. Bei der *in vitro* Thrombusformation auf immobilisiertem Kollagen wurden als Abweichung vom Standardprotokoll statt Vollblut isolierte Thrombozyten verwendet, um das Binden und damit das Neutralisieren von Hämin durch die Plasmaproteine Haptoglobin, Hemopexin und Albumin zu verhindern [13, 22, 108, 177]. Im Vergleich zu Vollblut, ist die Aggregatformation der isolierten Thrombozyten weniger prominent. Dies könnte an der herstellungsbedingten Entfernung der Kofaktoren sowie den Unterschieden in der Viskosität zwischen Vollblut und wässrigen Lösungen, wie isolierten Thrombozyten, liegen. Immunoblots dienen dem Nachweis von Proteinen auf einer Trägermembran und sind ebenfalls eine etablierte und gängige Methode in der Thrombozytenforschung [206]. Zur Herstellung der Lysate für die Immunoblots erfolgte abweichend vom

Standardprotokoll die zusätzliche Sonifizierung der Proben, um eine effizientere Lyse der Thrombozyten zu garantieren.

Thrombozytenstimulationsversuche durch Hämin weisen je nach Methode unterschiedliche Inkubationsintervalle auf. Die durchgeführte Western-Blot-Analyse weist erhöhte Konzentrationen des sGPVI in Proben bereits nach 30 Minuten nach, was den GPVI-Durchflusszytometrie-Messungen entspricht. Nach 60 min und 120 min waren diese Signale im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen deutlich erhöht. Der Unterschied in der sGPVI-Erkennung zwischen den Daten der Durchflusszytometrie und den Immunoblots liegt in den unterschiedlichen GPVI-Untergruppen, die von den beiden Methoden erfasst werden. Mit der Durchflusszytometrie wird nur die Oberflächenexpression von GPVI auf Thrombozyten nachgewiesen, so dass die Verringerung der Oberflächenpräsentation durch das Hämin-induzierte Shedding deutlicher wird und der Verlust der Oberflächenexpression bereits nach 30 Minuten sichtbar ist. Vor dem Nachweis durch Immunoblots werden die Thrombozyten nach der Behandlung mit Hämin und gegebenenfalls SSM3 lysiert. Dabei werden auch die GPVI-Moleküle in den intrazellulären GPVI-Speichern im kanalikulären System und in den α -Granula nachgewiesen [242]. Eine Diskrepanz zwischen der durchflusszytometrisch ermittelten GPVI-Dichte pro Thrombozyt (3.730 ± 453 Rezeptoren) und einer geschätzten dreimal höheren Gesamtmenge an GPVI pro Thrombozyt auf der Grundlage quantitativer Proteomanalysen (ca. 9.600 Rezeptoren) wurde bereits früher festgestellt [29, 43, 242]. Diese hohe Menge an unbeeinflusstem, gespeichertem GPVI könnte das Hämin-induzierte Shedding von GPVI und die sGPVI-Produktion im Immunoblot maskieren [66].

Eine zusätzliche, durchaus relevante Methode, die weitere Erkenntnisse über die Furin-modulierte GPVI-Spaltung ermöglichen würde, ist die Bestimmung der Furinaktivität auf Hämin-aktivierten Thrombozyten via eines Furinaktivitätsassays. Experimente, um die Furinaktivität in Thrombozyten oder in *activated platelet supernatant* (APS) zu bestimmen, wurden in der Literatur als erfolgreich beschrieben [138]. Analog dazu wurden Versuchsansätze im Rahmen dieser Dissertation mit dem pERTKR-AMC Fluorogenic Peptide Substrate (#ES013, biotechne, Minneapolis, Minnesota, USA) gestartet. Limitierend wirkte jedoch der Agonist Hämin, welcher als Farbstoff das AMC Fluoreszenz Signal von 380 nm / 460 nm beeinflusste und somit die Furinaktivität verfälschte [185]. Eine Verdünnung des Farbstoffes oder das Entfernen von Hämin nach Aktivierung der Thrombozyten war nicht erfolgreich.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Prothrombotische Zustände sind in Patienten mit hämolytischen Erkrankungen, wie der SCD und der PNH, eine bekannte Komplikation und folglich können vermehrt Stillstände in der Mikrozirkulation und Organversagen auftreten [15, 16, 274]. Die Mechanismen der Hyperkoagulabilität bei hämolytischen Erkrankungen sind multifaktoriell [15].

Die abnormale Phosphatidylserinexpression von Erythrozyten beeinflusst enzymatische Komplexe welche die Koagulation regulieren, adhäsive Eigenschaften der Erythrozyten sowie die hämostatische Zusammensetzung des Bluts [33, 223-225, 276]. Im Blut zirkulierende Mikropartikel ausgehend von Erythrozyten, Thrombozyten, Endothelzellen und Monozyten, korrelieren in Patienten mit SCD mit hämostatischen Markern wie D-Dimer, Thrombin-Antithrombin-Komplexen und Prothrombin Fragmenten 1 und 2 und vermögen zur Hyperkoagulabilität beizutragen [97, 109, 190, 226, 227]. Zusätzlich ist der Gewebefaktor (*tissue factor*) auf Endothelzellen in Patienten mit SCD und weiteren hämolytischen Erkrankungen vermehrt exprimiert [140, 222, 229, 274]. Im Rahmen der Hämolyse kommt es zur verminderten Verfügbarkeit von Stickoxid, einerseits bindet freies Hämoglobin vermehrt Stickoxid, andererseits kommt es zur Freisetzung von erythrozytärer Arginase, welche das zur Stickoxidsynthese notwendige L-Arginin in Ornithin umwandelt [92, 169]. Stickoxid reguliert physiologisch den Gefäßtonus und hemmt die Thrombozytenaktivierung [196, 197, 248]. Häm und Hämin als Hämoglobindegradationsprodukt führen zur Aktivierung von Thrombozyten und beeinflussen so ebenfalls den prothrombotischen Zustand in hämolytischen Erkrankungen [104, 176].

Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Einfluss des Hämolyseprodukts Hämin auf Thrombozyten und speziell den Kollagenrezeptor GPVI erforscht. Kürzlich wurde gezeigt, dass Häm Thrombozyten aktiviert und das Rhabdomyolyse-induzierte Nierenversagen negativ beeinflusst durch die Rezeptoren CLEC-2 und GPVI [184]. Zusätzlich erforschten Bourne *et al.* 2021, dass Häm die humane und murine Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Thrombusformation durch den CLEC-2 ITAM-Signalweg induziert [38].

Die durch diese Dissertation erhobenen Daten bestätigen und führen die Rolle von Hämin für die Thrombozytenaktivierung weiter aus [38, 176, 184]. Hämin ist neben

dem klassischen Agonisten CRP-XL ein starker Aktivator für Thrombozyten und induziert die Degranulation, Thrombozytenaggregation und *in vitro* Thrombusformation auf immobilisiertem Kollagen [38]. Weiterhin führt Hämin zur konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von Syk und PLC γ 2, was anzeigt, dass die ITAM-Signalkaskade von GPVI und CLEC-2 deutlich beeinflusst wird [38]. Dieses Erkenntnis wird verstärkt durch die Abhängigkeit der Hämin-induzierten Aggregation von Syk und Src sowie der *in vitro* Thrombusformation von Src [38]. Abbildung 31 fasst den aus der bereits vorhandenen Literatur und aus den Ergebnissen dieser Dissertation postulierten thrombozytären Signalweg von Hämin zusammen [38, 66, 184].

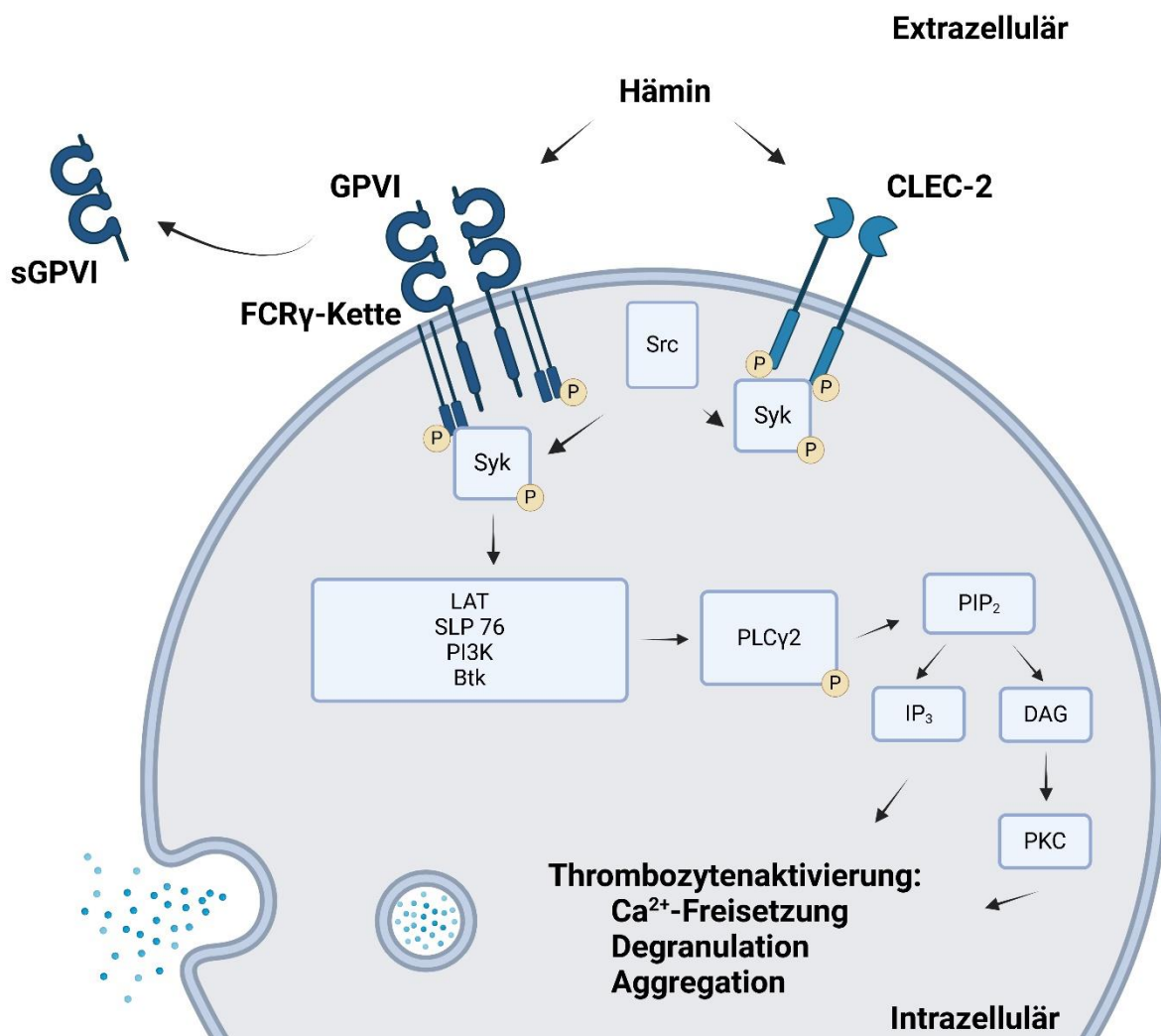


Abbildung 31: Schematische Zeichnung der postulierten Hämin-induzierten Thrombozytenaktivierung durch den ITAM-Signalweg abwärts von CLEC-2 und GPVI. Die Bindung von Hämin an die Rezeptoren GPVI und CLEC-2 führt zur Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen ITAM/hemi-ITAM-Domäne durch Kinasen der

Src-Familie. Daraufhin folgt die Bindung an die SH2-Domänen der Tyrosinkinase Syk, was zu deren Aktivierung führt. Nachgeschaltete Adaptor- und Signalproteine wie LAT, SLP76, PI3-Kinase und Btk werden aktiviert und führen dann zur Aktivierung des Haupteffektorproteins PLC γ 2. Dies führt zur Aktivierung der PKC und Mobilisierung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher, was in der Thrombozytenaktivierung resultiert. Infolge der Hämin-induzierten Aktivierung der Thrombozyten kommt es zum Ektodomänen-Shedding von GPVI, jedoch nicht von CLEC-2. Created with BioRender.com. [38, 66]

Durchflusszytometriemessungen im Rahmen dieser Studie zeigten, dass die Oberflächenexpression von GPVI auf Stimulation mit Hämin konzentrationsabhängig wesentlich abnimmt, nicht jedoch auf Stimulation mit dem klassischen Agonisten CRP-XL.

