

**Neue Mechanismen zur Regulation
des thrombozytären Lipidmetabolismus
und der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion
im Rahmen arterieller Thrombosen**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Mailin-Christin Manke
aus Hamburg

Tübingen
2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

13.02.2024

Dekan:

Prof. Dr. Thilo Stehle

1. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Peter Ruth

2. Berichterstatter/-in:

Prof. Dr. Oliver Borst

3. Berichterstatter/-in:

PD Dr. Amin Polzin

Meiner Familie

Veniet tempus quo ista quae nunc latent in lucem dies extrahat et longioris aevi diligentia.

The time will come when diligent research over long periods will bring to light things which now lie hidden.

Seneca

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis	II
1 Einleitung.....	1
1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen	1
1.2 Thrombozyten	1
1.3 Thrombozytäre Rezeptoren.....	2
1.3.1 Glykoprotein VI	4
1.3.2 C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor 2	5
1.3.3 Protease-aktivierte Rezeptoren	5
1.4 Ca ²⁺ -Signalgebung in Thrombozyten	6
1.4.1 Dense Tubular System	8
1.4.2 Acidic Ca ²⁺ Stores	8
1.5 Sekretion von Granula.....	9
1.6 Aktivierung von Integrin α IIb β 3.....	10
1.7 Prokoagulatorische Eigenschaften von Thrombozyten	11
1.8 Bildung von Thromboxan A ₂	11
1.9 Metabolismus von Lipiden in Thrombozyten	12
1.10 Fragestellung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Versuchstiere	14
2.1.1 Inhalations-/ Injektionsnarkose und Arzneimittel.....	15
2.2 Material	16
2.2.1 Geräte.....	16
2.2.2 Software	17
2.2.3 Verbrauchsgüter	17
2.2.4 Agonisten und Antagonisten.....	18
2.2.5 Antikörper	18
2.2.6 Chemikalien	19

2.2.7	Puffer und Lösungen	20
2.3	Methoden	21
2.3.1	Bestimmung der Blutparameter	21
2.3.2	Isolation muriner Thrombozyten	21
2.3.3	Analyse der Thrombozytenfunktion in vitro	24
2.3.4	Analyse der Hämostase in vitro	28
2.3.5	In vivo Experimente	28
2.3.6	Statistische Auswertung	32
3	Annexin A7	33
3.1	Einleitung	33
3.2	Ergebnisse	35
3.3	Diskussion	40
4	Niemann-Pick C1 Protein.....	43
4.1	Einleitung	43
4.2	Ergebnisse	44
4.3	Diskussion.....	51
5	Casein Kinase 2 α	55
5.1	Einleitung	55
5.2	Ergebnisse	58
5.3	Diskussion.....	62
6	Zusammenfassung	66
7	Abstract.....	69
8	Literaturverzeichnis.....	71
9	Erklärung zum Eigenanteil	83
10	Veröffentlichungen.....	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der Aktivierung von Thrombozyten nach McFadyen et al. 2018. ¹⁶	2
Abbildung 2: Signaltransduktion verschiedener thrombozytärer Rezeptoren.	3
Abbildung 3: Ca ²⁺ als zentraler Mediator in Thrombozyten.	7
Abbildung 4: Schema zur Zucht mittels Cre/loxP-System.	15
Abbildung 5: Schematische Darstellung der FeCl ₃ -induzierten Thrombusbildung.	30
Abbildung 6: Graphische Darstellung der ANXA7-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten. ⁹¹	35
Abbildung 7: Die genetische Deletion von Anxa7 resultiert in einer reduzierten Ca ²⁺ -Mobilisierung und Aktivierung von Thrombozyten nach der Stimulation mit CLEC-2-Agonisten.	36
Abbildung 8: Die Anxa7-Defizienz verursacht eine gestörte in vivo Thrombusbildung, wohingegen die Hämostase nicht signifikant beeinträchtigt ist.	38
Abbildung 9: ABO inhibiert ANXA7 spezifisch in murinem Vollblut und die Applikation von ABO in vivo wirkt antithrombotisch, ohne das Blutungsrisiko zu steigern.	39
Abbildung 10: Die genetische Deletion von Npc1 resultiert in einer beeinträchtigten Aktivierung der Thrombozyten und lässt sich durch die Zugabe von ADP kompensieren.	46
Abbildung 11: Npc1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} -Thrombozyten weisen erhöhte Level an Sphingolipiden und eine gestörte SERCA3-abhängige Ca ²⁺ -Antwort auf.	48
Abbildung 12: Die Npc1-Defizienz verursacht eine gestörte in vivo Thrombusbildung, wohingegen die Hämostase nicht signifikant beeinträchtigt ist.	50
Abbildung 13: Npc1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} -Mäuse sind vor der Entwicklung zerebraler und myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschäden geschützt. ¹²⁷	52
Abbildung 14: Graphische Darstellung der NPC1-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten. ¹²⁷	54
Abbildung 15: Quantitative Analyse des Phosphoproteoms von unstimulierten Csnk2α1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} - und Csnk2α1 ^{lox/lox} -Thrombozyten.	57
Abbildung 16: Die genetische Deletion von Csnk2α1 resultiert in einer gestörten Thrombopoese und einer reduzierten IP ₃ R1-abhängigen Ca ²⁺ -Mobilisierung aus intrazellulären Speichern.	59
Abbildung 17: Die CK2α-Defizienz beeinträchtigt die Aktivierung, Aggregation und Thrombusbildung der Thrombozyten, ohne das Blutungsrisiko der Csnk2α1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} -Mäuse zu beeinflussen.	61
Abbildung 18: Csnk2α1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} -Mäuse sind vor der Entwicklung myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschäden geschützt.	64
Abbildung 19: Graphische Darstellung der CK2α-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten.	65
Abbildung 20: Graphische Darstellung der NPC1-, CK2α- und ANXA7-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose.	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchstiere.....	14
Tabelle 2: Inhalations-/ Injektionsnarkose und Arzneimittel.....	15
Tabelle 3: Geräte.....	16
Tabelle 4: Software.....	17
Tabelle 5: Verbrauchsgüter.....	17
Tabelle 6: Agonisten und Antagonisten.....	18
Tabelle 7: Antikörper.....	18
Tabelle 8: Chemikalien.....	19
Tabelle 9: Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 10: Primer und PCR-Zyklus.....	22
Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.....	23
Tabelle 12: Blutwerte und Expressionsmuster thrombozytärer Rezeptoren in Npc1 ^{lox/lox} - und Npc1 ^{Pf4Δ/Pf4Δ} -Mäusen.....	44

Abkürzungsverzeichnis

CLEC-2	C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor 2
[Ca ²⁺] _i	Intrazelluläre Ca ²⁺ -Konzentration
12-HETE	<i>12-hydroxy-eicosatetraenoic acid</i>
AA	Arachidonsäure
ABO	6-Amino-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazin
ADP	Adenosindiphosphat
ANXA7	Annexin A7
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin)
COX-1	Cyclooxygenase-1
CRP	<i>collagen-related peptide</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
DTS	<i>dense tubular system</i>
FcR γ	Fc-Rezeptor γ -Ketten
FI	Fluoreszenzintensität
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPVI	Glykoprotein VI
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>

LAT	<i>linker for activation of T cells</i>
MK	Megakaryozyt
NAADP	<i>nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate</i>
NCX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NPC	Niemann-Pick-Krankheit Typ C
NPC1	Niemann-Pick C1 Protein
Orai1	<i>Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel protein 1</i>
P2Y ₁₂	<i>P2Y purinoceptor 12</i>
PARs	Protease-aktivierte Rezeptoren
Pf4	Plättchenfaktor 4
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PMCA _s	<i>plasma membrane Ca²⁺ ATPases</i>
PPP	Thrombozyten-armes Plasma (<i>platelet poor plasma</i>)
PRP	Thrombozyten-reiches Plasma (<i>platelet rich plasma</i>)
PT	Prothrombinzeit
RC	Rhodocytin
SERCA _s	<i>sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPases</i>
SFKs	<i>Src family kinases</i>
SOCE	<i>store-operated Ca²⁺ entry</i>
STIM1	<i>stromal interaction molecule 1</i>
TBHQ	<i>2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone</i>
TG	Thapsigargin
TxA ₂	Thromboxan A ₂
TxA ₂ R	TxA ₂ -Rezeptor
VECs	vaskuläre Endothelzellen
vWF	von-Willebrand-Faktor

1 Einleitung

1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

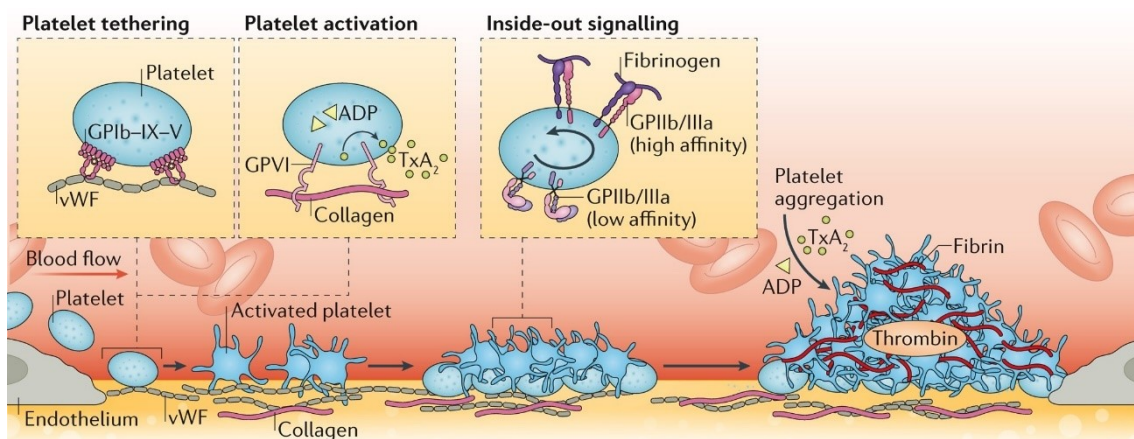
Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die häufigste Todesursache weltweit und haben 2019 nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation knapp ein Drittel aller Todesfälle verursacht.¹ In Deutschland starben 2021 laut dem Statistischen Bundesamt 340 619 Menschen an Herz-/Kreislaufkrankungen, was 33% aller Sterbefälle entspricht.² Neben der koronaren Herzkrankheit und dem Schlaganfall steigt zudem die Prävalenz kardiometabolischer Erkrankungen, darunter Diabetes mellitus und Adipositas, die als kardiovaskuläre Risikofaktoren gelten.³⁻⁵ Um diese Herausforderungen zu bewältigen, ist die Entwicklung neuer präventiver und therapeutischer Ansätze unerlässlich. Die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen hat gezeigt, dass Thrombozyten entscheidend an thrombo-okklusiven sowie -inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sind, weshalb Antithrombotika weit verbreitete Arzneimittel darstellen. Trotz großer Bemühungen in diesem Forschungsbereich zählen starke Blutungen weiterhin zu den Komplikationen der antithrombotischen Therapie. Daraus resultiert ein ungedeckter Bedarf an Medikamenten, welche zwar die übersteigerte Aktivierung von Thrombozyten verhindern, jedoch nicht deren hämostatische Funktion stören.⁶