Bender *et al.* beschrieb 2010, dass die Ektodomäne von GPVI durch bestimmte Stimuli abgespalten wird und dieser Prozess im murinen Organismus abhängig von Metalloproteasen, speziell ADAM10 und ADAM17, und einer dritten bislang nicht identifizierten Protease ist [23]. Die Spaltung von GPVI an der extrazellulären Domäne resultiert in einem 55 kDa sGPVI und einem 10 kDa membranassoziierten Fragment [23, 79]. Mitochondrielle Schädigung von murinen Thrombozyten durch carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone CCCP induziert die proteolytische Spaltung von GPVI durch ADAM17 [23, 26, 79]. Inkubation von GPVI Agonisten wie Kollagen, Convulxin und CRP-XL sowie Calmodulininhibitor W7 mit humanen Thrombozyten führt ebenfalls zur Abspaltung eines 55 kDa löslichen GPVI-Fragments, welche durch den Breitspektrum-Metalloproteaseinhibitor GM6001 verhindert werden kann [79]. ADAM10 vermitteltes Ektodomänen-Shedding von GPVI erfolgt durch Behandlung der murinen Thrombozyten W7 *in vitro*, sowie im humanen Organismus durch Koagulationsfaktor Xa und pathologisch hohe Scherraten [2, 3, 23]. Bislang unbekannt ist jene Protease, welche die *in vivo* im murinen Organismus beobachtete JAQ1 Antikörper-induzierte Spaltung von GPVI auslöst, die unabhängig von ADAM10 und ADAM17 erscheint [23].

Aus bereits bekannter Literatur, lässt sich die Hämin-induzierte Reduktion der GPVI Oberflächenexpression potenziell in der Spaltung der Ektodomäne von GPVI erklären [2, 3, 23, 26, 79]. Immunoblot-Experimente bestätigen das Vorhandensein einer 55 kDa Bande, welche mit der bereits beschriebenen sGPVI Form übereinstimmt [23]. Die Menge des detektierten sGPVI korreliert mit der Inkubationszeit der Thrombozytenaktivierung durch Hämin. Fink *et al.* gelang es, zusätzlich zu dem sGPVI

Fragment, das korrespondierende GPVI-Fragment in der Membran bei den zuvor beschriebenen 10 kDa und dessen Zunahme durch Häminstimulation darzustellen [66]. Die in der Durchflusszytometrie beobachtete Abnahme der GPVI-Oberflächenexpression und das Auftreten eines degradierten GPVI-Fragments in den Immunoblots spricht somit dafür, dass Hämin zu Ektodomänen-Shedding von GPVI führt.

Fink *et al.* bestätigen das Vorkommen von Hämin-induziertem Ektodomänen-Shedding von GPVI weiterhin durch Methode des *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) [66]. Hierzu wurde sGPVI im Überstand aus Proben von Hämin-aktivierten Thrombozyten nachgewiesen und eine konzentrationsabhängige signifikante Zunahme von sGPVI im Überstand von mit Hämin aktivierten Thrombozyten festgestellt [66]. Darüber hinaus wurde im kleinen Rahmen (n=10) untersucht, ob GPVI-Shedding auch in Patienten mit Hämolyse vorkommt [66]. Tatsächlich war in den Proben mit Hämoglobinlevel über 5 mg/dl im Serum der sGPVI-Anteil erhöht, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz [66]. Um diese Tendenz zu verifizieren sind größere klinische Studien notwendig [66].

Um weiterhin die bei der Hämin-induzierten ektodomänen Spaltung von GPVI involvierten Proteasen einzugrenzen, erfolgten durchflusszytometrische Inhibitorversuche. Neben Inhibitoren gegen übliche Breitspektrum-Proteasen (Protease Inhibitor Cocktail, Leupeptin, Pepstatin A) wurden auch die allgemeinen Metalloproteaseinhibitoren Doxycyclin, EDTA und die spezifischen Metalloproteaseinhibitoren GM6001 sowie der ADAM10-Inhibitor GI254023X getestet. Fink *et al.* testete zusätzlich den Effekt des spezifischen ADAM17-Inhibitors TAPI-0, welcher ebenfalls keine Beeinflussung der Hämin-abhängigen Reduktion der GPVI Oberflächenexpression bewirkte [66, 236]. Die Ergebnisse dieser Dissertation in Kombination mit der Studie von Fink *et al.* ergeben, dass die Hämin-induzierte GPVI-Degradation unabhängig von gewöhnlichen Breitspektrum Proteinase und Metalloproteinase einschließlich ADAM10 und ADAM17 ist [66]. Somit muss, wie bereits in der Literatur hypothetisiert, ein weiter Mechanismus vorhanden sein, welcher zum humanen Hämin-induzierten Ektodomänen-Shedding von GPVI führt [23].

Furin ist ein Mitglied der *subtilisin-like proprotein convertase* Familie und wird in Thrombozyten exprimiert [139]. Die Hauptfunktion dieser Enzymfamilie ist die Aktivierung von Proteinen aus ihrer Proproteinform in ein Propeptid und das reife

Protein durch enzymatische Spaltung [175]. Auf Thrombozytenaktivierung mit dem klassischen Agoisten CRP-XL wird Furin aktiviert und die Oberflächenexpression wird gesteigert [138]. Durchflusszytometrierversuche im Rahmen dieser Dissertation zeigten ebenfalls, dass die Furinoberflächenexpression konzentrationsabhängig auf Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung signifikant erhöht ist.

Furin beeinflusst die Aktivität von multiplen Rezeptoren wie zum Beispiel den G-Protein gekoppelten Rezeptor GRP37 und den *insulin-like growth factor receptor* (IGF-IR) [142, 157, 219, 220, 245]. Thomas *et al.* beschrieb 2002, dass Furin ADAM10 und ADAM17 aktiviert, wobei diese wiederum beschriebene Sheddasen für GPVI sind [23, 245].

Zusätzlich besitzt die extrazelluläre Domäne von GPVI die minimal notwendige Sequenz (Arg-X-X-Arg) einer Furin Schnittstelle an der Aminosäureposition 140-143 (R-W-Y-R) [66] (Tabelle 8, Abbildung 32). Somit könnte Furin möglicherweise direkt in die GPVI-Spaltung involviert sein. Ausgehend von dieser Annahme wurde weitergehend der Einfluss von Furin auf die Hämin-induzierte GPVI Degradation untersucht.

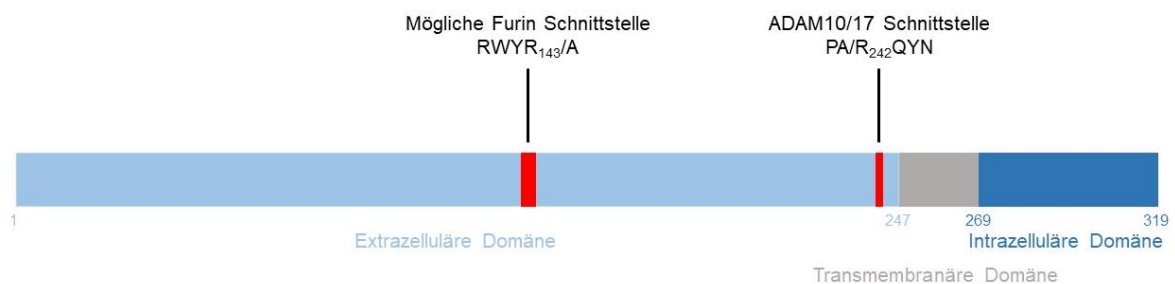


Abbildung 32: Mögliche Furin Schnittstellen in GPVI modifiziert nach [66]
 Schematische Darstellung von GPVI ohne Signalpeptide mit den verschiedenen Domänen und der möglichen Furin Schnittstelle sowie der ADAM10/17 Schnittstelle.

Durchflusszytometrische Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass der spezifische Furininhibitor SSM3 in der Konzentration 25 μ M den durch Hämin induzierten Verlust der GPVI Oberflächenexpression wesentlich und signifikant reduziert, wohingegen SSM3 keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von GPVI auf Stimulation mit klassischen Aktivatoren wie Thrombin, CRP-XL und ADP hat. Die verwendete SSM3 Konzentration von 25 μ M wurde sowohl experimentell als auch durch Literaturrecherche bestimmt [51, 122, 200]. Die vom Hersteller angegebene EC50

Konzentration des Inhibitors SSM3 für Furin liegt bei 54 nM, ist jedoch in der zugänglichen Literatur nicht begründbar. Jiao *et al.* sowie Remacle *et al.* verwendeten SSM3 in Konzentrationen innerhalb von 1-100 μM (1-25 μM in *in vitro* Assays und 10-100 μM in zellbasierten Assays und *in vivo* Studien) [122, 200]. Cheng *et al.* setzte 2020 in zellbasierten Versuchen SSM3 Konzentrationen von 25 μM ein [51]. Aufgrund der großen Reichweite verwendeter SSM3 Konzentrationen wurde durch eine Konzentrationsreihe die optimale Wirkkonzentration von 25 μM für SSM3 in Kombination mit Hämin und Thrombozyten bestimmt. Im nM- bis niedrigen μM -Bereich waren keine hemmenden Einflüsse von Furin auf die Hämin-induzierte GPVI-Degradation zu erkennen. Eine weitere Erhöhung der SSM3 Konzentration über 50 μM wurde als zelltoxisch beschrieben und daher vernachlässigt [200].

Fink *et al.* haben zusätzlich zum Furininhibitor SSM3 einen weiteren kommerziell erhältlichen Furininhibitor, Hexa-D-Arginine verwendet, um die Wirkung von SSM3 zu kontrollieren und den hemmenden Effekt von Furin auf das Hämin-induzierte GPVI-Shedding weitergehend zu bestätigen [66]. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven Furin-Inhibitor mit einer starken Präferenz für Furin und geringen Off-Target-Effekten auf PACE4 und PC112-15 [51]. Hexa-D-Arginine führte als Furin-Inhibitor in den Konzentrationen 10 und 25 μM , wie hypothetisiert, ebenfalls zur signifikanten Hemmung der durch Hämin reduzierten GPVI-Oberflächenexpression auf Thrombozyten [66].

Die Erkenntnis, dass SSM3 die Hämin-abhängige Oberflächenreduktion von GPVI reduziert, wird durch Immunoblots ausgeweitet und bekräftigt: Auf Häminstimulation nahm die GPVI-Bande bei ca. 65 kDa in einer zeitlichen Abhängigkeit ab und eine korrespondierende sGPVI-Bande bei ca. 55 kDa wurde sichtbar, wohingegen auf Häminstimulation in Kombination mit Furininhibition durch SSM3 die sGPVI-Bande im Vergleich zur Häminkontrolle abnahm. Fink *et al.* gelingt es hier ebenfalls das korrespondierende GPVI-Fragment und dessen Abnahme durch SSM3 im Vergleich zur Häminkontrolle darzustellen [66]. Zusätzlich induzierte die Zugabe von rekombinantem Furin zu humanen Thrombozyten das Auftreten einer sGPVI-Bande bei 55 kDa und somit Ektodomänen-Shedding von GPVI. Hieraus lässt sich schließen, dass das Hämin-induzierte Ektodomänen-Shedding von GPVI Furin vermittelt stattfindet.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse sind die von Fink *et al.* durchgeführten ELISA-Versuche zur Detektion des sGPVI-Fragments aus mit Hämin aktivierten Überständen und der Einfluss von SSM3 hierauf von großer Relevanz [66]. Die Menge von sGPVI im Überstand aus Proben von Hämin-aktivierten Thrombozyten wird durch Behandlung mit SSM3 signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrolle ohne SSM3 [66].

Es ist jedoch nicht bekannt, ob Furin direkt GPVI spaltet oder wiederum eine GPVI-Sheddase beeinflusst und somit indirekt zum Ektodomänen-Shedding von GPVI beiträgt. Abbildung 32 zeigt die potenzielle Furinschnittstelle an der extrazellulären Domäne von GPVI. Jedoch korrespondiert die in den Immunoblots detektierbare 55 kDa sGPVI-Bande nicht mit dem sich aus der potenziellen Schnittstelle von Furin ergebenden GPVI-Fragment, welches wesentlich kleiner sein müsste (15,49 kDa ohne Glykosilierung, vermutlich 44 kDa mit Glykosilierung). Das in den Ergebnissen beschriebene 55 kDa sGPVI-Fragment stimmt mit den in der Literatur beschriebenen durch ADAM10 und ADAM17 gespaltenen sGPVI überein [2, 3, 23, 26, 79]. Bender *et al.* spekulierte bereits 2010 über eine unbekannte, dritte GPVI-spaltende Protease, da Inhibition von ADAM10 und ADAM17 im murinen Organismus das GPVI-Shedding nicht vollständig verhinderte [23]. Im Rahmen dieser Dissertation wird hieraus hypothetisiert, dass Furin eindeutig das Potenzial hat, ein anderes derzeit unbekanntes Enzym oder einen anderen Signalweg zu aktivieren oder zu modulieren, das bzw. der dann die Hämin-induzierte GPVI Degradation vermittelt [66]. Um den genauen Mechanismus der Beteiligung von Furin, direkt oder indirekt, in der Hämin-induzierten GPVI-Spaltung zu erforschen, sind weitere Studien notwendig.

Für einige Zelltypen ist bekannt, dass Furin zwischen dem TGN, der Zelloberfläche und den Endosomen zyklisiert [162]. Bei diesem Furintransport spielt der, durch die CKII bestimmte, Phosphorylierungsgrad von Furin eine wichtige Rolle [162]. Die CKII ist somit eines der Enzyme, das Furin in den *Cycling Loops* hält, und ist notwendig für die Internalisierung von Furin in die Plasmamembran [245]. Um den Mechanismus der Furin-vermittelten GPVI-Spaltung weiter zu erforschen, wurde hypothetisiert, dass die CKII die Furinaktivität auf der Zelloberfläche reguliert und somit das Hämin-induzierte GPVI-Shedding beeinflusst. Die Inhibition der CKII durch CX-4945 zeigte keinen Effekt auf die durch Hämin modulierte Oberflächenexpression von Furin und reduziert

ebenfalls den Hämin-induzierten Verlust der GPVI-Oberflächenexpression nicht. Mögliche Gründe hierfür könnten eine insuffiziente Inkubationszeit des Inhibitors CX-4945 sein, weshalb sowohl 10 min (Vergleichbarkeit zur weiteren Thrombozyten-Inhibitoren) als auch 30 min gewählt wurden, oder ein abweichender Mechanismus für den Furintransport in Thrombozyten [6].

Weiterhin erfolgten Experimente im Rahmen von Immunoblots, Durchflusszytometrie und Aggregometrie, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem ITAM-Signalweg von GPVI und CLEC-2 und dem Hämin-induzierten GPVI-Shedding sowie Furin zu erkennen. Einerseits wurden Thrombozyten mit unterschiedlichen Häminkonzentrationen stimuliert und die lysierten Proben via Immunoblots auf den Phosphorylierungsgrad und damit auf den Aktivierungsgrad von Syk und PLC γ 2 untersucht. Die Häminkonzentrationen wurden gewählt, sodass mit 3,1 μ M eine Aktivierung der Thrombozyten ohne Shedding von GPVI und mit 25 μ M eine Aktivierung der Thrombozyten mit Shedding abgedeckt ist. Hämin phosphorylierte Syk und PLC γ 2 konzentrationsabhängig, bereits niedrige Häminkonzentrationen (kein Shedding) führten zur Phosphorylierung und hohe Häminkonzentrationen (Shedding) verstärkten dies weitergehend. Niedrige Häminkonzentrationen führten somit zur Bildung von pSyk und pPLC γ 2 im Rahmen der Aktivierungskaskade, ohne die Oberflächenexpression von GPVI zu verändern. Hieraus wird hypothetisiert, dass der klassische ITAM-Signalweg nicht in den Prozess der Hämin-induzierten GPVI Spaltung involviert ist. Weiterführend wurden Thrombozyten mit 25 μ M Hämin stimuliert sowie je nach Indikation mit SSM3 vorinkubiert und die lysierten Proben via Immunoblots auf den Phosphorylierungsgrad von Syk und PLC γ 2 untersucht. Furin-Inhibition durch SSM3 führt zu keiner Modulation der Furin-vermittelten Hämin-induzierten Veränderung des Phosphorylierungsgrades und damit des Aktivierungsgrades von Syk und PLC γ 2. Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression von GPVI nach Häminaktivierung sowie Inhibition von Src (PP2) und Syk (PRT060318) via Durchflusszytometrie bestimmt. Das Hämin-induzierte Shedding von GPVI wurde nicht durch PP2 und PRT060318 moduliert. Schlussfolgernd lässt sich aus den beschriebenen Daten zusammenfassen, dass die von Hämin ausgehende Thrombozytenaktivierung und -degranulation abhängig von der ITAM-Signalkaskade ist, wohingegen die Furin-induzierte Ektodomänenspaltung von GPVI unabhängig von der ITAM-Signalkaskade zu sein scheint (Abbildung 33) [38].

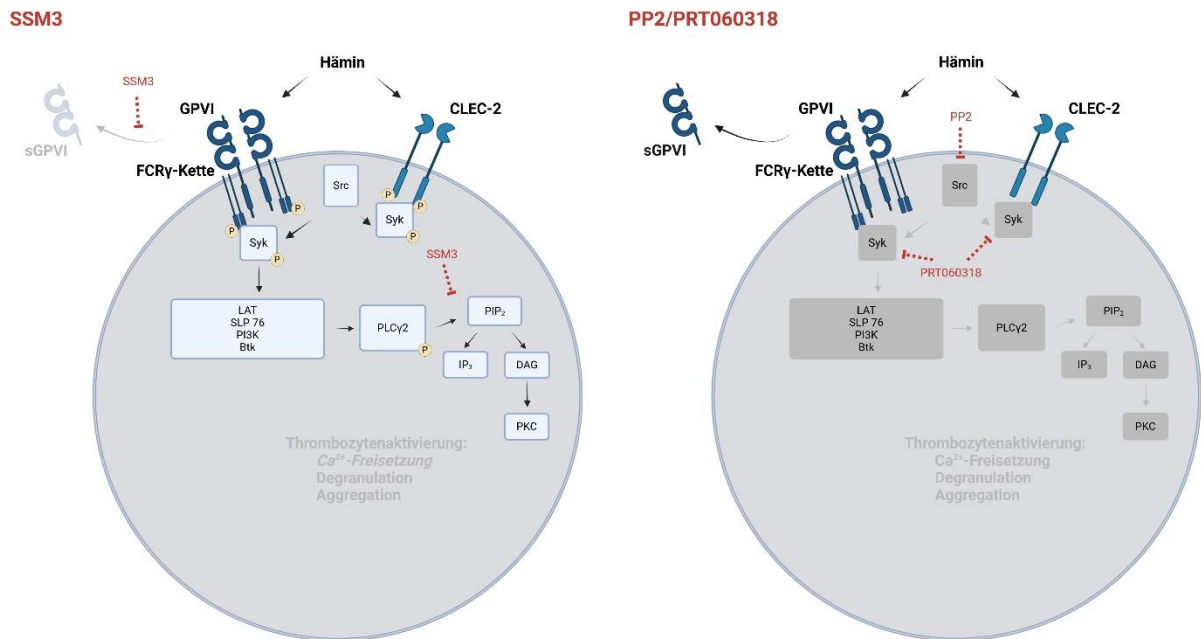


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Hämin-induzierten ITAM-abhängigen Aktivierung der Thrombozyten und der ITAM-unabhängigen, aber Furin-abhängigen, GPVI-Spaltung. Links Furin-Inhibition durch SSM3: Bindung von Hämin an die Rezeptoren GPVI und CLEC-2 führt zur Tyrosinphosphorylierung der jeweiligen ITAM/hemi-ITAM-Domäne durch Kinasen der Src-Familie. Daraufhin folgt die Bindung an die SH2-Domänen der Tyrosinkinase Syk, was zu deren Aktivierung führt. Nachgeschaltete Adaptor- und Signalproteine wie LAT, SLP76, PI3-Kinase und Btk werden aktiviert und führen dann zur Aktivierung des Haupteffektorproteins PLCy2. Dies führt zur Aktivierung der PKC. Eine Beeinflussung der Mobilisierung der intrazellulären Ca²⁺-Speicher muss in weiteren Versuchen erforscht werden. Furininhibition führt zur Beeinflussung der Aggregation und der Degranulation, was sich in der Reduktion der ATP-Freisetzung zeigt [66]. Furininhibition führt zur Reduktion des Hämin-induzierten Ektodomänen-Shedding von GPVI. **Rechts Src- und Syk- Inhibition durch PP2/PRT060318:** Die Signalkaskade abwärts von Src und Syk ist gehemmt, eine Thrombozytenaktivierung bleibt aus. In Folge der Hämin-induzierten Aktivierung der Thrombozyten kommt es trotz Src- und Syk-Inhibition zum Ektodomänen-Shedding von GPVI [38, 66]. Created with BioRender.com.

Um weiterhin die funktionelle Relevanz des Furin-abhängigen Hämin-induzierten GPVI Ektodomänen-Shedding zu prüfen wurden *in vitro* Thrombusformations- und Lichttransmissionsaggregometrieexperimente mit isolierten Thrombozyten durchgeführt. GPVI spielt eine zentrale Rolle in der Thrombozytenadhäsion an Kollagen sowie der Thrombozytenaktivierung und stellt ein mögliches antithrombotisches Ziel dar [55, 178]. Hämin führte zu einer erhöhten, konzentrationsabhängigen *in vitro* Thrombusformation in den Flusskammerexperimenten im Vergleich zur Kontrolle ohne Häminstimulation. Im Vergleich zu Vollblut war die Aggregatsformation der isolierten Thrombozyten weniger

prominent. Dies könnte an der herstellungsbedingten Entfernung der Kofaktoren sowie an Unterschieden in der Viskosität zwischen Vollblut und wässrigen Lösungen, wie es bei isolierten Thrombozyten der Fall ist, liegen. Behandlung mit SSM3 und damit Furininhibition reduzierte den prothrombotischen Effekt von Hämin signifikant auf Kontrollniveau. Fink *et al.* beschreibt zusätzlich, dass die Hämin-induzierte *in vitro* Thrombusformation durch Scr-Inhibitoren vollständig gehemmt wird und dieser Prozess somit abhängig von dem GPVI- und CLEC-2- ITAM-Signalweg ist [66].

Hämin hatte einen starken Effekt auf die Thrombozytenaggregation, welche ebenfalls durch SSM3 erheblich reduziert werden konnte, nicht jedoch auf die CRP-XL induzierte Thrombozytenaggregation. Fink *et al.* verwendete erneut einen weiteren Furin-Inhibitor Hexa-D-Arginine, welcher die Furin-Abhängigkeit der Hämin-induzierten Thrombozytenaggregation bestätigt [66]. Diese funktionellen Experimente deuten auf eine *in vitro* Furininhibition als ein mögliches pharmakologisches Ziel bezüglich prothrombotischer Konditionen hin. Lichttransmissionsaggregationsversuche mit Hämin und den Inhibitoren PP2 (Src) und PRT060318 (Syk) führten zur Reduktion der Hämin-induzierten Thrombozytenaggregation, hemmten jedoch auch die CRP-XL induzierte Aggregation [38, 66].