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kleine Blutzellen, die keinen Nukleus besitzen und sich durch eine kurze Lebensdauer von fünf bis zwölf Tagen auszeichnen. Sie entstehen aus Proplättchen, die wiederum von polyploiden Megakaryozyten in die Sinusoiden des Knochenmarks abgeschnürt werden.⁷ Unter physiologischen Bedingungen reagieren Thrombozyten auf Verletzungen in der Gefäßwand und limitieren den Blutverlust. Bei einer veränderten Anzahl (Normbereich: $150-400 \times 10^3/\mu\text{L}$ Blut) oder einer gestörten Funktion der Thrombozyten steigt das Risiko für Hämorrhagien oder Thrombosen. Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren, wie zum Beispiel einer Dyslipoproteinämie, weisen oftmals hyperreaktive Thrombozyten oder atherosklerotische Plaques auf, die die

Wahrscheinlichkeit für thrombo-okklusive Erkrankungen erhöhen.^{8,9} Die Plaques lagern sich in den arteriellen Gefäßwänden ein und können über Jahrzehnte asymptomatisch verlaufen. Man spricht von subklinischer Atherosklerose. Sobald es jedoch zur Ruptur der atherosklerotischen Plaques kommt, werden Proteine der subendothelialen Matrix freigelegt, die spezifisch an thrombozytäre Rezeptoren binden. Dies hat eine pathophysiologische Aktivierung der Thrombozyten zur Folge, wodurch diese adhären, aggregieren und einen Thrombus bilden (Abbildung 1). Die Thrombusbildung kann zu einer vaskulären Okklusion führen und in Abhängigkeit von deren Lokalisation einen Herzinfarkt oder Schlaganfall verursachen.^{10,11}

Neben ihrer traditionellen Rolle in Hämostase und Thrombose zeigen immer mehr Studien eine Interaktion zwischen Thrombozyten und Endothel- oder Immunzellen.^{12,13} Die bilaterale Kommunikation zwischen thrombotischen und inflammatorischen Prozessen wird als Thrombo-Inflammation bezeichnet und ist an verschiedenen Krankheitsbildern, darunter Ischämie-/Reperfusionsschäden oder COVID-19, beteiligt.^{14,15}



Nature Reviews | Cardiology

Abbildung 1: Mechanismus der Aktivierung von Thrombozyten nach McFadyen et al. 2018.¹⁶
Adenosindiphosphat (ADP), Glykoprotein (GP), Thromboxan A₂ (TxA₂), von-Willebrand-Faktor (vWF).

1.3 Thrombozytäre Rezeptoren

Thrombozyten exprimieren eine Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, durch die sie auf Ereignisse in ihrer Umgebung reagieren können. Zu den wichtigsten zählen das Glykoprotein VI (GPVI) und das Integrin

$\alpha 2\beta 1$, die an exponiertes Kollagen binden, die Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), die mit Thrombin interagieren, welches im Rahmen der Koagulationskaskade entsteht, oder der GPIb-V-IX-Komplex, welcher bei hohen Scherraten an von-Willebrand-Faktor (vWF) adhärert.¹⁷ Diese und weitere Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen stimulieren die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonderer Fokus auf die Signaltransduktion downstream von GPVI, aber auch von dem C-Typ Lektin-ähnlichen Rezeptor 2 (CLEC-2) und PAR3/4 gelegt, welche in dem folgenden Abschnitt näher beschrieben werden (Abbildung 2).

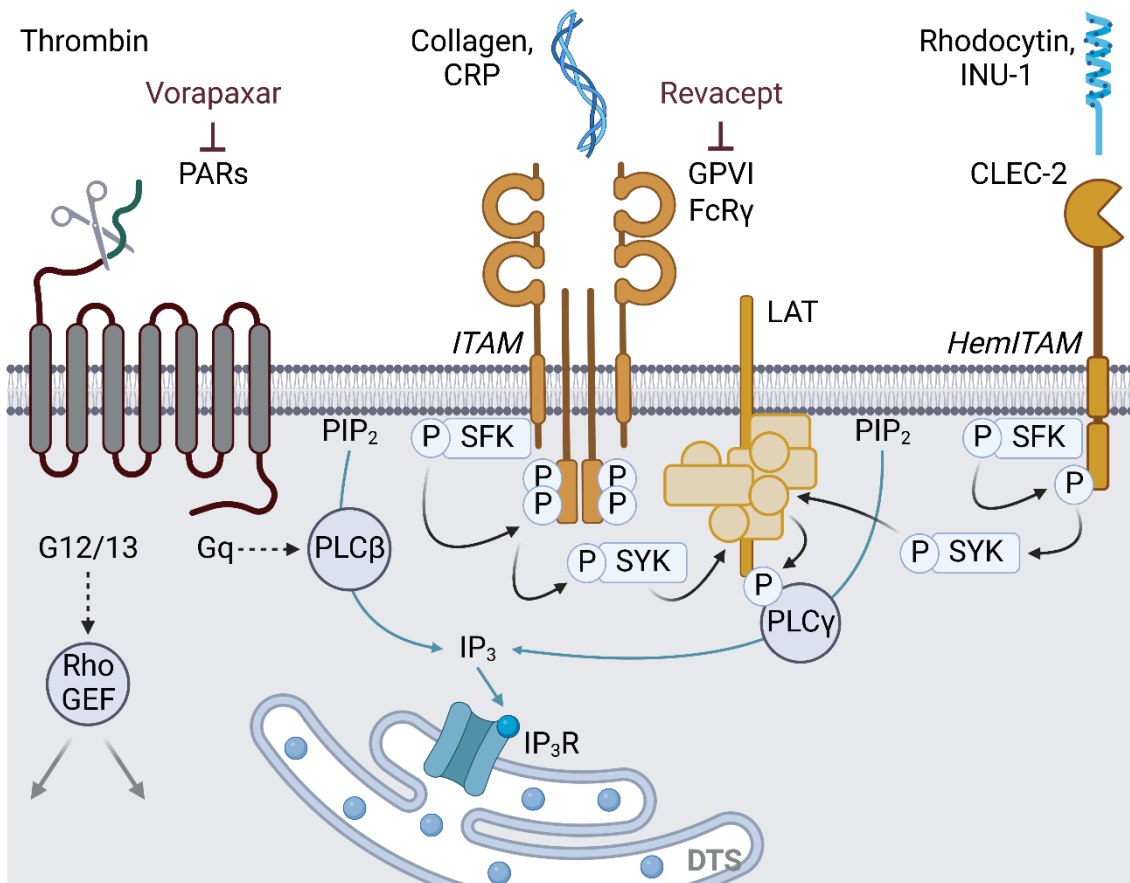


Abbildung 2: Signaltransduktion verschiedener thrombozytärer Rezeptoren. C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor 2 (CLEC-2), collagen-related peptide (CRP), Fc-Rezeptor γ -Ketten (FcR γ), guanine nucleotide-exchange factor (GEF), Glykoprotein VI (GPVI), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), IP₃-Rezeptor (IP₃R), immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), linker for activation of T cells (LAT), Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Phospholipase C (PLC), Src family kinases (SFks).

1.3.1 Glykoprotein VI

Die Antwort von Thrombozyten auf exponiertes Kollagen wird im Wesentlichen von dem Glykoprotein VI (GPVI) vermittelt.¹⁸⁻²⁰ Der GPVI-Rezeptor ist Teil der Immunglobulin-Superfamilie und wird ausschließlich von Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert,²¹ was ihn zu einem vielversprechenden Ziel für neue Antithrombotika macht. Die Signaltransduktion von GPVI-Rezeptoren erfordert das Clustering mit Fc-Rezeptor γ -Ketten (FcR γ), die eine konservierte Sequenz an Aminosäuren besitzen (YXXL-(X)₁₀₋₁₂-YXXL; immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)).^{22, 23} Kollagen bindet GPVI über ein helikales Strukturelement, welches sich durch die Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Hydroxyprolin (GPO) auszeichnet, und induziert so die Aktivierung von Thrombozyten.²⁴ Der GPVI-spezifische Agonist collagen-related peptide (CRP) - der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, um die Signalkaskade downstream von GPVI zu untersuchen - enthält Wiederholungen dieser Sequenz (([GCO[GPO]₁₀GCOG-amide]₃)_n). CRP bildet in Lösung eine stabile Triple-Helix aus und mimikriert dadurch die Wirkung von Kollagen auf Thrombozyten.²⁵ Die Aktivierung des GPVI-Rezeptors induziert die Phosphorylierung des FcR γ ITAMs durch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie (Src family kinases (SFKs)). Die phosphorylierten Tyrosine werden durch die Tyrosin-Kinase Syk gebunden, die ihrerseits phosphoryliert wird. Anschließend phosphoryliert Syk das Adapterprotein linker for activation of T cells (LAT), was in der Rekrutierung weiterer Effektoren resultiert. Die GPVI-vermittelte Signalkaskade mündet in der Phosphorylierung und damit Aktivierung der Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) und aktiviert die Thrombozyten letztlich über eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration ([Ca²⁺]_i) (siehe 1.4 Ca²⁺-Signalgebung in Thrombozyten).