Die Inhibition des ITAM-Signalwegs von CLEC-2 und GPVI spiegelt somit die durch SSM3 reduzierte Hämin-induzierte *ex vivo* Thrombusformation sowie die Aggregation wider, jedoch beeinflussen die Syk- und Scr-Inhibitoren auch die CRP-induzierte Thrombozytenaggregation [66].

In Zusammenschau der oben geschilderten und durch Fink *et al.* beschriebenen Ergebnisse scheinen also zwei verschiedene Häminmechanismen vorhanden zu sein: der ITAM-Signalweg von CLEC-2 und GPVI, welcher zur Thrombozytenaktivierung, -degranulation und Thrombozytenaggregation führt und im Gegensatz hierzu der ITAM-Signalweg-unabhängige Weg, der zur Spaltung von Rezeptoren wie GPVI führt [66].

Als weiterer Aspekt wurde im Rahmen dieser Dissertation die ROS-Produktion und Phosphatidylserinexpression durchflusszytometrisch bestimmt, nachdem Thrombozyten mit Hämin aktiviert und mit dem Furininhibitor SSM3 vorinkubiert wurden. Wie bereits in der Literatur beschrieben induzierte die Häminstimulation die

ROS Produktion sowie die Phosphatidylserinexposition [38, 176]. Furininhibition durch SSM3 zeigte keinen Effekt auf die Phosphatidylserinexpression, hemmte jedoch die ROS-Produktion signifikant. Dies ist ein interessanter Befund, da es keine vorangegangenen Beschreibungen gibt, dass Furin die ROS-Produktion, moduliert. Es gibt jedoch Erkenntnisse, dass Furin in apoptotischen Prozessen, speziell in der Tumorentwicklung, beteiligt ist [71, 100, 101, 147]. Somit ist es möglich, dass es sich hierbei um eine generellere Rolle von Furin in der Thrombozytenapoptose, anstatt eines direkten Einflusses auf die ROS-Produktion handelt. Um dies nachfolgend zu bestätigen, sind weitergehende Versuche und Studien nötig.

Da für Hämin sowohl GPVI als auch CLEC-2 als Rezeptoren beschrieben sind, wurde hypothetisiert, dass die CLEC-2 Agonisten Fucoidan und Katakine einen ähnlichen Effekt auf GPVI haben wie Hämin [38, 153, 165, 184]. Weder Fucoidan, noch Katakine induzierten eine signifikante Abnahme der GPVI-Oberflächenexpression. Direkte CLEC-2 Aktivierung verändert somit die GPVI-Oberflächenexpression nicht.

Die Daten dieser Studie zeigen, dass Furin, direkt oder indirekt, eine bislang nicht erkannte Protease in der Hämin-induzierten Spaltung von GPVI ist. Hämin verändert die Thrombozytenfunktion und den Rezeptor GPVI und stellt einen Mechanismus dar, der in Beteiligung von, oder exklusiv durch, Furin vermittelt wird. Im Rahmen der Hämolyse freigesetztes Hämin führt zur Abspaltung der GPVI-Ektodomäne, welche durch Inhibitor von Furin reduziert wird (Abbildung 34).

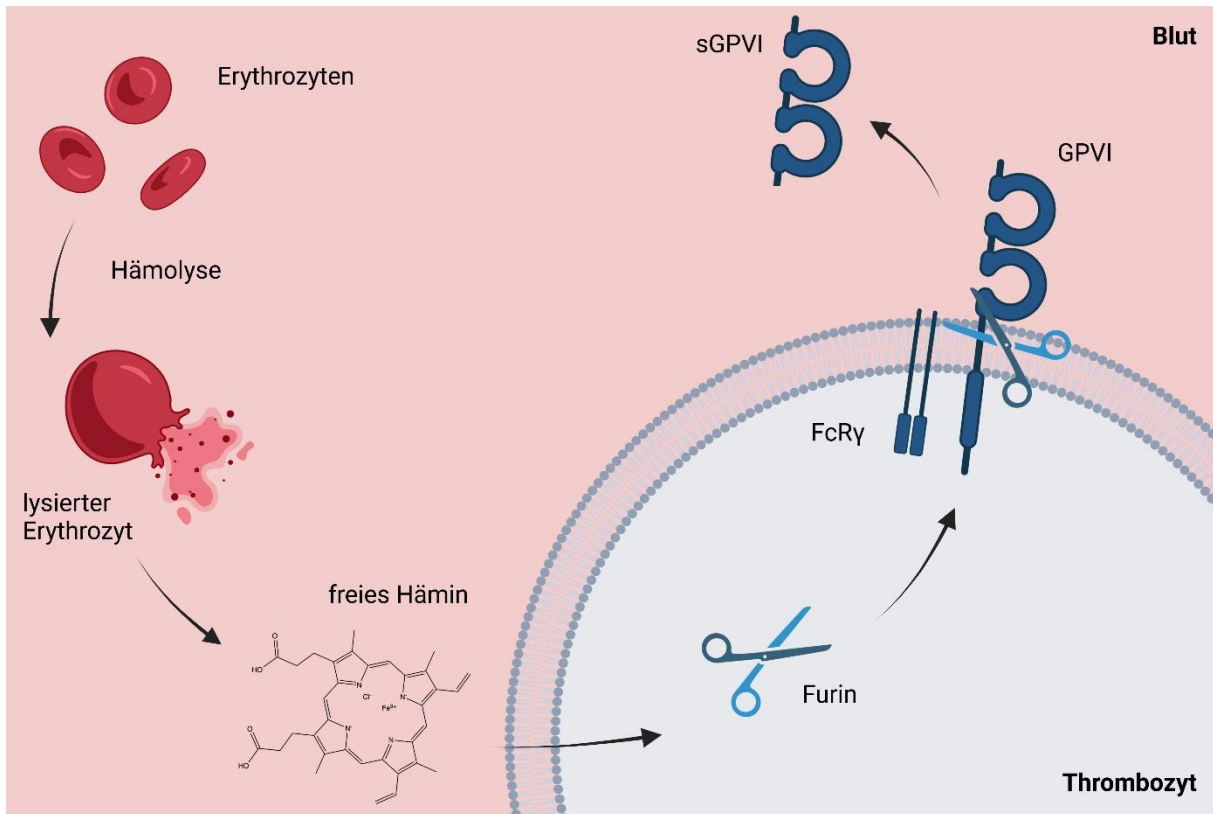


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Furin-vermittelten Hämin-induzierten Spaltung der Ektodomäne modifiziert nach [66]. Hämolysen führt zur Freisetzung von Hämin, welches Thrombozyten aktiviert und das Furin-abhängige GPVI-Ektodomänen-Shedding induziert. Created with BioRender.com.

Im Rahmen von weiteren Versuchen dieser Dissertation haben sich Hinweise ergeben, dass die Hämin-induzierte, von Furin modulierte, Degradation des Rezeptors GPVI auch auf weitere Rezeptoren wie zum Beispiel GPIb oder P-Selektin zutrifft. Parallel zur Reduktion der Hämin-induzierten GPVI Oberflächenexpression ist auch die Oberflächenexpression von CD62P und GPIb auf Stimulation mit hohen Häminkonzentrationen signifikant herabgesetzt. Während GPIb auf Häminstimulation eine Oberflächenexpressionsdynamik ähnlich GPVI aufweist, ist die für P-Selektin glockenförmige, zweiphasige Veränderung der P-Selektin Oberflächenexpression auf Stimulation mit Hämin zu erwähnen. Niedrige Konzentrationen (<6,25 μM Hämin) von Hämin erhöhen die Degranulation und Aktivierung der Thrombozyten und hierdurch die P-Selektin-Oberflächenexpression. Für höhere Hämin-Konzentrationen (>6,25 μM Hämin) erfolgt ebenfalls eine starke Aktivierung der Thrombozyten (siehe Aggregomerie und Flusskammer), die Oberflächen-Expression von P-Selektin nimmt jedoch ab, da es vermutlich ebenfalls zu einer Degradation des Rezeptors kommt. Um die Ursache der abnehmenden Oberflächenexpression beider Rezeptoren zu eruieren

und die Hypothese der Rezeptordegradation zu verifizieren, sind Immunoblots zur Detektion von GPIb und P-Selektin Fragmenten, sowie ELISAs zur Detektion des sGPIb und sP-Selektin aus mit Hämin aktivierten Thrombozytenüberständen notwendig.

Fink *et al.* stellt das signifikant vermehrte Auftreten von sCD62P Fragmenten durch Häminstimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle in ELISAs dar [66].

Inhibitorische durchflusszytometrische Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass der spezifische Furininhibitor SSM3 in der Konzentration 25 μ M den durch Hämin induzierten Verlust der GPIb- und P-Selektin-Oberflächenexpression wesentlich reduziert. P-Selektin betreffend, ist in niedrigen Häminkonzentrationen die Oberflächenexpression nach SSM3-Behandlung signifikant erniedrigt, was andeutet, dass SSM3 einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt auf die Degranulation hat.

Fink *et al.* bestätigt dies erneut durch das Darstellen des signifikant reduzierten Auftretens von sCD62P-Fragmenten durch Häminstimulation mit vorangegangener SSM3-Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in ELISAs [66].

Im Gegensatz zu GPVI, GPIb und P-Selektin war die Oberflächenkonzentration von CLEC-2, als mit GPVI gemeinsamer Rezeptor für Hämin, nicht reduziert auf Aktivierung mit Hämin. Es kam somit zu keiner Hämin-induzierten CLEC-2 Spaltung, obwohl für CLEC-2 eine im Rahmen der Thrombozytenaktivierung stattfindende, durch Rhodocytin induzierte Spaltung in der Literatur beschrieben ist [113, 130]. Es ist von bedeutender Relevanz, die hier beschriebene Hypothese der Furin-abhängigen Hämin-induzierten Rezeptordegradation von GPVI auf P-Selektin und GPIb in weiteren Studien zu übertragen, zu verifizieren sowie gegebenenfalls für noch zusätzliche Rezeptoren zu erweitern.

Darüber hinaus zeigt Fink *et al.*, dass Hämin zur Freisetzung von ATP in isolierten Thrombozyten führt, welche durch Furininhibition signifikant reduziert werden kann [66]. Weitergehende Versuche zeigten, dass das Thromboxan B2-Level durch SSM3-Behandlung in isolierten Thrombozyten signifikant herabgesetzt ist im Vergleich zur Hämin-Stimulation ohne Furininhibition [66]. Furin muss somit als wichtige Substanz auch im Rahmen der sekundären Thrombozytenaktivierungskaskade berücksichtigt werden [66].

In Bezug auf die im Rahmen dieser Dissertation erlangten Erkenntnisse ist zukünftig eine Überprüfung der Protease Furin *in vivo* konstruktiv und wünschenswert. Auf diese Weise kann erfasst werden, inwiefern Furin durch Hämolyse ausgelöste Thrombozytenaktivierung und Kollagenbindung an GPVI im lebenden Organismus beeinflusst.

Furin könnte ein attraktives Ziel sein, um Thrombosen in Erkrankungen mit erhöhter Hämoglobin- und Häm/Hämin-Freisetzung zu kontrollieren und regulieren.

4 Zusammenfassung

Die Hämolyse führt zur Freisetzung von Hämoglobin und Hämin aus den Erythrozyten. Es wurde beschrieben, dass Hämin die Thrombozytenaktivierung induziert und damit Thrombusformationen auslöst. Hämin gilt ebenfalls als Ligand für den Kollagenrezeptor GPVI auf Thrombozyten.