Ein aussichtsreicher Ansatz für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen war die Entwicklung des humanen GPVI-Fc-Fusionsproteins Revacept, welches den GPVI-Rezeptor mimikriert. Durch die kompetitive Bindung von Revacept an exponiertes Kollagen verhindert es die Kollagen-induzierte Aktivierung von Thrombozyten, ohne die physiologische Hämostase zu beeinträchtigen.^{26, 27} In einer aktuellen Phase-II-Studie konnte Revacept die Myokardschädigung des behandelten Patientenkollektivs jedoch nicht verbessern und verfehlte so den

primären Endpunkt der Studie, sodass weitere Untersuchungen seine klinische Wirksamkeit unter Beweis stellen müssen.²⁸

1.3.2 C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor 2

Ein weiterer Rezeptor, durch den Thrombozyten aktiviert werden und dessen Signaltransduktion der von GPVI ähnelt, ist der C-Typ Lektin-ähnliche Rezeptor 2 (CLEC-2).²⁹⁻³¹ CLEC-2 enthält im Gegensatz zum GPVI/FcRγ-Komplex nur ein einzelnes YXXL-Motiv (hemITAM) und Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass sich die ersten Ereignisse in den Signalkaskaden der beiden Rezeptoren unterscheiden.^{32, 33} Davon abgesehen münden beide Signalwege in der Phosphorylierung von Syk und der Aktivierung der PLCγ2. Zu den bekanntesten Agonisten von CLEC-2 zählen Rhodocytin – ein Schlangengift, welches zur Identifikation von CLEC-2 eingesetzt wurde – und der endogene Ligand Podoplanin.^{34, 35} Der Arbeitsgruppe um Prof. Nieswandt gelang es zudem, einen spezifischen Antikörper gegen murines CLEC-2 (INU-1) zu entwickeln.³⁶ Die Charakterisierung von Mäusen, die eine Antikörper- oder genetisch-induzierte Defizienz des CLEC-2-Rezeptors aufweisen, bestätigte die Bedeutung von CLEC-2 für die arterielle Thrombusbildung in vivo.^{36, 37}

1.3.3 Protease-aktivierte Rezeptoren

Die Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und umfassen vier Mitglieder mit spezifischen Funktionen.³⁸ Auf humanen Thrombozyten werden PAR1 und 4 exprimiert, wohingegen auf murinen Thrombozyten PAR3 und 4 exprimiert werden.³⁹ Die bekannteste Protease, die PARs aktiviert, ist Thrombin, welches in der plasmatischen Gerinnungskaskade entsteht. Thrombin spaltet einen Teil des extrazellulären N-Terminus der PARs ab und legt dadurch eine Sequenz frei, die intramolekular an die PARs bindet und als „tethered ligand“ bezeichnet wird.⁴⁰ Die Ligandenbindung verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptors und induziert die nachgeschaltete Signaltransduktion. Dabei aktivieren PAR1 und 4 in Thrombozyten Rho bzw. Rho-Kinasen via G12/13 und induzieren eine PLCβ-vermittelte Mobilisierung von Ca²⁺ via Gq,⁴¹ wohingegen PAR3 hauptsächlich als Kofaktor für PAR4 nötig zu sein scheint.⁴² Aufgrund der zentralen Bedeutung von

Thrombin für die Aktivierung von Thrombozyten sind dessen Rezeptoren ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Antithrombotika. Ein erster PAR1-Antagonist wurde zwar 2014 von der US-amerikanischen Food and Drug Administration zugelassen, der klinische Einsatz von Vorapaxar (SCH 530348, Merck) ist jedoch wegen eines erhöhten Blutungsrisikos limitiert.⁴³

Die Aktivierung von Thrombozyten downstream der verschiedenen Rezeptoren wird von zahlreichen Prozessen reguliert, beispielsweise der Modifikation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) oder dem Metabolismus thrombozytärer Lipide.

1.4 Ca^{2+} -Signalgebung in Thrombozyten

Wie in vielen anderen Zelltypen dient Ca^{2+} auch in Thrombozyten als zentraler sekundärer Botenstoff („second messenger“) und trägt durch die Verknüpfung verschiedener Signalkaskaden entscheidend zur Funktion der Thrombozyten bei (Abbildung 3).⁴⁴ Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) löst eine Vielzahl biochemischer und morphologischer Veränderungen aus.¹⁰ Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist, dass $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Ruhezustand stabil ist. Dies wird durch ATPasen gewährleistet, die Ca^{2+} gegen einen Gradienten pumpen und so dem schwachen, aber anhaltenden Leckstrom von Ca^{2+} -Ionen entgegenwirken. Man unterscheidet plasma membrane Ca^{2+} ATPases (PMCAs), welche Ca^{2+} -Ionen über die Plasmamembran zurück in den extrazellulären Raum transportieren, und sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPases (SERCAs), welche die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher füllen.⁴⁵ Bisher wurden zwei Ca^{2+} -Speicher in Thrombozyten beschrieben: Das dense tubular system (DTS), welches dem Endoplasmatischen Retikulum anderer Zellen entspricht, und die acidic Ca^{2+} stores, die auch als Lysosom-ähnliche Organellen (lysosome-related organelles) bezeichnet werden. Pharmakologische Studien belegen, dass die beiden Ca^{2+} -Speicher mit unterschiedlichen SERCA-Isoformen assoziiert sind: Die Ca^{2+} -Mobilisierung aus dem DTS ist SERCA2b-abhängig und lässt sich durch Thapsigargin, einen SERCA2b-Inhibitor, verhindern, wohingegen die acidic Ca^{2+} stores sensitiv gegenüber 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (TBHQ),

1.4.1 Dense Tubular System

Das DTS gilt als wesentliche Quelle von intrazellulär gespeichertem Ca^{2+} in Thrombozyten. Nach der Stimulation der Thrombozyten werden Agonisten-spezifische Phospholipase C (PLC)-Isoformen aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ($\text{PIP}_2[4',5']$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) hydrolysieren.^{48, 49} Sowohl IP_3 als auch DAG sind Signalmoleküle, die die Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ einleiten. IP_3 bindet an seinen Rezeptor (IP_3R ; Typ 1 und 2), der in der Membran des DTS sitzt und den Ausstrom von Ca^{2+} aus dem DTS steuert. Die Aktivität des IP_3Rs kann durch dessen Phosphorylierung reguliert werden. Beispielhaft hierfür ist die Phosphorylierung des Ser1755, welches die Öffnungswahrscheinlichkeit des $\text{IP}_3\text{R1s}$ erhöht.^{50, 51} Die abnehmende Ca^{2+} -Konzentration im DTS wird durch den Ca^{2+} -Sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) registriert,^{52, 53} der wiederum das Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel protein 1 (Orai1), einen Ca^{2+} -Kanal in der Plasmamembran, aktiviert.^{54, 55} Dadurch wird eine Pore geformt, die einen Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum vermittelt und das DTS wieder füllt. Dieser Ca^{2+} -Einstrom wird als store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) bezeichnet.⁴⁸

1.4.2 Acidic Ca^{2+} Stores

Im Vergleich zum DTS ist die Beschaffenheit der acidic Ca^{2+} stores deutlich weniger erforscht. Beobachtungen von López et al. aus dem Jahr 2005 legen nahe, dass es sich bei diesen Speichern hauptsächlich um Lysosomen bzw. Lysosom-ähnliche Organellen handelt. Außerdem ist bekannt, dass die Akkumulation von Ca^{2+} in diesen Speichern abgesehen von der SERCA3-Aktivität auch von einem sauren pH-Wert abhängt, der durch vakuolare H^+ -ATPasen aufrecht erhalten wird.⁵⁶ Die Freisetzung von Ca^{2+} aus den acidic Ca^{2+} stores wird durch nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) vermittelt und ist Agonisten-spezifisch.^{57, 58} Während Adenosindiphosphat (ADP) ausschließlich Ca^{2+} aus dem DTS mobilisiert, erhöhen sowohl Thrombin als auch CRP die NAADP-Konzentration in humanen Thrombozyten.^{59, 60} Um die physiologische Relevanz der acidic Ca^{2+} stores zu demonstrieren, untersuchte die Arbeitsgruppe um Prof. Rosa und Prof. Bobe die Thrombozyten von *Serca3*-defizienten Mäusen. Dabei zeigte sich, dass *Serca3*^{-/-}-Mäuse nicht nur eine

verlängerte Blutungszeit, sondern auch eine gestörte in vivo Thrombusbildung aufweisen. Interessanterweise, machte die exogene Zugabe von ADP die Funktionsdefekte in vitro rückgängig, was auf eine beeinträchtigte Sekretion von dichten Granula hinweist.^{58, 61} Spätere Studien bestätigten diese Beobachtungen und wiesen vor allem eine Beteiligung der SERCA3-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung an der frühen ADP-Freisetzung nach.⁵⁸ Diese Befunde unterstreichen nicht nur die Komplexität der Ca^{2+} -Signalgebung, sondern heben auch hervor, dass neben der Menge auch die raumzeitliche Komponente der ausströmenden Ca^{2+} -Ionen von Bedeutung ist.

Verschiedene Prozesse werden in besonderem Ausmaß von der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert und tragen so entscheidend zur Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von Thrombozyten bei. Dazu zählen die Sekretion von Granula, die Aktivierung von Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$, die prokoagulatorischen Eigenschaften von Thrombozyten und die Bildung von Thromboxan A_2 (TxA_2).

1.5 Sekretion von Granula

Wie in vielen anderen Zelltypen bildet der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auch in Thrombozyten die Grundlage für die Sekretion.⁶² Thrombozyten besitzen verschiedene Arten von Granula, deren bioaktive Inhaltsstoffe nach der thrombozytären Aktivierung sezerniert werden.⁶³ Die Granula lassen sich in α - und δ - bzw. dichte Granula sowie Lysosomen unterscheiden, wobei Letztere am wenigsten erforscht sind. Die α -Granula kommen am häufigsten vor und speichern eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen. Dazu zählen sowohl Membranproteine wie P-Selektin und Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ als auch lösliche Proteine wie Koagulationsfaktoren, Chemokine oder Wachstumsfaktoren.^{64, 65} In den δ -Granula lagern hauptsächlich kleine Moleküle. Sie enthalten unter anderem ATP bzw. ADP, Serotonin, Phosphate und Ca^{2+} .⁶⁴ Letztere verleihen den δ -Granula ihre Opazität gegenüber Elektronen und die damit verbundene charakteristische Färbung unter dem Elektronenmikroskop.^{66, 67} Die δ -Granula zeichnen sich zudem durch einen sauren pH-Wert aus, aufgrund dessen sie sich durch acidophile Farbstoffe wie Mepakrin anfärben lassen.⁶⁶ Experimentell wird die

Sekretion der Granula durch den Nachweis spezifischer Inhaltsstoffe untersucht: Die aktivierungsabhängige Translokation von P-Selektin auf die Oberfläche der Thrombozyten reflektiert die Freisetzung von α -Granula, wohingegen die Messung von ATP oder Serotonin dazu dient, die Ausschüttung der δ -Granula zu evaluieren.

Die Entleerung der Granula in das Plasma wirkt sich auf verschiedene Zelltypen am Ort der Gefäßverletzung aus. Neben einer autokrinen und parakrinen Aktivierung der Thrombozyten vermitteln die sezernierten Substanzen die Interaktion mit Endothel- oder Immunzellen.^{13, 68} Aus diesem Grund ist die Sekretion der thrombozytären Granula nicht nur wichtig für die Progression des wachsenden Thrombus, sondern ist auch essentiell an thrombo-inflammatorischen Prozessen beteiligt.