Die vorliegende Dissertation verfolgt das Bestreben, die Hämin-induzierte Thrombozytenaktivierung weitergehend darzulegen und ermittelt daher den Einfluss von Hämin auf den Kollagenrezeptor GPVI und das Zusammenspiel mit verschiedenen Inhibitoren, unter anderem dem Furin-Inhibitor SSM3. Die ausgeführten Versuche zeigen die Wirkung von Hämin auf die Thrombozytenfunktion und die Oberflächenexpression des Thrombozytenkollagenrezeptors GPVI. Isolierte Thrombozyten wurden mittels verschiedener Methoden wie der Durchflusszytometrie, der Lichttransmissionsaggregometrie, der *in vitro* Thrombusformation und Immunoblots mit steigenden Konzentrationen von Hämin stimuliert. Hämin erhöhte die Thrombozytenaktivierung, -aggregation und -aggregatbildung auf immobilisiertem Kollagen signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass die Oberflächenexpression von GPVI bei der Stimulation mit hohen Hämin-Konzentrationen signifikant reduziert wurde. Der Verlust der Hämin-induzierten Oberflächenexpression von GPVI wurde durch das Abspalten der Ektodomäne von GPVI verursacht, wie durch Immunoblotting nachgewiesen wurde, und ist unabhängig vom GPVI- oder CLEC-2-vermittelten ITAM-Signalweg. Der durch Hämin induzierte GPVI-Abbau ist unabhängig von den Metalloproteinasen wie ADAM10 oder ADAM17, welche in der Literatur bereits bekannt das GPVI-Shedding regulieren. In ähnlicher Weise wurde auch für weitere Rezeptoren ein konzentrationsabhängiges Shedding durch Hämin induziert. Im Rahmen dieser Dissertation wurde gezeigt, dass die Subtilisin-ähnliche Proprotein-Konvertase Furin die Hämin-abhängige GPVI-Spaltung beeinflusst, wie Inhibitorstudien mit dem spezifischen Furin-Inhibitor SSM3 zeigten. In Anwesenheit von SSM3 war das Hämin-assoziierte GPVI-Shedding signifikant reduziert. Darüber hinaus hemmte SSM3 die Hämin-, nicht aber die CRP-XL-induzierte Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung, was darauf hindeutet, dass Furin speziell die Hämin-assoziierte Thrombozytenfunktionen kontrolliert.

5 Literaturverzeichnis

1. Aarts, P.A.M.M., et al., *Red Blood Cell Size Is Important for Adherence of Blood Platelets to Artery Subendothelium*. Blood, 1983. **62**(1): p. 214-217.
2. Al-Tamimi, M., et al., *Coagulation-induced shedding of platelet glycoprotein VI mediated by factor Xa*. Blood, 2011. **117**(14): p. 3912-20.
3. Al-Tamimi, M., et al., *Pathologic shear triggers shedding of vascular receptors: a novel mechanism for down-regulation of platelet glycoprotein VI in stenosed coronary vessels*. Blood, 2012. **119**(18): p. 4311-20.
4. Al-Tamimi, Y., et al., *A review of delayed ischemic neurologic deficit following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: historical overview, current treatment, and pathophysiology*. World neurosurgery, 2010. **73** **6**: p. 654-67.
5. Alshehri, F.A., SSS; Alraizah, AMS, *The Biological Structure of Platelet and their Role with Subpopulations in Haemostasis*. J Blood Disord Tansfus, 2022. **13:522**.
6. Ampofo, E., et al., *Role of protein kinase CK2 in the dynamic interaction of platelets, leukocytes and endothelial cells during thrombus formation*. Thromb Res, 2015. **136**(5): p. 996-1006.
7. Anders, A., et al., *Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases*. Faseb j, 2001. **15**(10): p. 1837-9.
8. Andrews, R.K., et al., *Glycoprotein Ib-IX-V*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(8): p. 1170-4.
9. Andrews, R.K., J.A. López, and M.C. Berndt, *Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(1): p. 91-105.
10. Andrews, R.K., et al., *Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of the platelet membrane glycoprotein Ib-IX-V complex*. Blood, 2001. **98**(3): p. 681-7.
11. Andrews, R.K., et al., *Interaction of calmodulin with the cytoplasmic domain of platelet glycoprotein VI*. Blood, 2002. **99**(11): p. 4219-21.
12. Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer, *Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(4-6): p. 133-46.
13. Ascenzi, P., et al., *Hemoglobin and heme scavenging*. IUBMB Life, 2005. **57**(11): p. 749-759.
14. Asselin, J., et al., *A collagen-like peptide stimulates tyrosine phosphorylation of syk and phospholipase C gamma2 in platelets independent of the integrin alpha2beta1*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1235-42.
15. Ataga, K.I., *Hypercoagulability and thrombotic complications in hemolytic anemias*. Haematologica, 2009. **94**(11): p. 1481-4.
16. Ataga, K.I., M.D. Cappellini, and E.A. Rachmilewitz, *Beta-thalassaemia and sickle cell anaemia as paradigms of hypercoagulability*. Br J Haematol, 2007. **139**(1): p. 3-13.
17. Baek, J.H., et al., *Hemoglobin-driven pathophysiology is an in vivo consequence of the red blood cell storage lesion that can be attenuated in guinea pigs by haptoglobin therapy*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1444-58.
18. Baglia, F.A., et al., *Factor XI interacts with the leucine-rich repeats of glycoprotein Ibalpha on the activated platelet*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49323-9.

19. Bass, D.A., et al., *Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation*. J Immunol, 1983. **130**(4): p. 1910-7.
20. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**(5428): p. 727-9.
21. Behnke, O., *Further studies on microtubules. A marginal bundle in human and rat thrombocytes*. J Ultrastruct Res, 1965. **13**(5): p. 469-77.
22. Belcher, J.D., et al., *Haptoglobin and hemopexin inhibit vaso-occlusion and inflammation in murine sickle cell disease: Role of heme oxygenase-1 induction*. PLoS ONE, 2018. **13**.
23. Bender, M., et al., *Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3347-55.
24. Bennett, J.S., *α IIb β 3 (GPIIb/IIIa) Structure and Function*, in *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P. Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 99-112.
25. Bergmeier, W., et al., *The role of platelet adhesion receptor GPIb α far exceeds that of its main ligand, von Willebrand factor, in arterial thrombosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(45): p. 16900-5.
26. Bergmeier, W., et al., *GPVI down-regulation in murine platelets through metalloproteinase-dependent shedding*. Thromb Haemost, 2004. **91**(5): p. 951-8.
27. Berlanga, O., et al., *The Fc receptor gamma-chain is necessary and sufficient to initiate signalling through glycoprotein VI in transfected cells by the snake C-type lectin, convulxin*. Eur J Biochem, 2002. **269**(12): p. 2951-60.
28. Bessis, M.C. *Living Blood Cells and Their Ultrastructure*. 1972.
29. Best, D., et al., *GPVI levels in platelets: relationship to platelet function at high shear*. Blood, 2003. **102**(8): p. 2811-8.
30. Bigalke, B., et al., *Regulation of platelet glycoprotein VI (GPVI) surface expression and of soluble GPVI in patients with atrial fibrillation (AF) and acute coronary syndrome (ACS)*. Basic Research in Cardiology, 2009. **104**(3): p. 352-357.
31. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates*. Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
32. Blockmans, D., H. Deckmyn, and J. Vermynen, *Platelet activation*. Blood Rev, 1995. **9**(3): p. 143-56.
33. Borenstein-Ben Yashar, V., et al., *Phosphatidylserine in the outer leaflet of red blood cells from beta-thalassemia patients may explain the chronic hypercoagulable state and thrombotic episodes*. Am J Hematol, 1993. **44**(1): p. 63-5.
34. Bori-Sanz, T., et al., *Delineation of the region in the glycoprotein VI tail required for association with the Fc receptor gamma-chain*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 35914-22.
35. Born, G.V. and M. Hume, *Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma*. Nature, 1967. **215**(5105): p. 1027-9.
36. Bosman, G.J., F.L. Willekens, and J.M. Werre, *Erythrocyte aging: a more than superficial resemblance to apoptosis?* Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(1-3): p. 1-8.
37. Boulaftali, Y., et al., *GPVI*, in *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P.

- Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 113-127.
38. Bourne, J.H., et al., *Heme induces human and mouse platelet activation through C-type-lectin-like receptor-2*. Haematologica, 2021. **106**(2): p. 626-629.
 39. Bradford, H.N., R.A. Pixley, and R.W. Colman, *Human factor XII binding to the glycoprotein Ib-IX-V complex inhibits thrombin-induced platelet aggregation*. J Biol Chem, 2000. **275**(30): p. 22756-63.
 40. Braun, A., et al., *STIM and Orai in hemostasis and thrombosis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**(6): p. 2144-60.
 41. Brewer, D.B., *Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 251-8.
 42. Bruhn, H.D., et al., *LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik*. 2011: Schattauer.
 43. Burkhart, J.M., et al., *The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways*. Blood, 2012. **120**(15): p. e73-82.
 44. Calderwood, D.A., *Integrin activation*. Journal of Cell Science, 2004. **117**: p. 657 - 666.
 45. Cappellini, M.D., *Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2007: p. 74-8.
 46. Carter, A.M., et al., *Soluble P-selectin levels, P-selectin polymorphisms and cardiovascular disease*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(8): p. 1718-1723.
 47. Cazenave, J.P., et al., *Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood*. Methods Mol Biol, 2004. **272**: p. 13-28.
 48. Cesarman-Maus, G. and K.A. Hajjar, *Molecular mechanisms of fibrinolysis*. Br J Haematol, 2005. **129**(3): p. 307-21.
 49. Chaipan, C., et al., *DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 8951-60.
 50. Chen, Z., et al., *Activation and shedding of platelet glycoprotein IIb/IIIa under non-physiological shear stress*. Mol Cell Biochem, 2015. **409**(1-2): p. 93-101.
 51. Cheng, Y.W., et al., *Furin Inhibitors Block SARS-CoV-2 Spike Protein Cleavage to Suppress Virus Production and Cytopathic Effects*. Cell Rep, 2020. **33**(2): p. 108254.
 52. Ciferri, S., et al., *Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation*. Thromb Haemost, 2000. **83**(1): p. 157-64.
 53. Clemetson, J.M., et al., *The platelet collagen receptor glycoprotein VI is a member of the immunoglobulin superfamily closely related to FcalphaR and the natural killer receptors*. J Biol Chem, 1999. **274**(41): p. 29019-24.
 54. Clemetson, K.J., *Platelets and primary haemostasis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 220-4.
 55. Clemetson, K.J., et al., *Characterization of the platelet membrane glycoprotein abnormalities in Bernard-Soulier syndrome and comparison with normal by surface-labeling techniques and high-resolution two-dimensional gel electrophoresis*. J Clin Invest, 1982. **70**(2): p. 304-11.
 56. Coutard, B., et al., *The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade*. Antiviral Res, 2020. **176**: p. 104742.
 57. Daly, M.E., *Determinants of platelet count in humans*. Haematologica, 2011. **96**(1): p. 10-3.

58. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. *Cell*, 2012. **149**(5): p. 1060-72.
59. Dole, V.S., et al., *PSGL-1 regulates platelet P-selectin-mediated endothelial activation and shedding of P-selectin from activated platelets*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2007. **98**: p. 806 - 812.
60. Du, X., et al., *Calpain Cleavage of the Cytoplasmic Domain of the Integrin α IIb β 3 Subunit* (α IIb β 3). *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(44): p. 26146-26151.
61. Ebrahim, M., *Role of the glycoprotein VI (GPVI) in platelet interaction with fibrinogen and fibrin in arterial thrombosis*. 2022, LMU München.
62. Escolar, G., E. Leistikow, and J.G. White, *The fate of the open canalicular system in surface and suspension-activated platelets*. *Blood*, 1989. **74**(6): p. 1983-8.
63. Escolar, G. and J.G. White, *The platelet open canalicular system: a final common pathway*. *Blood Cells*, 1991. **17**(3): p. 467-85; discussion 486-95.
64. Estevez, B., et al., *LIM kinase-1 selectively promotes glycoprotein Ib-IX-mediated TXA2 synthesis, platelet activation, and thrombosis*. *Blood*, 2013. **121**(22): p. 4586-94.
65. Ezumi, Y., et al., *Physical and functional association of the Src family kinases Fyn and Lyn with the collagen receptor glycoprotein VI-Fc receptor gamma chain complex on human platelets*. *J Exp Med*, 1998. **188**(2): p. 267-76.
66. Fink, A., et al., *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI*. *Thromb Haemost*, 2023. **123**(7): p. 679-691.
67. Fitch-Tewfik, J.L. and R. Flaumenhaft, *Platelet granule exocytosis: a comparison with chromaffin cells*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013. **4**: p. 77.
68. Föller, M., S.M. Huber, and F. Lang, *Erythrocyte programmed cell death*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(10): p. 661-8.
69. Frelinger, A.L., 3rd, et al., *Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin α IIb β 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(26): p. 17106-11.
70. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. *J Exp Med*, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
71. Fu, C., et al., *Furin-instructed molecular self-assembly actuates endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis for cancer therapy*. *Nanoscale*, 2020. **12**(22): p. 12126-12132.
72. Fuller, G.L., et al., *The C-type lectin receptors CLEC-2 and Dectin-1, but not DC-SIGN, signal via a novel YXXL-dependent signaling cascade*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12397-409.
73. Furie, B.C. and B. Furie, *New Perspectives in P-Selectin Biology*, in *Cardiovascular Disease: Cellular and Molecular Mechanisms, Prevention, and Treatment*, L.L. Gallo, Editor. 1995, Springer US: Boston, MA. p. 191-197.
74. Gachet, C., *Regulation of platelet functions by P2 receptors*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2006. **46**: p. 277-300.
75. Gale, A.J., *Continuing education course #2: current understanding of hemostasis*. *Toxicol Pathol*, 2011. **39**(1): p. 273-80.
76. Garcia, A., et al., *Src family kinase-mediated and Erk-mediated thromboxane A2 generation are essential for VWF/GPIIb-induced fibrinogen receptor activation in human platelets*. *Blood*, 2005. **106**(10): p. 3410-4.

77. GARDINER, E.E., et al., *Compromised ITAM-based platelet receptor function in a patient with immune thrombocytopenic purpura*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. **6**(7): p. 1175-1182.
78. Gardiner, E.E., et al., *Role of calmodulin in platelet receptor function*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2005. **3**(4): p. 283-7.
79. Gardiner, E.E., et al., *Regulation of platelet membrane levels of glycoprotein VI by a platelet-derived metalloproteinase*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3611-7.
80. Gardiner, E.E., et al., *Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1440-1447.
81. Gardiner, E.E., et al., *Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(7): p. 1530-7.
82. Gawaz, M., *Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung*. 1999: Stuttgart ; Georg Thieme Verlag.
83. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 498-511.
84. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
85. Gawaz, M., et al., *Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty*. Circulation, 1996. **93**(2): p. 229-37.
86. Gbadegesin, R., et al., *Significance of hemolysis on extracorporeal life support after cardiac surgery in children*. Pediatr Nephrol, 2009. **24**(3): p. 589-95.
87. George, J.N., *Platelets*. The Lancet, 2000. **355**(9214): p. 1531-1539.
88. George, J.N., et al., *Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery*. J Clin Invest, 1986. **78**(2): p. 340-8.
89. Gibbins, J.M., et al., *The p85 Subunit of Phosphatidylinositol 3-Kinase Associates with the Fc Receptor γ -Chain and Linker for Activator of T Cells (LAT) in Platelets Stimulated by Collagen and Convulxin**. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(51): p. 34437-34443.
90. Gladwin, M.T., *Cardiovascular complications and risk of death in sickle-cell disease*. Lancet, 2016. **387**(10037): p. 2565-74.
91. Gladwin, M.T., T. Kanias, and D.B. Kim-Shapiro, *Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1205-8.
92. Gladwin, M.T., et al., *Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 496-500.
93. Golebiewska, E.M. and A.W. Poole, *Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond*. Blood Rev, 2015. **29**(3): p. 153-62.
94. Goto, S., et al., *Involvement of glycoprotein VI in platelet thrombus formation on both collagen and von Willebrand factor surfaces under flow conditions*. Circulation, 2002. **106**(2): p. 266-72.
95. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology*. Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
96. Grenoble, D.C. and H.G. Drickamer, *The effect of pressure on the oxidation state of iron. 3. Hemin and hematin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1968. **61**(4): p. 1177-82.

97. Habib, A., et al., *Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with beta-thalassemia intermedia*. Haematologica, 2008. **93**(6): p. 941-2.
98. Harrison, H.E., et al., *THE PATHOGENESIS OF THE RENAL INJURY PRODUCED IN THE DOG BY HEMOGLOBIN OR METHEMOGLOBIN*. J Exp Med, 1947. **86**(4): p. 339-56.
99. Harrison, P. and E.M. Cramer, *Platelet alpha-granules*. Blood Rev, 1993. **7**(1): p. 52-62.
100. He, Z., A.M. Khatib, and J.W.M. Creemers, *Loss of Proprotein Convertase Furin in Mammary Gland Impairs proIGF1R and proIR Processing and Suppresses Tumorigenesis in Triple Negative Breast Cancer*. Cancers (Basel), 2020. **12**(9).
101. He, Z., et al., *The proprotein convertase furin is a pro-oncogenic driver in KRAS and BRAF driven colorectal cancer*. Oncogene, 2020. **39**(17): p. 3571-3587.
102. Hechler, B., et al., *Platelet preparation for function testing in the laboratory and clinic: Historical and practical aspects*. Res Pract Thromb Haemost, 2019. **3**(4): p. 615-625.
103. Heijnen, H.F.G. and S.J.A. Korporaal, *Platelet Morphology and Ultrastructure*, in *Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P. Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 21-37.
104. Hendrick, A.M., *Auto-immune haemolytic anaemia--a high-risk disorder for thromboembolism?* Hematology, 2003. **8**(1): p. 53-6.
105. Henson, P.M., D.L. Bratton, and V.A. Fadok, *The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001. **2**(8): p. 627-633.
106. Herold, G., *Innere Medizin 2017: eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis/ Gerd Herold und Mitarbeiter*, in *Hämatologie: Einführung — Anämien — Hämolytische Anämien*. 2017, Dr. Gerd Herold Firma: Köln, Deutschland. p. 41-60.
107. Hou, Y., et al., *Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis*. J Biomed Res, 2015. **29**(6): p. 437-44.
108. Hrkal, Z., Z. Vodrázka, and I. Kalousek, *Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin*. Eur J Biochem, 1974. **43**(1): p. 73-8.
109. Hugel, B., et al., *Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia*. Blood, 1999. **93**(10): p. 3451-6.
110. Hughes, C.E., et al., *Differential roles for the adapters Gads and LAT in platelet activation by GPVI and CLEC-2*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(12): p. 2152-9.
111. Huizinga, E.G., et al., *Structures of glycoprotein Ibalpha and its complex with von Willebrand factor A1 domain*. Science, 2002. **297**(5584): p. 1176-9.
112. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
113. Inoue, O., et al., *Soluble CLEC-2 is generated independently of ADAM10 and is increased in plasma in acute coronary syndrome: comparison with soluble GPVI*. Int J Hematol, 2019. **110**(3): p. 285-294.
114. Isenberg, W.M., et al., *The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering*. J Cell Biol, 1987. **104**(6): p. 1655-63.

115. Italiano, J. and J.H. Hartwig. *Production and Destruction of Platelets*. 2015.
116. Jackson, S.P., *The growing complexity of platelet aggregation*. Blood, 2007. **109**(12): p. 5087-95.
117. Jandrot-Perrus, M., et al., *Cloning, characterization, and functional studies of human and mouse glycoprotein VI: a platelet-specific collagen receptor from the immunoglobulin superfamily*. Blood, 2000. **96**(5): p. 1798-807.
118. Jelkmann, W., *Functional Significance of Erythrocytes*, in *Erythrocytes*. p. 1-56.
119. Jeney, V., et al., *Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme*. Blood, 2002. **100**(3): p. 879-87.
120. Jenne, C.N. and P. Kubersky, *Platelets in inflammation and infection*. Platelets, 2015. **26**(4): p. 286-292.
121. Jennings, L.K. and D.R. Phillips, *Purification of glycoproteins IIb and III from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb-III complex*. J Biol Chem, 1982. **257**(17): p. 10458-66.
122. Jiao, G.S., et al., *Synthetic small molecule furin inhibitors derived from 2,5-dideoxystreptomine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19707-12.
123. Johnston, G.I., R.G. Cook, and R.P. McEver, *Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: Sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation*. Cell, 1989. **56**(6): p. 1033-1044.
124. Joseph, K., et al., *Platelet glycoprotein Ib: a zinc-dependent binding protein for the heavy chain of high-molecular-weight kininogen*. Mol Med, 1999. **5**(8): p. 555-63.
125. Jung, S.M., et al., *Collagen-type specificity of glycoprotein VI as a determinant of platelet adhesion*. Platelets, 2008. **19**(1): p. 32-42.
126. Jurk, K., et al., *Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor*. Faseb j, 2003. **17**(11): p. 1490-2.
127. Kattula, S., J.R. Byrnes, and A.S. Wolberg, *Fibrinogen and Fibrin in Hemostasis and Thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017. **37**(3): p. e13-e21.
128. Kaushansky, K., *Determinants of platelet number and regulation of thrombopoiesis*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 147-52.
129. Kaushansky, K., et al., *Thrombopoietin, the Mp1 ligand, is essential for full megakaryocyte development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3234-8.
130. Kazama, F., et al., *Measurement of soluble C-type lectin-like receptor 2 in human plasma*. Platelets, 2015. **26**(8): p. 711-9.
131. Kieffer, N. and D.R. Phillips, *Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions*. Annu Rev Cell Biol, 1990. **6**: p. 329-57.
132. Kouns, W.C., et al., *The effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor occupancy on the cytoskeleton of resting and activated platelets*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(21): p. 13891-13900.
133. Kristoff, J., *Malaria stage-specific vaccine candidates*. Curr Pharm Des, 2007. **13**(19): p. 1989-99.
134. Krysan, D.J., N.C. Rockwell, and R.S. Fuller, *Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides*. J Biol Chem, 1999. **274**(33): p. 23229-34.
135. Kumar, S. and U. Bandyopadhyay, *Free heme toxicity and its detoxification systems in human*. Toxicol Lett, 2005. **157**(3): p. 175-88.

136. Kunapuli, S.P., et al., *Platelet purinergic receptors*. Current opinion in pharmacology, 2003. **3** 2: p. 175-80.
137. Kunicki, T.J., *Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview*. Blut, 1989. **59**(1): p. 30-4.
138. Langnau, C., et al., *Platelet Activation and Plasma Levels of Furin Are Associated With Prognosis of Patients With Coronary Artery Disease and COVID-19*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021. **41**(6): p. 2080-2096.
139. Leblond, J., et al., *The serpin proteinase inhibitor 8: an endogenous furin inhibitor released from human platelets*. Thromb Haemost, 2006. **95**(2): p. 243-52.
140. Lee, S.P., et al., *Biologically active CD40 ligand is elevated in sickle cell anemia: potential role for platelet-mediated inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(7): p. 1626-31.
141. Leeksa, C.H. and J.A. Cohen, *Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphate*. Nature, 1955. **175**(4456): p. 552-3.
142. Lehmann, M., et al., *Deficient processing and activity of type I insulin-like growth factor receptor in the furin-deficient LoVo-C5 cells*. Endocrinology, 1998. **139**(9): p. 3763-71.
143. LHERMUSIER, T., H. CHAP, and B. PAYRASTRE, *Platelet membrane phospholipid asymmetry: from the characterization of a scramblase activity to the identification of an essential protein mutated in Scott syndrome*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011. **9**(10): p. 1883-1891.
144. Lievens, D. and P. von Hundelshausen, *Platelets in atherosclerosis*. Thromb Haemost, 2011. **106**(5): p. 827-38.
145. Lindemann, S. and M. Gawaz, *The active platelet: translation and protein synthesis in an anucleate cell*. Semin Thromb Hemost, 2007. **33**(2): p. 144-50.
146. Linden, M.D., *Platelet flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2013. **992**: p. 241-62.
147. López, J.J., et al., *Furin Prodomain ppFurin Enhances Ca(2+) Entry Through Orai and TRPC6 Channels' Activation in Breast Cancer Cells*. Cancers (Basel), 2021. **13**(7).
148. Luengo-Fernandez, R., R. Burns, and J. Leal, *Economic burden of non-malignant blood disorders across Europe: a population-based cost study*. Lancet Haematol, 2016. **3**(8): p. e371-8.
149. Luo, S.Z., et al., *Glycoprotein Ibalpha forms disulfide bonds with 2 glycoprotein Ibbeta subunits in the resting platelet*. Blood, 2007. **109**(2): p. 603-9.
150. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation*. J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
151. Mackie, I.J. and C.R. Neal, *The Platelet*, in *Platelet-Vessel Wall Interactions*, R.M. Pittilo and S.J. Machin, Editors. 1988, Springer London: London. p. 1-32.
152. Manke, M.C., et al., *ANXA7 Regulates Platelet Lipid Metabolism and Ca(2+) Release in Arterial Thrombosis*. Circ Res, 2021. **129**(4): p. 494-507.
153. Manne, B.K., et al., *Fucoidan is a novel platelet agonist for the C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2)*. J Biol Chem, 2013. **288**(11): p. 7717-7726.
154. Marengo-Rowe, A.J., *Structure-function relations of human hemoglobins*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. **19**(3): p. 239-45.
155. Marschang, P., et al., *Reduction of soluble P-selectin by statins is inversely correlated with the progression of coronary artery disease*. Int J Cardiol, 2006. **106**(2): p. 183-90.