1.6 Aktivierung von Integrin α IIb β 3

Integrine sind eine große Familie von transmembranen Rezeptoren, die die Adhäsion von Zellen an Proteine der extrazellulären Matrix oder an benachbarte Zellen vermitteln. Sie bestehen aus jeweils einer α - und einer β -Untereinheit und werden Zelltyp-spezifisch exprimiert.⁶⁹ Thrombozyten exprimieren fünf unterschiedliche Heterodimere (α 2 β 1, α 5 β 1, α 6 β 1, α IIb β 3 und α v β 3), von denen Integrin α IIb β 3 (bzw. GPIIb/IIIa) am häufigsten auf der Oberfläche von Thrombozyten vorkommt.⁷⁰ Die Interaktion zwischen Integrin α IIb β 3 und seinen extrazellulären Liganden setzt dessen Konformationsänderung voraus, durch die sich die Bindungsaffinität des Rezeptors erhöht.^{71, 72} Die Aktivierung des Integrins α IIb β 3 wird durch die Agonisten-induzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ angestoßen und ermöglicht die Vernetzung bzw. Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogen oder vWF („inside-out“).^{73, 74} Die Bindung eines Liganden induziert wiederum intrazelluläre Signalkaskaden, die unter anderem das Spreading der Thrombozyten regulieren („outside-in“).^{75, 76} Das Spreading der Thrombozyten resultiert aus einer Reorganisation des Zytoskeletts, durch die sich die Plasmamembran ausdehnt und Filopodien bzw. Lamellipodien entstehen.⁷⁶ Die Bedeutung von Integrin α IIb β 3 für die Aggregation der Thrombozyten zeigt sich

nicht zuletzt darin, dass Patienten mit einer Loss-of-Function-Mutation in dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Gen an einer verstärkten Blutungsneigung leiden.^{77, 78}

1.7 Prokoagulatorische Eigenschaften von Thrombozyten

Neben ihrer zentralen Bedeutung in der primären Hämostase unterstützen aktivierte Thrombozyten auch die plasmatische Gerinnungskaskade.⁷⁹ Dabei wird die prokoagulatorische Antwort von einer Subpopulation der Thrombozyten vermittelt, die sich durch ein spezifisches Expressionsmuster auf ihrer Plasmamembran auszeichnet.⁸⁰ Nach der Stimulation exponieren Thrombozyten negativ geladenes Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche, welches in Gegenwart von Ca^{2+} verschiedene Gerinnungsfaktoren bindet und experimentell durch Annexin V-Konjugate detektiert werden kann.⁸¹ Es bildet sich ein enzymatischer Komplex aus Faktor Va, Faktor Xa, Phospholipiden und Ca^{2+} , der als Prothrombinase bezeichnet wird und lokal die Proteolyse von Prothrombin (Faktor II) in Thrombin katalysiert.⁸² Das gebildete Thrombin stimuliert PARs (siehe 1.3.3 Protease-aktivierte Rezeptoren), aktiviert weitere Gerinnungsfaktoren und hydrolysiert Fibrinogen zu Fibrin, wodurch ein stabiler Thrombus entsteht.

1.8 Bildung von Thromboxan A₂

Die Aktivierung von Thrombozyten resultiert in einer Freisetzung von Arachidonsäure, welche durch eine erhöhte Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen Phospholipase A₂ aus Phospholipiden der Plasmamembran abgespalten wird.⁸³ Die Arachidonsäure wird anschließend durch verschiedene Enzyme, darunter die Cyclooxygenase-1 (COX-1) oder die 12-Lipoxygenase, oxidiert. Die entstandenen Metabolite werden als Eicosanoide klassifiziert und umfassen Prostaglandine, Thromboxane oder Leukotriene.⁸⁴ Eicosanoide sind an einer Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel Schmerz, Inflammation oder Hämostase.⁸⁵ In aktivierten Thrombozyten katalysiert die COX-1 die Synthese von Thromboxan A₂ (TxA₂), welches lokal ausgeschüttet wird und über den TxA₂-Rezeptor die Aggregation der Thrombozyten initiiert bzw. amplifiziert.^{86, 87} Dabei wird die klinische Bedeutung der TxA₂-vermittelten Signaltransduktion durch den hohen Stellenwert des COX-

1-Inhibitors Acetylsalicylsäure (ASS; Aspirin) bei der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen deutlich.⁸⁸

1.9 Metabolismus von Lipiden in Thrombozyten

Neben der $[Ca^{2+}]_i$ beeinflusst auch die Homöostase von Lipiden die Funktion der Thrombozyten.⁸⁹ Nach der Aktivierung der Thrombozyten verändert sich nicht nur die Zusammensetzung thrombozytärer Membranlipide, sondern es werden auch große Mengen an Lipidmediatoren gebildet.^{90,91} Umgekehrt modulieren bioaktive Lipide den Aktivierungsprozess über positive oder negative Rückkopplungen und vermitteln die Interaktion mit inflammatorischen Zellen im Rahmen thromboinflammatorischer Erkrankungen.⁹²

Neueste Entwicklungen im Bereich der Massenspektrometrie erlauben eine umfassendere Erforschung des Lipidprofils von Thrombozyten, dem sogenannten Lipidom.^{90,93} Dazu zählt die quantitative Analyse individueller PIP-Isomere, deren dynamische Umsetzung eine zentrale Rolle in der Ca^{2+} -Signaltransduktion zukommt (siehe 1.4 Ca^{2+} -Signalgebung in Thrombozyten).^{94,95} Darüber hinaus können diese Technologien für die Suche nach vielversprechenden pharmakologischen Angriffspunkten oder zur Identifizierung neuer Biomarker eingesetzt werden.^{91,96}

1.10 Fragestellung

Die Aktivierung von Thrombozyten wird durch ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Signalkaskaden gesteuert und resultiert auf molekularer Ebene in einer Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ und gravierenden Veränderungen des thrombozytären Lipidoms. Die feine Abstimmung dieser Prozesse ist essentiell, um das Gleichgewicht zwischen Thrombose und Hämostase zu gewährleisten. Gleichzeitig stellen die beteiligten Signalmoleküle potentielle Angriffspunkte dar, um einer pathophysiologischen Aktivierung der Thrombozyten – und damit Herzinfarkt oder Schlaganfall – vorzubeugen, ohne deren hämostatische Funktion zu beeinträchtigen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern drei ausgewählte Regulatoren der Ca^{2+} - und Lipid-abhängigen Signaltransduktion die Funktion von Thrombozyten beeinflussen. Dazu wurden unterschiedliche Knockout-Mäuse verwendet und die Eigenschaften von deren Thrombozyten wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* charakterisiert. Anhand der erhobenen Daten sollte nicht nur ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen geschaffen werden, sondern auch ein möglicher therapeutischer Nutzen für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen abgeleitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt und in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Erstbeschreibung und Bezeichnung der genetisch-veränderten Mauslinien, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, wurden in Tabelle 1 zusammengefasst. Für die Versuche wurden weibliche und männliche Mäuse im Alter von 4 bis 16 Wochen aus eigener Zucht verwendet.

Tabelle 1: Versuchstiere.

Bezeichnung	Nomenklatur	Referenz	MGI ID
<i>Anxa7</i> ^{+/+} / <i>Anxa7</i> ^{-/-}	129S.B6- <i>Anxa7</i> ^{tm1Ngl}	[97] Herr et al., 2001	2159006
<i>Npc1</i> ^{lox/lox}	B6. <i>Npc1</i> ^{tm1.1Apl}	[98] Elrick et al., 2010	4431252
<i>Csnk2a1</i> ^{lox/lox}	B6. <i>Csnk2a1</i> ^{tm1.1Mfla}	[99] Rebholz et al., 2013	6149735
<i>Pf4 Cre</i> <i>C57BL/6J</i>	Tg(<i>Pf4-icre</i>)Q3Rsko	[100] Tiedt et al., 2007	3764698

Bei den Mäusen mit einer genetischen Deletion des *Anxa7*-Gens handelt es sich um globale Knockouts.⁹⁷ Die Mauslinie wurde auf einen 129SvJ-Hintergrund zurückgekreuzt und zeigt keine Genotyp-bedingten Belastungen.

Um Versuchstiere mit einer Megakaryozyten (MK)-/Thrombozyten-spezifischen Deletion von *Npc1* oder *Csnk2a1* zu züchten, wurde das Cre/loxP-System verwendet (siehe Abbildung 4). Dazu wurden zunächst Mäuse, bei denen beide Allele des Zielgens durch loxP-Sequenzen flankiert sind (*lox/lox*), mit Mäusen verpaart, die heterozygot für eine dem Plättchenfaktor 4 (Pf4)-Promotor nachgeschaltete Cre-Rekombinase sind (Pf4-Cre/+).⁹⁸⁻¹⁰⁰ Durch das erfolgreiche Einkreuzen von Pf4-Cre in die jeweiligen *lox/lox*-Mäuse wurden Knockouts (Gen^{*lox/lox*Pf4-Cre⁺}, Gen^{*Pf4Δ/Pf4Δ*}) erzeugt, deren phänotypische Veränderungen im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren (Gen^{*lox/lox*Pf4-Cre⁻}, Gen^{*lox/lox*}) erforscht werden konnten. Da Pf4 hauptsächlich in Megakaryozyten transkribiert wird und Thrombozyten keine genomische DNA besitzen, wirkt sich die Deletion des geflochten Gens durch die Cre-Rekombinase nur auf diese Zellen aus.

Aufgrund des MK-/Thrombozyten-spezifischen Verlusts des Zielgens liegen weder bei *Csnk2a1*- noch bei *Npc1*-defizienten Mäusen Genotyp-bedingte Belastungen vor.