156. Massberg, S., et al., *A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo*. J Exp Med, 2003. **197**(1): p. 41-9.
157. Mattila, S.O., et al., *GPR37 is processed in the N-terminal ectodomain by ADAM10 and furin*. Faseb j, 2021. **35**(6): p. e21654.
158. McEver, R.P. and R.D. Cummings, *Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(3): p. 485-91.
159. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin in arterial thrombosis*. Z Kardiol, 2004. **93**(11): p. 855-63.
160. Mo, X., et al., *Transmembrane domains are critical to the interaction between platelet glycoprotein V and glycoprotein Ib-IX complex*. J Thromb Haemost, 2012. **10**(9): p. 1875-86.
161. Moers, A., et al., *G13 is an essential mediator of platelet activation in hemostasis and thrombosis*. Nature Medicine, 2003. **9**: p. 1418-1422.
162. Molloy, S.S., et al., *Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(1): p. 28-35.
163. Molloy, S.S., et al., *Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16396-402.
164. Molloy, S.S., et al., *Regulation of endosome sorting by a specific PP2A isoform*. J Cell Biol, 1998. **142**(6): p. 1399-411.
165. Morán, L.A., et al., *Katacine Is a New Ligand of CLEC-2 that Acts as a Platelet Agonist*. Thromb Haemost, 2022. **122**(8): p. 1361-1368.
166. Morawitz, P., *Blut und Blutkrankheiten, in Harnwege und Sexualstörungen — Blut — Bewegungsorgane — Drüsen mit Innerer Sekretion, Stoffwechsel- und Konstitutionskrankheiten — Erkrankungen aus Äusseren Physikalischen Ursachen*, L. Mohr and R. Staehelin, Editors. 1912, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 92-347.
167. Morgenstern, E., *Human Platelet Morphology/Ultrastructure*, in *Platelets and Their Factors*, F. von Bruchhausen and U. Walter, Editors. 1997, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 27-60.
168. Morgenstern, E., K. Neumann, and H. Patscheke, *The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis*. Eur J Cell Biol, 1987. **43**(2): p. 273-82.
169. Morris, C.R., et al., *Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease?* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(1): p. 63-9.
170. Morton, L.F., et al., *Integrin alpha 2 beta 1-independent activation of platelets by simple collagen-like peptides: collagen tertiary (triple-helical) and quaternary (polymeric) structures are sufficient alone for alpha 2 beta 1-independent platelet reactivity*. Biochem J, 1995. **306** (Pt 2)(Pt 2): p. 337-44.
171. Muller-Eberhard, U., et al., *Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases*. Blood, 1968. **32**(5): p. 811-5.
172. Müller, A., R. Zimmermann, and S.W. Krause, *[Hemolytic anemias in adults]*. Dtsch Med Wochenschr, 2011. **136**(45): p. 2308-12.
173. Müller, I., et al., *Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement*. Thromb Haemost, 2003. **89**(5): p. 783-7.

174. Murugappan, S., et al., *Differential role of protein kinase C delta isoform in agonist-induced dense granule secretion in human platelets*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(4): p. 2360-2367.
175. Nakayama, K., *Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 3)(Pt 3): p. 625-35.
176. NaveenKumar, S.K., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species and Ferroptosis in Heme-Mediated Activation of Human Platelets*. ACS Chem Biol, 2018. **13**(8): p. 1996-2002.
177. Nielsen, M.J., H.J. Møller, and S.K. Moestrup, *Hemoglobin and heme scavenger receptors*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(2): p. 261-73.
178. Nieswandt, B., et al., *Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen*. Embo j, 2001. **20**(9): p. 2120-30.
179. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
180. Niiya, K., et al., *Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation*. Blood, 1987. **70**(2): p. 475-83.
181. Norgard, K.E., et al., *Characterization of a specific ligand for P-selectin on myeloid cells. A minor glycoprotein with sialylated O-linked oligosaccharides*. J Biol Chem, 1993. **268**(17): p. 12764-74.
182. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors*. Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
183. Offermanns, S., *The Role of Heterotrimeric G Proteins in Platelet Activation*. Biological Chemistry, 2000. **381**(5-6): p. 389-396.
184. Oishi, S., et al., *Heme activates platelets and exacerbates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via CLEC-2 and GPVI/FcRγ*. Blood Adv, 2021. **5**(7): p. 2017-2026.
185. Olson, K.R., et al., *Fluorescence quenching by metal centered porphyrins and poryphyrin enzymes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2017. **313**(4): p. R340-r346.
186. Ott, I., et al., *Increased Neutrophil-Platelet Adhesion in Patients With Unstable Angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-1246.
187. Pang, L., M.J. Weiss, and M. Poncz, *Megakaryocyte biology and related disorders*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3332-8.
188. Pasquet, J.M., et al., *A collagen-related peptide regulates phospholipase Cgamma2 via phosphatidylinositol 3-kinase in human platelets*. Biochem J, 1999. **342** (Pt 1)(Pt 1): p. 171-7.
189. Pasquet, J.M., et al., *LAT is required for tyrosine phosphorylation of phospholipase cgamma2 and platelet activation by the collagen receptor GPVI*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(12): p. 8326-34.
190. Pattanapanyasat, K., et al., *Activated platelet-derived microparticles in thalassaemia*. British Journal of Haematology, 2007. **136**(3): p. 462-471.
191. Paul, B.Z.S., J.L. Daniel, and S.P. Kunapuli, *Platelet Shape Change Is Mediated by both Calcium-dependent and -independent Signaling Pathways: ROLE OF p160 Rho-ASSOCIATED COILED-COIL-CONTAINING PROTEIN KINASE IN PLATELET SHAPE CHANGE **. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(40): p. 28293-28300.
192. Pfaff, M., X. Du, and M.H. Ginsberg, *Calpain cleavage of integrin β cytoplasmic domains*. FEBS Letters, 1999. **460**(1): p. 17-22.

193. Polgár, J., et al., *Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from Crotalus durissus terrificus (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13576-83.
194. Quaye, I.K., *Extracellular hemoglobin: the case of a friend turned foe*. Frontiers in Physiology, 2015. **6**.
195. Quek, L.S., et al., *Fyn and Lyn phosphorylate the Fc receptor gamma chain downstream of glycoprotein VI in murine platelets, and Lyn regulates a novel feedback pathway*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4246-53.
196. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(1): p. 181-7.
197. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
198. Rayes, J., et al., *The Role of CLEC-2 in and Beyond the Vasculature, in Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders: Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, P. Gresele, et al., Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 129-138.
199. Rayes, J., S.P. Watson, and B. Nieswandt, *Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2*. J Clin Invest, 2019. **129**(1): p. 12-23.
200. Remacle, A.G., et al., *Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(6): p. 987-95.
201. Rendu, F. and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, 2001. **12**(5): p. 261-73.
202. Ribatti, D. and E. Crivellato, *Giulio Bizzozero and the discovery of platelets*. Leukemia Research, 2007. **31**(10): p. 1339-1341.
203. Richardson, J.L., et al., *Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during platelet production*. Blood, 2005. **106**(13): p. 4066-75.
204. Richardson, L.C., C.S. Parker, and J. Tsai, *Blood disorders and public health*. Am J Prev Med, 2014. **47**(5): p. 656-7.
205. Rifkind, R.A., *Destruction of injured red cells in vivo*. Am J Med, 1966. **41**(5): p. 711-23.
206. Rohlfing, A.K., et al., *ACKR3 regulates platelet activation and ischemia-reperfusion tissue injury*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 1823.
207. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. J Exp Med, 1999. **190**(6): p. 803-14.
208. Rother, R.P., et al., *The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease*. Jama, 2005. **293**(13): p. 1653-62.
209. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
210. Ruggeri, Z.M., *Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation*. Best Pract Res Clin Haematol, 2001. **14**(2): p. 257-79.
211. Savage, B., F. Almus-Jacobs, and Z.M. Ruggeri, *Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow*. Cell, 1998. **94**(5): p. 657-66.
212. Savage, B., E. Saldívar, and Z.M. Ruggeri, *Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor*. Cell, 1996. **84**(2): p. 289-97.

213. Savage, B., S.J. Shattil, and Z.M. Ruggeri, *Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor.* J Biol Chem, 1992. **267**(16): p. 11300-6.
214. Schaer, D.J., et al., *Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins.* Blood, 2013. **121**(8): p. 1276-84.
215. Schultze, M., *Ein heizbarer Objecttisch und seine Verwendung bei Untersuchungen des Blutes.* Archiv für mikroskopische Anatomie, 1865. **1**(1): p. 1-42.
216. Schulze, H. and R.A. Shivdasani, *Mechanisms of thrombopoiesis.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1717-24.
217. Schuth, N., et al., *Effective intermediate-spin iron in O(2)-transporting heme proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(32): p. 8556-8561.
218. Schwertz, H., et al., *Anucleate platelets generate progeny.* Blood, 2010. **115**(18): p. 3801-9.
219. Seidah, N.G., *What lies ahead for the proprotein convertases?* Ann N Y Acad Sci, 2011. **1220**: p. 149-61.
220. Seidah, N.G., et al., *The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions.* J Biol Chem, 2013. **288**(30): p. 21473-81.
221. Seixas, E., et al., *Heme oxygenase-1 affords protection against noncerebral forms of severe malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15837-42.
222. Setty, B.N., et al., *Heme induces endothelial tissue factor expression: potential role in hemostatic activation in patients with hemolytic anemia.* J Thromb Haemost, 2008. **6**(12): p. 2202-9.
223. Setty, B.N., et al., *Fetal hemoglobin in sickle cell disease: relationship to erythrocyte phosphatidylserine exposure and coagulation activation.* Blood, 2000. **96**(3): p. 1119-24.
224. Setty, B.N., S. Kulkarni, and M.J. Stuart, *Role of erythrocyte phosphatidylserine in sickle red cell-endothelial adhesion.* Blood, 2002. **99**(5): p. 1564-71.
225. Setty, B.N., A.K. Rao, and M.J. Stuart, *Thrombophilia in sickle cell disease: the red cell connection.* Blood, 2001. **98**(12): p. 3228-33.
226. Shet, A.S., et al., *Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2678-2683.
227. Simak, J., et al., *Elevated circulating endothelial membrane microparticles in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.* Br J Haematol, 2004. **125**(6): p. 804-13.
228. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G Proteins in Signal Transduction.* Science, 1991. **252**(5007): p. 802-808.
229. Solovey, A., et al., *Endothelial cell expression of tissue factor in sickle mice is augmented by hypoxia/reoxygenation and inhibited by lovastatin.* Blood, 2004. **104**(3): p. 840-6.
230. Sonntag, O., *Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry.* J Clin Chem Clin Biochem, 1986. **24**(2): p. 127-39.
231. Sowemimo-Coker, S.O., *Red blood cell hemolysis during processing.* Transfus Med Rev, 2002. **16**(1): p. 46-60.
232. Spurgeon, B.E.J. and K.M. Naseem, *Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance.* Cytometry B Clin Cytom, 2020. **98**(1): p. 19-27.