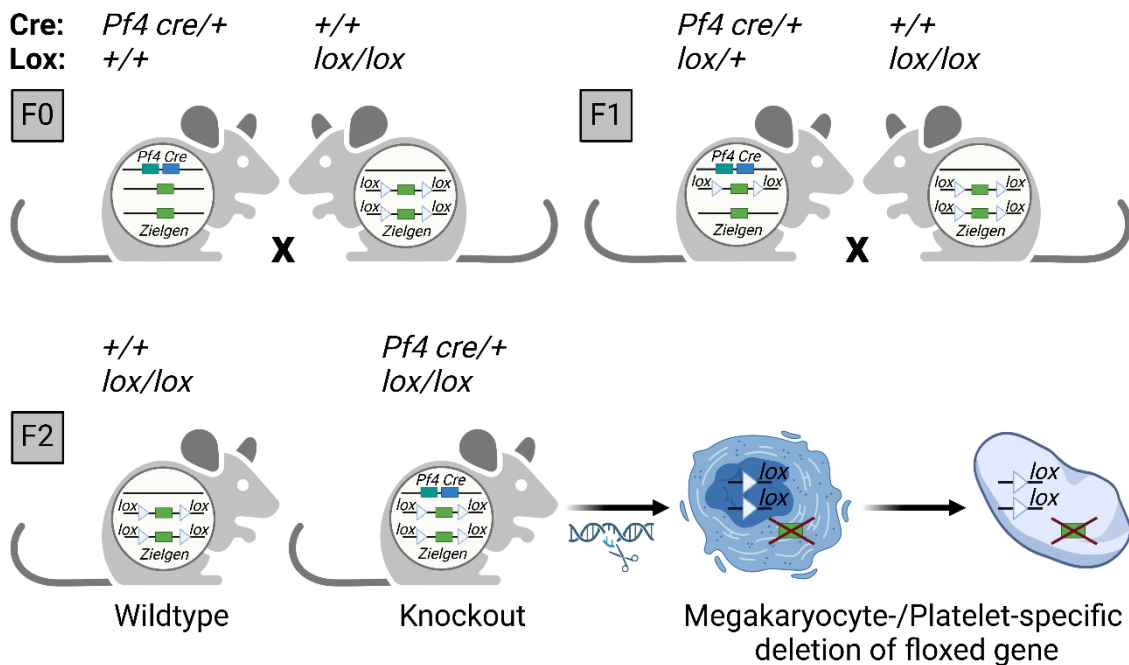


Abbildung 4: Schema zur Zucht mittels Cre/loxP-System.

2.1.1 Inhalations-/ Injektionsnarkose und Arzneimittel

Tabelle 2: Inhalations-/ Injektionsnarkose und Arzneimittel.

Arzneimittel	Dosis	Hersteller
Isofluran	1-5% (v/v)	CP-Pharma, Burgdorf, D
Sauerstoff	Trärgas; 1L/min	Linde, Dublin, IRL
Fentanyl	0,05µg/g KG	Eurovet Animal Health/ Dechra Pharmaceuticals, Northwich, UK
Medetomidin	0,5µg/g KG	Eurovet Animal Health/ Dechra Pharmaceuticals, Northwich, UK
Midazolam	5µg/g KG	Hameln Pharma, Hameln, D
Kochsalzlösung	0,9% (w/v)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Enrofloxacin	1mL 2,5% (w/v) Baytril in 100mL Trinkwasser	Bayer Vital, Leverkusen, D
Ampuwa	Lösungsmittel	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D

KG: Körpergewicht, D: Deutschland, IRL: Irland, UK: Großbritannien.

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Aggregometer	Model 700	Chrono-log, Havertown, PA, USA
CO ₂ -Inkubator	MCO-18AIC	Sanyo, Osaka, JP
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Flusskammer	5mm x 50µm	Maastricht Instruments, Maastricht, NL
Hämatologie-Analyse	KX-21N	Sysmex Europe, Norderstedt, D
Hämostase-Analyse	STart 4	Stago Deutschland, Düsseldorf, D
Heizblock	Accublock Mini	Labnet, Edison, NJ, USA
Infusionspumpe	KDS-100-CE	KD Scientific, Holliston, MA, USA
Kaltlichtquelle	KL 1500 LCD	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Lichtmikroskope	Eclipse Ni-U FN-S2N Eclipse Ti2-A	Nikon Europe BV, Amstelveen, NL
Linearbeschleuniger	LINAC SL25	Philips, Amsterdam, NL
Magnetrührer	Ikamag	IKA, Staufen, D
Mikroplatten-Reader	GloMax	Promega, Madison, WI, USA
Narkosekammer	UV 17006	Groppler, Deggendorf, D
Narkoseverdampfer	UniVet Mobil	Groppler, Deggendorf, D
pH-Messgerät	SevenCompact	Mettler-Toledo, Gießen, D
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg, D
Präzisionswaage	AT261 BD BC 200	Mettler-Toledo, Gießen, D Sartorius, Göttingen, D
Rollenmischer	RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen, D
Spektralphotometer	NanoDrop2000	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Spektrofluorometer	LS 55	PerkinElmer Germany, Rodgau, D
Stereomikroskop	Stemi 2000-C	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Sterilbank	HERAsafe	Unity Lab Services/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Stromversorgung	PowerPac	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Taschenwaage	CM 150-1N	Kern&Sohn, Balingen, D
Thermomixer	Comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Thermocycler	DNA Engine	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Thrombinoskop, CAT	QWERTY	Stago Deutschland, Düsseldorf, D
Vortexer	VF2	IKA, Staufen, D
Wärmeunterlage	ThermoLux	Witte + Sutor, Murrhardt, D
Wasseraufbereitung	Barnstead GenPure	Unity Lab Services/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Western Blot-Dokumentation	Odyssey Infrared	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Wet/Tank-Blotsystem	Mini Trans-Blot	Bio-Rad, Hercules, CA, USA

Zentrifugen 5417C, 5417R Eppendorf, Hamburg, D
 Rotina 420R Hettich, Tuttlingen, D

D: Deutschland, JP: Japan, NL: Niederlande, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.2 Software

Tabelle 4: Software.

Software	Version	Hersteller
Aggrolink8	1.1.0	Chrono-log, Havertown, PA, USA
CellQuest Pro	4.a.1ffb	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
EndNote	20.2.1	Clarivate, Philadelphia, PA, USA
FlowJo	10.8.0	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FL WinLab	4.00.03	PerkinElmer Germany, Rodgau, D
G*Power	3.1.9.2	Universität Düsseldorf, Düsseldorf, D
GraphPad Prism	9.1.2	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ImageJ	1.53a	National Institutes of Health, USA
MS Office	Pro Plus 2019	Microsoft, Redmond, WA, USA
NIS Elements AR	4.51.00, 5.21.00	Nikon Europe BV, Amstelveen, NL
Thrombinoscope	5.0	Thrombinoscope BV, Maastricht, NL

D: Deutschland, NL: Niederlande, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.3 Verbrauchsgüter

Tabelle 5: Verbrauchsgüter.

Verbrauchsgut	Spezifikation	Hersteller
Deckgläser	24x60mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
	high precision	Azer Scientific, Morgantown, PA, USA
Falcon-Röhrchen	FACS, 5mL	Corning Inc, Corning, NY, USA
	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filterpapier	MN615	Macherey-Nagel, Düren, D
	Whatman	Cytiva, Marlborough, MA, USA
Kanülen	Microlance	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Kapillare	Minicaps, Heparin	Hirschmann, Eberstadt, D
Küvetten	0,45-1mL	Chrono-log, Havertown, PA, USA
	UV/VIS	PerkinElmer Germany, Rodgau, D
Narkosegasfilter	Contrafluran	ZeoSys Medical, Luckenwalde, D
Nitrocellulose	Amersham Protran 0,45µm NC	Cytiva, Marlborough, MA, USA
Objektträger	76x26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, D
OP-Besteck	Schere	Fine Science Tools, Heidelberg, D
	Pinzette, Micro 2000	Medicon eG, Tuttlingen, D
	Pinzette, Dumont	Fine Science Tools, Heidelberg, D
Pipetten	Serologisch, 5-50mL	Corning Inc, Corning, NY, USA
Pipettenspitzen	0,5-1000µL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Probengefäß	Mikro, antikoaguliert	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	0,5-2mL	Eppendorf, Hamburg, D

Skalpell		Feather, Osaka, JP
Spritzen	Injekt-F, 1mL	B. Braun AG, Melsungen, D
	Insulin, Omnican100	B. Braun AG, Melsungen, D
	Plastipak, 1mL	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
	Injekt, 2-20mL	B. Braun AG, Melsungen, D
Zählkammer	C Chip Neubauer improved	Peqlab/ Avantor, Radnor, PA, USA

D: Deutschland, JP: Japan, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.4 Agonisten und Antagonisten

Tabelle 6: Agonisten und Antagonisten.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
2-MeSADP	1624	Tocris Bristol, UK
ABO	SML0904	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
ADP	A2754	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
CRP	CRP-XL	CambCol, Littleport, UK
Fibrinogen	F3879	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
INU-1		Prof. Stegner/ Prof. Nieswandt, Würzburg, D
IP ₃ (caged, PM)	ALX-307-071	Enzo Life Sciences, Lörrach, D
Kollagen, Horm	1130630	Takeda Austria, Linz, AUT
Rhodocytin		Prof. Stegner/ Prof. Nieswandt, Würzburg, D
TBHQ	112976	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
Thapsigargin	T7459	Invitrogen/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Thrombin	10602400001	Roche AG, Mannheim, D

2-MeSADP: 2-Methylthio-ADP, ABO: 6-Amino-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazin, ADP: Adenosindiphosphat, AUT: Österreich, CRP: collagen-related peptide, D: Deutschland, IP₃: Inositol-1,4,5-trisphosphat, TBHQ: 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone, UK: Großbritannien, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.5 Antikörper

Tabelle 7: Antikörper.

Chemikalie	Artikelnummer	Hersteller
GPIIb β (CD42c) FITC	X488	Emfret Analytics, Eibelstadt, D
Integrin α IIb β 3 (CD41/61) PE	D200; JON/A	Emfret Analytics, Eibelstadt, D
P-selectin (CD62P) FITC	D200; WugE9	Emfret Analytics, Eibelstadt, D
Integrin α IIb (CD41) PE	133906	BioLegend, San Diego, CA, USA
Integrin β 3 (CD61) FITC	M031-1	Emfret Analytics, Eibelstadt, D
Integrin α 6 (CD49f) PE	313611	BioLegend, San Diego, CA, USA
Integrin β 1 (CD29) FITC	11-0291-82	Invitrogen/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
GPII α (CD42b) APC	M040-3	Emfret Analytics, Eibelstadt, D
Annexin A7	PA5-51109	Invitrogen/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Aktin	4970	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Phalloidin FITC	A12379	Invitrogen/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
sekundär	926-32213	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA

D: Deutschland, GP: Glykoprotein, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.6 Chemikalien

Table 8: Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung	Carl Roth, Karlsruhe, D
Apyrase	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
ATP-Standard/ Chrono-LUME	Chrono-log, Havertown, PA, USA
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	PanReac AppliChem, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PanReac AppliChem, Darmstadt, D
DiOC ₆	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Fura-2AM	Invitrogen/ Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Glukose	Carl Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, D
Go Taq 2x	Promega, Madison, WI, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kalibrierlösungen pH 4-10	Mettler-Toledo, Gießen, D
Kaliumchlorid-Lösung 3M	Mettler-Toledo, Gießen, D
Gelladepuffer (4x), reduzierend	Carl Roth, Karlsruhe, D
Lysepuffer (10x)	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Milchpulver	PanReac AppliChem, Darmstadt, D
MyTaq HS Red Mix, 2x	Meridian Bioscience, Cincinnati, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Peqlab/ Avantor, Radnor, PA, USA
Paraformaldehyd	Otto Fischar, Saarbrücken, D
Prostaglandin I ₂ (PGI ₂)	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
Pluronic F-127	Biotium, Fremont, CA, USA
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
Random Hexamer-Oligonukleotide	Roche, Basel, CH
Reverse Transkriptase	Roche, Basel, CH
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, D
TBS-Heparin	Ratiopharm, Ulm, D
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, D
TriFast™ Extraktionslösung	Peqlab/ Avantor, Radnor, PA, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D
Tween 20	Sigma-Aldrich/ Merck, Darmstadt, D

ATP: Adenosintriphosphat, CH: Schweiz, D: Deutschland, DiOC₆: 3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, USA: Vereinigte Staaten.

2.2.6.1 Salze

Die folgenden Salze wurden als Feststoffe bei Carl Roth (Karlsruhe, D) oder Sigma Aldrich/ Merck (Darmstadt, D) bestellt: Ammoniumperoxidsulfat (APS), Calciumchlorid (CaCl_2), Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), Eisen(III)chlorid (FeCl_3), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethansulfonsäure (HEPES), Kaliumchlorid (KCl), Mono-Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$), Natriumchlorid (NaCl), Natriumdodecylsulfat (SDS; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$), Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Natriumhydroxid (NaOH), Tris ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), Tris/HCl ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$), Zitronensäure ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).

2.2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 9: Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
	10x	1x
ACD-Puffer		120mM Mono-Natriumcitrat 70mM Zitronensäure 110mM Glukose pH 4,6 (NaOH)
Laufpuffer	250mM Tris 1900mM Glycin 35mM SDS	100mL 10x Laufpuffer ad 1000mL aq.dest.
TBS-Puffer	1500mM NaCl 50mM Tris 150mM Tris/HCl	100mL 10x TBS-Puffer 0,5mL Tween 20 ad 1000mL aq.dest.
Transferpuffer	1500M Glycin 250mM Tris	100mL 10x Transferpuffer 100mL Methanol ad 1000mL aq.dest.
Tyrode-Puffer	1400mM NaCl 120mM NaHCO_3 30mM KCl	10mL 10x Tyrode-Puffer 0,1g BSA 0,1g Glukose ad 100mL aq.dest. pH 7,4 (HEPES)

ACD: Acid-citrate-dextrose, Tris-gepufferte Salzlösung (TBS).

2.3 Methoden

2.3.1 Bestimmung der Blutparameter

Für die Blutentnahme wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und das Blut wurde mit einer heparinisierten Kapillare aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Anschließend wurden 90µL Vollblut in eine EDTA-Monovette überführt und das Blutbild wurde mit einem Hämatologie-Analysesystem erstellt.

2.3.2 Isolation muriner Thrombozyten

Die murinen Thrombozyten wurden aus dem Vollblut der oben genannten Versuchstiere isoliert. Die Mäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und über den retrobulbären Venenplexus entblutet. Dabei wurde das venöse Blut in ein Reaktionsgefäß abgenommen, welches ein geeignetes Antikoagulans enthielt. Dieses Reaktionsgefäß wurde für 5min bei 264g (ohne Bremse) und RT zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die obere Phase und das obere Drittel der unteren Phase für 6min bei 52g (ohne Bremse) und RT zentrifugiert. Die entstandene obere Phase besitzt einen hohen Anteil an Thrombozyten und wird als Thrombozyten-reiches Plasma (platelet rich plasma; PRP) bezeichnet. Im nächsten Schritt wurde das PRP sauber abgenommen und für 5min bei 640g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal gewaschen und abschließend in Tyrode resuspendiert. Die Anzahl an isolierten Thrombozyten wurde mit einem Hämatologie-Analysesystem bestimmt und die für die weiteren Versuche benötigte Konzentration wurde mit Tyrode eingestellt.

2.3.2.1 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Genexpression von *Npc1*, die durch die Abundanz von NPC1-mRNA reflektiert wird, wurde durch RT-PCR analysiert. Die RNA-Extraktion aus den isolierten Thrombozyten erfolgte mittels TriFast nach den Angaben des Herstellers. Nach einem DNase-Verdau wurde die extrahierte Gesamt-RNA durch die Zugabe von einer reversen Transkriptase und Hexamer-Oligonukleotiden einer zufälligen Sequenz in cDNA transkribiert. Um die gewonnene cDNA zu amplifizieren, wurden *Npc1*- oder *Gapdh*-Primer hinzugefügt und MyTaq HS Red Mix nach den Angaben des Herstellers

eingesetzt. Die Sequenz der verwendeten Primer und die Schritte des PCR-Zyklus sind in Tabelle 10 aufgeführt. Abschließend wurden die Banden mit der Software Image J quantifiziert und auf *Gapdh* normalisiert.

Tabelle 10: Primer und PCR-Zyklus.

Primer (5` → 3`)		PCR-Zyklus (40 Zyklen, <i>Npc1</i>)	
<i>Npc1</i> fwd	AGT CCA GAA CCT GGT GCA GA	Initiale Denaturierung	3min bei 95°C
<i>Npc1</i> rev	AGT GAC AAA GGG GAA GCC TC	Denaturierung	15s bei 95°C
<i>Gapdh</i> fwd	ATC AAC GGG AAG CCC ATC ACC	Annealing	15s bei 62°C
<i>Gapdh</i> rev	AAG CAG TTG GTG GTG CAG GAT G	Elongation	30s bei 72°C
		Finale Elongation	5min bei 72°C

2.3.2.2 Herstellung von Proben für Western Blot- oder OMICS-Analysen

Um die Expression von Proteinen und deren Phosphorylierungen zu untersuchen oder ein umfassendes Phosphorylierungs- bzw. Lipidprofil zu erstellen, wurde das murine Vollblut in ACD-Puffer abgenommen. Für die OMICS-Analysen wurden 2000×10^3 Thrombozyten/ μL verwendet und der Tyrode enthielt zusätzlich $300 \mu\text{M}$ NaH_2PO_4 , aber kein BSA. Darüber hinaus wurden die Thrombozyten, deren Phosphoproteom bestimmt wurde, in Anwesenheit von Apyrase isoliert.

Nachweis von Proteinen und Phosphorylierungen: Nach der Isolation wurden die Thrombozyten mit den angegebenen Agonisten über eine bestimmte Zeit inkubiert. Anschließend wurden die Proben lysiert und gevortext. Die Western Blot-Proben wurden für 10min auf Eis inkubiert und danach für 15min bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Phosphoproteom-Proben wurden zunächst in Flüssigstickstoff geworfen und langfristig bei -80°C gelagert.

Nachweis von Lipiden: Die Lipidom-Proben wurden für 5min stimuliert und anschließend für 5min bei 640g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und separat von dem Pellet in Flüssigstickstoff geworfen. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.3.2.3 Western Blot

Die Expression von Proteinen und deren Phosphorylierungen wurden mittels Western Blot analysiert. Nach der Herstellung der Western Blot-Proben wurden diese für 10min bei 95°C mit Laemmli-Puffer inkubiert. Die Proben wurden zusammen mit einem vorgefärbten Marker auf die Gele aufgetragen, um die molekulare Masse bzw. Größe der Zielproteine abzuschätzen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in einem Wet/Tank-Blotsystem für 85min mit 300mA auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach der Elektrophorese wurde die Membran für 1h bei RT mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung blockiert, gewaschen und über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer mit einem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran drei Mal für je 15min bei RT mit TBS/T gewaschen bevor sie für 1h bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Alle verwendeten Antikörper wurden in Tabelle 7 angegeben. Im Anschluss an drei weitere Waschschriffe wurde die Membran für 1h bei RT getrocknet. Der Nachweis der Zielproteine erfolgte an einem Detektionssystem von LI-COR. Die Banden wurden mit der Software Image J quantifiziert und auf Aktin normalisiert.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels.

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid	10 oder 12%	5%
Tris/HCl pH 8,8	375mM	-
Tris/HCl pH 6,8	-	130mM
SDS	0,10%	0,10%
APS	0,08%	0,10%
TEMED	0,01%	0,01%
	ad 20mL aq.dest.	ad 10mL aq.dest.

SDS: Natriumdodecylsulfat, APS: Ammoniumperoxidsulfat, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin.

2.3.2.4 Bestimmung der IP₁- oder Serotonin-Konzentration

Es wurden zwei verschiedene ELISA-Kits verwendet, um die aktivierungsabhängige Freisetzung von IP₁ (72IP1PEA; Cisbio/ PerkinElmer Germany, Rodgau, D) oder Serotonin (GWB-8BC364; Genway, San Diego, CA, USA) muriner Thrombozyten zu messen. Dazu wurden die Thrombozyten isoliert,

mit den angegebenen Agonisten stimuliert und der ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3.3 Analyse der Thrombozytenfunktion in vitro

2.3.3.1 Fluoreszenzspektrometrische Messung der $[Ca^{2+}]_i$

Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) der Thrombozyten wurde mit einem Spektrofluorometer bestimmt. Dazu wurde murines Vollblut in ACD-Puffer abgenommen und die Isolation der Thrombozyten wurde in Anwesenheit von $0,5\mu M$ PGI_2 und $0,02U/mL$ Apyrase durchgeführt. Die isolierten Thrombozyten wurden anschließend mit $5\mu M$ Fura-2 Acetoxymethylester (AM) und $0,2\mu g/mL$ Pluronic F-127 für 30min bei $37^\circ C$ unter Lichtausschluss inkubiert.