233. Stark, K. and S. Massberg, *Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology*. Nat Rev Cardiol, 2021. **18**(9): p. 666-682.
234. Stenberg, P.E., et al., *A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation*. J Cell Biol, 1985. **101**(3): p. 880-6.
235. Stenberg, P.E., et al., *Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets*. J Cell Biol, 1984. **98**(2): p. 748-60.
236. Stephens, G., et al., *Platelet activation induces metalloproteinase-dependent GP VI cleavage to down-regulate platelet reactivity to collagen*. Blood, 2005. **105**(1): p. 186-191.
237. Stockwell, B.R., et al., *Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease*. Cell, 2017. **171**(2): p. 273-285.
238. Sugiyama, T., et al., *A novel platelet aggregating factor found in a patient with defective collagen-induced platelet aggregation and autoimmune thrombocytopenia*. Blood, 1987. **69**(6): p. 1712-20.
239. Suzuki-Inoue, K., et al., *A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2*. Blood, 2006. **107**(2): p. 542-549.
240. Suzuki-Inoue, K., et al., *Murine GPVI stimulates weak integrin activation in PLCgamma2^{-/-} platelets: involvement of PLCgamma1 and PI3-kinase*. Blood, 2003. **102**(4): p. 1367-73.
241. Suzuki-Inoue, K., et al., *Association of Fyn and Lyn with the proline-rich domain of glycoprotein VI regulates intracellular signaling*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21561-6.
242. Suzuki, H., et al., *Intracellular localization of glycoprotein VI in human platelets and its surface expression upon activation*. Br J Haematol, 2003. **121**(6): p. 904-12.
243. Szalai, G., A.C. LaRue, and D.K. Watson, *Molecular mechanisms of megakaryopoiesis*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(21): p. 2460-76.
244. Tablin, F., M. Castro, and R.M. Leven, *Blood platelet formation in vitro. The role of the cytoskeleton in megakaryocyte fragmentation*. J Cell Sci, 1990. **97** (Pt 1): p. 59-70.
245. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 753-66.
246. Thon, J.N., et al., *Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release*. J Cell Biol, 2010. **191**(4): p. 861-74.
247. Ulrich, J., et al., *Blood disorders stepping into the limelight*. Haematologica, 2016. **101**(2): p. 101-103.
248. Villagra, J., et al., *Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin*. Blood, 2007. **110**(6): p. 2166-72.
249. Walker, J.A., et al., *Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus*. J Virol, 1994. **68**(2): p. 1213-8.
250. Walsh, T.G., M.T. Harper, and A.W. Poole, *SDF-1 α is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4*. Cell Signal, 2015. **27**(1): p. 37-46.
251. Walsh, T.G., P. Metharom, and M.C. Berndt, *The functional role of platelets in the regulation of angiogenesis*. Platelets, 2015. **26**(3): p. 199-211.
252. Wang, Y., et al., *Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(10): p. 4281-93.

253. Ware, J., A. Corken, and R. Khetpal, *Platelet function beyond hemostasis and thrombosis*. *Curr Opin Hematol*, 2013. **20**(5): p. 451-6.
254. Weber, C., *Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime*. *Circ Res*, 2005. **96**(6): p. 612-6.
255. Wencel-Drake, J.D., et al., *Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses*. *Am J Pathol*, 1986. **124**(2): p. 324-34.
256. Wenger, R.K., et al., *Loss of platelet fibrinogen receptors during clinical cardiopulmonary bypass*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1989. **97**(2): p. 235-9.
257. White, J.G., *Chapter 7 - Platelet Structure*, in *Platelets (Third Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press. p. 117-144.
258. White, J.G., *Fine structural alterations induced in platelets by adenosine diphosphate*. *Blood*, 1968. **31**(5): p. 604-22.
259. White, J.G., *Interaction of membrane systems in blood platelets*. *Am J Pathol*, 1972. **66**(2): p. 295-312.
260. White, J.G. and C.C. Clawson, *The surface-connected canalicular system of blood platelets--a fenestrated membrane system*. *Am J Pathol*, 1980. **101**(2): p. 353-64.
261. White, J.G. and W. Krivit, *An ultrastructural basis for the shape changes induced in platelets by chilling*. *Blood*, 1967. **30**(5): p. 625-35.
262. WILHELM, B. and W. SIESS, *Activation of the cloned platelet thrombin receptor decreases the pertussis-toxin-dependent ADP-ribosylation of the membrane and soluble inhibitory guanine-nucleotide-binding- α proteins*. *European Journal of Biochemistry*, 1993. **216**(1): p. 81-88.
263. Witte, A., et al., *The chemokine CXCL14 mediates platelet function and migration via direct interaction with CXCR4*. *Cardiovasc Res*, 2021. **117**(3): p. 903-917.
264. Woods, V.L., L.E. Wolff, and D.M. Keller, *Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins*. *Journal of Biological Chemistry*, 1986. **261**(32): p. 15242-15251.
265. Woodside, D.G., et al., *Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin β cytoplasmic domains*. *Current Biology*, 2001. **11**(22): p. 1799-1804.
266. Woollard, K.J., et al., *Raised plasma soluble P-selectin in peripheral arterial occlusive disease enhances leukocyte adhesion*. *Circ Res*, 2006. **98**(1): p. 149-56.
267. Wright, J.H., *The Origin and Nature of the Blood Plates*. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 1906. **154**(23): p. 643-645.
268. Yin, H., et al., *Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway*. *Blood*, 2008. **112**(4): p. 1139-46.
269. Yin, H., et al., *The role of Akt in the signaling pathway of the glycoprotein Ib-IX induced platelet activation*. *Blood*, 2008. **111**(2): p. 658-65.
270. Youssefian, T. and E.M. Cramer, *Megakaryocyte dense granule components are sorted in multivesicular bodies*. *Blood*, 2000. **95**(12): p. 4004-7.
271. Yun, S.H., et al., *Platelet Activation: The Mechanisms and Potential Biomarkers*. *Biomed Res Int*, 2016. **2016**: p. 9060143.
272. Zheng, Y.M., et al., *Expression of the platelet receptor GPVI confers signaling via the Fc receptor gamma -chain in response to the snake venom convulxin but not to collagen*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 12999-3006.

273. Zhou, A., et al., *Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases*. J Biol Chem, 1998. **273**(18): p. 11107-14.
274. Ziakas, P.D., et al., *Thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sites, risks, outcome. An overview*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(3): p. 642-5.
275. Zur, B., *Hämoglobinvarianten – Pathomechanismus, Symptome und Diagnostik*. LaboratoriumsMedizin, 2015. **39**: p. 311 - 324.
276. Zwaal, R.F. and A.J. Schroit, *Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1121-32.

6 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Innere Medizin III der Universität Tübingen, Abteilung Kardiologie und Angiologie unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Meinrad P. Gawaz durchgeführt.

Die Konzeption der Studie dieser Dissertation erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz sowie Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. Marcel Kremser, Frau Valerie Dicenta sowie Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing von mir eigenständig durchgeführt mit Ausnahme der *in vitro* Thrombusformations-Versuche, welche von Herrn Dr. Marcel Kremser durchgeführt wurden und der GPVI-Oberflächenexpressionsversuche mit den Inhibitoren PP2 und PRT060318, welche in Zusammenarbeit mit Frau Zoi Laspa durchgeführt wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Einarbeitung durch Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing eigenständig durch mich.

Fink A, Rohlfing AK, Dicenta V, Schaale D, Kremser M, Laspa Z, Sigle M, Fu X, Pelzer A, Fischer M, Münzer P, Castor T, Müller KAL, Borst O, Lämmerhofer M, Gawaz MP. The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI. Thromb Haemost. 2023 Jul;123(7):679-691. doi: 10.1055/s-0043-1768057. Epub 2023 Apr 10. PMID: 37037200.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz sowie Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing. Die Versuche wurden von Herrn Dr. Marcel Kremser, Frau Valerie Dicenta, Frau Zoi Laspa, Herrn David Schaale, Herrn Andreas Pelzer, Frau Xiaoqing Fu, Frau Melina Fischer, Herrn Patrick Münzer und Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing und mir durchgeführt. Alle Autoren haben bei der Interpretation und Diskussion der Ergebnisse teilgenommen. Die Analyse der Daten sowie die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. Michael Lämmerhofer, Herrn Prof. Dr. Oliver Borst, Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing und mich. Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing und ich entwarfen die Abbildungen. Das Manuskript der Publikation wurde durch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz, Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing, Frau Dr. Tatsiana

Castor, Frau Dr. Karin Anne Lydia Müller, Herrn Dr. Marcel Kremser, Herrn Manuel Sigle, Frau Valerie Dicenta, Frau Zoi Laspa und mich verfasst und korrigiert.

Ich versichere, das Manuskript der Dissertation selbstständig nach Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz verfasst und nach Anleitung durch Frau Dr. Tatsiana Castor sowie Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing korrigiert und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

7 Veröffentlichung

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Fink A, Rohlfing AK, Dicenta V, Schaale D, Kremser M, Laspa Z, Sigle M, Fu X, Pelzer A, Fischer M, Münzer P, Castor T, Müller KAL, Borst O, Lämmerhofer M, Gawaz MP. The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI. Thromb Haemost. 2023 Jul;123(7):679-691. doi: 10.1055/s-0043-1768057. Epub 2023 Apr 10. PMID: 37037200.

The final, published version of this article is available at:

<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0043-1768057>

8 Danksagungen

Mein besonderer und aufrichtiger Dank gilt Herrn Professor Dr. Meinrad Paul Gawaz, dem ärztlichen Direktor und Ordinarius des Instituts Innere Medizin III (Kardiologie und Angiologie) des Universitätsklinikums Tübingen. Er ist derjenige, der mir einen Einblick in die Thrombozytenforschung gewährt und somit die Möglichkeit gegeben hat, mich wissenschaftlich zu beschäftigen. Er stand mir mit seinem beachtlichen Wissen und seiner großen Erfahrung stets mit Rat und Tat zur Seite und ist daher maßgeblich für meine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten.

Sehr verbunden bin ich ebenso Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing für ihre Bereitschaft, meine Betreuung zu übernehmen und somit eine nicht wegzudenkende Unterstützung für meine Dissertation zu sein. Besonders für die Herausforderungen beim Aufsetzen der Versuche und deren Analyse waren ihre Anleitung und Erfahrung essentiell für den Erfolg des Vorhabens. Weiterhin danke ich ihr für die hervorragenden Hinweise zur Fertigstellung der schriftlichen Ausarbeitung.

Mein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Marcel Kremser, aufgrund dessen vorangegangener Forschung und daraus entstandenen Themenvorschlags diese Dissertation erst Form annehmen konnte. Ihm habe ich die perfekte Einarbeitung zu verdanken und er stand mir bei Fragen jederzeit helfend zur Verfügung.

Noch vor dem Beginn der Doktorarbeit schenkte mir Frau Dr. Castor bereits ihr Vertrauen, indem sie den Kontakt zu Herrn Professor Dr. Gawaz und seinem Labor hergestellt und ermöglicht hat. Darüber hinaus übernahm sie die Durchsicht der schriftlichen Ausarbeitung. Dafür danke ich ihr sehr.

Ebenfalls gilt mein Dank den Mitarbeitern des Labors von Herrn Professor Dr. Gawaz. Ich habe mich vom ersten Tag herzlich aufgenommen und jederzeit äußerst kompetent unterstützt gefühlt.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die stets an meiner Seite war und mir jegliche Unterstützung zukommen ließ.