Das lipophile Fura-2AM kann die Plasmamembran permeieren und wird intrazellulär durch endogene Esterasen zu polarem Fura-2 gespalten, welches sich in den Zellen anreichert. Die Fluoreszenz von Fura-2 ist Ca^{2+} -abhängig, weil sich die Wellenlänge von dessen Absorptionsmaximum durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen verschiebt (λ_{max} : $363nm \rightarrow 335nm$). Im Spektrofluorometer wurde Fura-2 mit zwei verschiedenen Wellenlängen angeregt ($\lambda_1=340nm$, $\lambda_2=380nm$) und die Intensität der emittierten Strahlung wurde bei $510nm$ detektiert. Aus dem Quotienten der beiden Emissionen ($340nm/380nm$) ließ sich nach einer Kalibrierung die $[Ca^{2+}]_i$ berechnen.¹⁰¹ Für die Kalibrierung wurde am Ende jeder Messung die minimale und maximale Sättigung von Fura-2 ermittelt, indem zunächst alle Ca^{2+} -Ionen durch die Lyse der Thrombozyten mit Triton X-100 freigesetzt wurden und anschließend alle freien Ca^{2+} -Ionen mit einem Überschuss an EGTA gebunden wurden. Die Umrechnung in $[Ca^{2+}]_i$ und die Auswertung der Kurven wurden mit der Software FL WinLab durchgeführt.

Nach der Inkubation mit Fura-2AM wurden die Thrombozyten für 5min bei $640g$ und RT pelletiert, resuspendiert und in eine mit 1% BSA blockierte Küvette überführt. Zur Messung des extrazellulären Ca^{2+} -Einstroms wurde $1mM$ Ca^{2+} hinzugefügt, wohingegen die Mobilisierung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern nach der Zugabe von $500\mu M$ EGTA gemessen wurde.

Für das ANXA7-Projekt wurden die Thrombozyten für 5min mit 120ng/mL Rhodocytin oder 10µg/mL INU-1 aktiviert.

Um im Rahmen des NPC1-Projektes zwischen den verschiedenen intrazellulären Speichern zu differenzieren, wurden die Versuche in Anwesenheit von 500µM EGTA und unterschiedlichen Inhibitoren durchgeführt. Zu Beginn der Messung wurden die Thrombozyten für 5min mit dem SERCA2b-spezifischen TG oder dem SERCA3-spezifischen TBHQ inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten für 5min mit den angegebenen Agonisten stimuliert. Da die SERCA3-abhängige Signalkaskade ADP-sensitiv ist, wurde während der Isolation der Thrombozyten auf eine Zugabe von PGI₂ oder Apyrase verzichtet.

Für das CK2α-Projekt wurde die IP₃-induzierte Mobilisierung von Ca²⁺ aus dem DTS untersucht. Dazu wurden die isolierten Thrombozyten während der Inkubation mit Fura-2AM zusätzlich mit 2,5µM caged IP₃ beladen. Caged IP₃ ist eine chemische Verbindung, bei der durch Photolyse eine Schutzgruppe („cage“) abgespalten und biologisch aktives IP₃ freigesetzt wird. Die Messung wurde in Anwesenheit von 500µM EGTA durchgeführt und der Anstieg der [Ca²⁺]_i wurde durch einen Lichtimpuls von 365nm mit einer Dauer von 1s induziert.

2.3.3.2 Aggregometrie

Die Aggregation und ATP-Freisetzung der isolierten Thrombozyten (200x10³ Thrombozyten/µL) wurden simultan mit einem Lumineszenz-Aggregometer bestimmt. Durch dieses Gerät wird einerseits der Agonisten-induzierte Anstieg der Lichttransmission durch die eingespannte Zellsuspension gemessen. Andererseits wird die Freisetzung von ATP durch die Zugabe eines Luciferin-Luciferase-Reagenzes nachgewiesen, welches unter ATP-Verbrauch Lichtstrahlen emittiert. Die Thrombozyten wurden aus Citratblut isoliert und anschließend mit den angegebenen Agonisten für 10min bei 1000rpm und 37°C aktiviert. Die Messungen wurden mit der Software AggroLink8 ausgewertet.

Ferner wurde im Rahmen des NPC1-Projektes die Aggregation in murinem Vollblut evaluiert. Bei der Vollblut- bzw. Impedanz-Aggregometrie wird die Änderung des elektrischen Widerstandes gemessen. Dieser steigt nach der Zugabe eines Agonisten, da die aggregierenden Thrombozyten an den

Elektroden akkumulieren. Für den Versuch wurde das Citratblut zunächst mit 37°C warmer isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und dann mit den angegebenen Agonisten für 10min bei 1000rpm und 37°C stimuliert. Die Messungen wurden mit der Software AggroLink8 ausgewertet.

2.3.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die Expression verschiedener Glykoproteine oder Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der Thrombozyten zu bestimmen. Dazu wurde das murine Vollblut zunächst mit 20U/mL TBS-Heparin antikoaguliert und mit Tyrode verdünnt. Für die Messung von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und P-Selektin wurde das verdünnte Vollblut zusätzlich für 5min bei 900g und RT zentrifugiert und das Zellpellet wurde in Tyrode (+1mM Ca^{2+}) resuspendiert. Sowohl das verdünnte als auch das gewaschene Vollblut wurden für 15min bei RT und unter Lichtausschluss mit den angegebenen Agonisten und den Fluorophor-gelabelten Antikörpern inkubiert (siehe Tabelle 7). Für die Messung von Phosphatidylserin wurden isolierte Thrombozyten mit PBS (mit Ca^{2+}) verdünnt und für 15min bei RT und unter Lichtausschluss mit den angegebenen Agonisten und einem FITC-konjugierten Annexin V-Antikörper (#31490013; ImmunoTools, Friesoythe, D) inkubiert.

Abschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von PBS (ohne Ca^{2+}) oder einem spezifischen Bindungspuffer für die Annexin V-Messung (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2,5mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH 7,4) abgestoppt und alle Proben wurden innerhalb von 30min an einem FACS Calibur (BD Biosciences) gemessen.

2.3.3.4 Spreading

Um das Spreading der Thrombozyten zu untersuchen, wurden Objektträger mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Fibrinogen über Nacht bei 4°C beschichtet und vor der Messung für 1h bei RT mit 1% BSA blockiert. Die isolierten Thrombozyten (ACD-Puffer; 100x10³ Thrombozyten/ μL) wurden mit den angegebenen Agonisten aktiviert und für 15min oder 45min bei RT auf den beschichteten Objektträgern inkubiert. Die adhärenen Zellen wurden für 10min bei RT mit 4% PFA fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Für die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden die Thrombozyten für 10min mit 0,1% Triton X-100 permeabilisiert. Im Anschluss

wurde F-Aktin für 15min mit einem Alexa Fluor 488 Phalloidin-Antikörper angefärbt, um das thrombozytäre Zytoskelett zu visualisieren. Abschließend wurden die Proben an einem inversen Mikroskop von Nikon (Eclipse Ti2-A) mit einem 100x Öl-Objektiv aufgenommen und mit der Software NIS Elements AR analysiert.

2.3.3.5 In vitro Thrombusbildung

Die Thrombusbildung des murinen Vollbluts wurde in einer Flusskammer bei definierten Scherraten evaluiert. Dazu wurden Objektträger mit 200µg/mL Kollagen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ beschichtet und vor der Messung für 30min bei RT mit 3% BSA blockiert. Das Vollblut wurde in 20U/mL TBS-Heparin abgenommen und für 5min bei RT mit 0,5µg/mL DiOC₆ inkubiert. Der lipophile Fluoreszenzfarbstoff DiOC₆ lagert sich in intrazelluläre Membranen ein und erlaubt so die kontinuierliche Visualisierung der akkumulierenden Thrombozyten während des Aufbaus der Thromben. Nach der Inkubation wurde die Probe mit Tyrode (+2mM Ca²⁺) verdünnt und luftblasenfrei in eine 1mL Spritze aufgezogen. Die Spritze wurde in eine Infusionspumpe eingespannt und das Blut wurde mit Scherraten von 1000s⁻¹ oder 1700s⁻¹ durch die Flusskammer und über den Kollagen-beschichteten Objektträger perfundiert. Nach der Perfusion wurde die Flusskammer mit Tyrode (+2mM Ca²⁺) gespült und die gebildeten Thromben wurden an einem inversen Mikroskop von Nikon (Eclipse Ti2-A) mit einem 20x Objektiv aufgenommen. Zusätzlich wurden DIC-Aufnahmen gemacht, die als repräsentative Bilder dienten. Nach dem Versuchsende wurde die Software NIS Elements AR verwendet, um den Mittelwert der durch Thromben bedeckten Fläche aus fünf verschiedenen Aufnahmen zu kalkulieren.

Im Rahmen des ANXA7-Projektes wurde die Wirkung einer ABO-Behandlung auf die in vitro Thrombusbildung bzw. die Blutungszeit überprüft. Dazu wurden C57BL/6J-Mäuse randomisiert und in zwei Behandlungsgruppen eingeteilt. Den narkotisierten Versuchstieren wurde entweder 50µg/g KG ABO oder Ampuwa in isotonischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubation von 15min wurden die entsprechenden Experimente durchgeführt.

2.3.4 Analyse der Hämostase in vitro

2.3.4.1 Thrombinoskop

Die Menge an Thrombin, die während der Hämostase im Plasma entsteht, wurde mittels Thrombinoskop detektiert. Zur Herstellung des Plasmas wurden die Versuchstiere in 129mM Natriumcitrat entblutet und das antikoagulierte Vollblut wurde für 3min bei 290g (ohne Bremse) und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, für 15s bei 655g (ohne Bremse) und RT zentrifugiert und das PRP wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um PPP zu gewinnen, wurden die unteren Phasen gesammelt und für 5min bei 2700g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Konzentration der Thrombozyten im PRP mit PPP auf 150×10^3 Thrombozyten/ μL eingestellt. Die Messung der Thrombin-Konzentration im PRP erfolgte nach den Angaben des Herstellers und beruht auf der Zugabe eines fluorogenen Substrates der Serinprotease.

2.3.4.2 Analyse der plasmatischen Koagulation

Die Prothrombinzeit (PT) und die partielle Thromboplastinzeit (PTT) wurden mit einem Hämostase-Analysesystem bestimmt. Als Vorbereitung auf die Messung wurde murines Vollblut in Citratpuffer abgenommen und für 5min bei 2700g und RT zentrifugiert. Das gewonnene PPP wurde verwendet, um die PT und die PTT der Versuchstiere mittels verschiedener Reagenzien nach den Angaben des Herstellers zu messen.

2.3.5 In vivo Experimente

2.3.5.1 Knochenmarktransplantation

In Vorbereitung auf die Knochenmarktransplantation wurden vier Wochen alte C57BL/6J-Empfängermäuse mit einer myeloablativen Dosis von 8 Gray bestrahlt (Ganzkörperbestrahlung; Photonenenergie von 6 MV; LINAC SL25 Philips). Die *Anxa7^{+/+}*- und *Anxa7^{-/-}*-Spendermäuse wurden mit Isofluran narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Im nächsten Schritt wurden die Femuren der Spendermäuse ausgebaut und das Knochenmark wurde mit PBS herausgespült. Die Zellsuspension wurde für 5min bei 408g und RT zentrifugiert und das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Die Anzahl an Zellen wurde mit einer Neubauer-

Zählkammer bestimmt und mit PBS auf 10^7 Zellen/mL eingestellt. Nach der Konditionierung wurde den Empfängermäusen entweder das isolierte Knochenmark von *Anxa7^{+/+}*- oder von *Anxa7^{-/-}*-Mäusen transplantiert. Dazu wurden die Empfängermäuse mit Isofluran narkotisiert und ihnen wurde 100µL der vorbereiteten Zellsuspension intravenös injiziert. Während der anschließenden Regenerationsphase („engraftment“) wurden die Chimären mit Antibiotika behandelt (Enrofloxacin; 1mL 2,5%iges Baytril in 100mL Trinkwasser) und in einem Scantainer gehalten. Vier Wochen nach der Knochenmarktransplantation wurde die FeCl₃-induzierte Thrombusbildung in den mesenterialen Arteriolen der *Anxa7^{+/+}*- oder *Anxa7^{-/-}*-Chimären untersucht.

2.3.5.2 Vollnarkose

Alle operativen Verfahren wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Dazu wurde den Versuchstieren eine Narkose aus Medetomidin (0,5µg/g KG), Midazolam (5µg/g KG) und Fentanyl (0,05µg/g KG) intraperitoneal injiziert. Während der in vivo Thrombusbildung wurde die Injektionsnarkose zusätzlich durch die Inhalation eines Isofluran/Sauerstoff-Gemisches unterstützt.

2.3.5.3 In vivo Thrombusbildung (Carotis, Mesenterium)

Um die Bedeutung von ANXA7, NPC1 oder CK2α für die arterielle Thrombose in vivo zu evaluieren, wurden unterschiedliche Arterien der Versuchstiere mit FeCl₃ verletzt. Nach der topischen Applikation durchdringen FeCl₃-Ionen die Gefäßwand und zerstören das Endothelium, was die Bildung eines Thrombus bis hin zur vaskulären Okklusion verursacht (siehe Abbildung 5). Dabei ist der Effekt von FeCl₃ auf die Endothel- und Blutzellen vielschichtig und hängt von verschiedenen Parametern - wie zum Beispiel der Konzentration und der Einwirkzeit von FeCl₃, dem verletzten Gefäßbett oder dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere - ab.¹⁰²

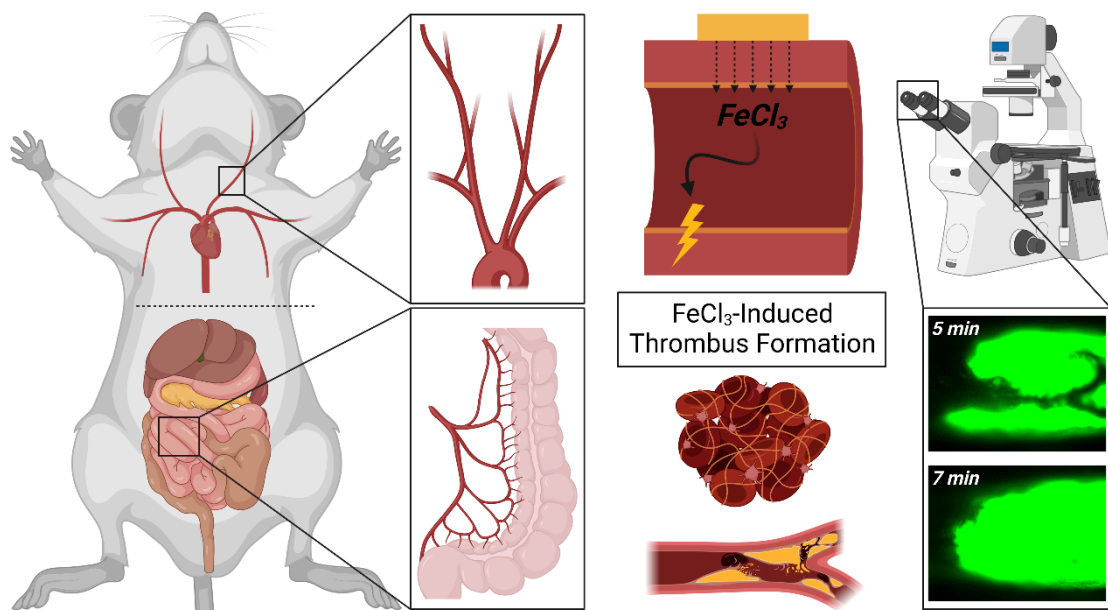


Abbildung 5: Schematische Darstellung der $FeCl_3$ -induzierten Thrombusbildung.

Carotis (Makrozirkulation): Nach dem Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde den Mäusen ein DyLight488-konjugierter Antikörper gegen GPIIb/IIIa (0,1 μ g/g KG) intravenös injiziert, der spezifisch murine Thrombozyten markiert. Anschließend wurden beide Carotiden (Arteria carotis communis) nacheinander unter einem Binokular freigelegt und behandelt. Die Verletzung des Gefäßes wurde induziert, indem ein mit 15% $FeCl_3$ -gesättigtes Filterpapier für 1min auf der Carotis platziert wurde. Der entstehende Thrombus wurde für 20min oder bis eine stabile Okklusion auftrat (kein Blutfluss für >60s) mit einem Intravitalmikroskop aufgenommen. Abschließend wurden die Mäuse unter Vollnarkose durch zervikale Dislokation getötet.

Mesenterium (Mikrozirkulation): Nach der Applikation des GPIIb/IIIa-Antikörpers (siehe oben) wurden die Mesenterialgefäße durch eine mediane Längslaparotomie unter einem Binokular freigelegt. Die Verletzung des Gefäßes wurde induziert, indem ein mit 20% $FeCl_3$ -gesättigtes Filterpapier für 10s auf der ausgewählten mesenterialen Arteriole platziert wurde. Der entstehende Thrombus wurde für mindestens 30min oder bis eine stabile Okklusion auftrat (kein Blutfluss für >30s bei den Chimären bzw. >60s bei den übrigen Versuchstieren) mit einem Intravitalmikroskop aufgenommen. Bei Bedarf wurde

das Prozedere an einer weiteren Arteriole wiederholt. Abschließend wurden die Mäuse unter Vollnarkose durch zervikale Dislokation getötet.

Auswertung: Die Aufnahmen des Intravitalmikroskopes wurden nach dem Versuchsende mit der NIS Elements Software von Nikon analysiert. Die Software wurde zudem verwendet, um die mittlere Fluoreszenzintensität in den verletzten Gefäßen über die Zeit zu messen. Die ausgegebenen Messkurven wurden in MS Office Excel exportiert, wo der Mittelwert aus allen Messkurven einer Versuchsgruppe für jeden einzelnen Zeitpunkt berechnet wurde, um den Aufbau und die Stabilität der Thromben zu visualisieren.

2.3.5.4 Blutungszeit

Um abzuwägen, ob durch die genetische Deletion von *Anxa7*, *Npc1* oder *Csnk2a1* ein erhöhtes Blutungsrisiko auftritt, wurde die Blutungszeit der Versuchstiere gemessen. Nach dem Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde den Mäusen bzw. Chimären mit einem Skalpell 3mm der Schwanzspitze abgetrennt. Anschließend wurde beobachtet, nach welcher Zeitspanne die Hämostase eintritt (kein Blutfluss für >60s). Dazu wurde entweder der Schwanz in 37°C warme Kochsalzlösung getaucht (*Anxa7*) oder die Blutstropfen wurden in einem Abstand von 20s abgetupft bis dies nicht mehr möglich war, ohne die Schwanzspitze zu berühren (*Npc1* oder *Csnk2a1*). Falls mehr als 15min bis zur Hämostase vergingen, wurde der Versuch beendet. Die Mäuse wurden abschließend unter Vollnarkose durch zervikale Dislokation getötet.

2.3.6 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mittels GraphPad Prism 9 statistisch ausgewertet und als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt, wobei n die Anzahl an durchgeführten Experimenten angibt. Die benötigte Gruppengröße wurde a priori mittels G*Power berechnet (mit $\alpha < 0,05$ und $\beta < 0,2$). Zudem wurde die Normalverteilung der Daten überprüft und für Daten, die nicht normal verteilt waren, wurden nicht-parametrische Testverfahren genutzt. Wenn es nicht anders in der Legende vermerkt wurde, wurden die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der verschiedenen Versuchsgruppen mit einem ungepaarten t-Test analysiert. Alle statistischen Tests waren zweiseitig und es wurde ein Signifikanzniveau von 5% gewählt. Signifikante Unterschiede wurden mit * bei $p \leq 0,05$ oder mit ** bei $p \leq 0,01$ gekennzeichnet. Bei einem Signifikanzwert von $p > 0,05$ konnte kein signifikanter Unterschied der Mittelwerte (nicht signifikant; n.s.) nachgewiesen werden.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde GraphPad Prism 9 verwendet. Darüber hinaus wurden die graphischen Abbildungen in dieser Arbeit mit BioRender.com (2022) erstellt.

3 Annexin A7

Neben den in der Einleitung diskutierten Mechanismen wird $[Ca^{2+}]_i$ durch Ca^{2+} -bindende Proteine reguliert, die ihre biochemischen Eigenschaften Ca^{2+} -abhängig verändern. Hierzu zählen auch die Annexine.

3.1 Einleitung

Die Multigenfamilie der Annexine charakterisiert sich durch die Ca^{2+} -abhängige Bindung an Phospholipide und ein konserviertes Strukturelement aus 70 Aminosäuren, dem sogenannten „annexin repeat“. Die gemeinsamen Strukturelemente resultieren zum Teil in ähnlichen biochemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel der Regulation der $[Ca^{2+}]_i$ oder der Organisation von Membranen. Trotz dieser Gemeinsamkeiten unterscheiden sich individuelle Annexine in ihren physiologischen Funktionen.¹⁰³

Ein Annexin, welches entscheidend an den Prozessen der Hämostase beteiligt zu sein scheint, ist Annexin A7 (ANXA7): Mäuse mit einer genetischen Deletion von *Anxa7* versterben noch im embryonalen Stadium an intrakraniellen Blutungen. Ihre heterozygoten Geschwistertiere sind zwar lebensfähig, weisen aber eine reduzierte Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ in pankreatischen β -Zellen auf, was eine beeinträchtigte Sekretion von Insulin verursacht.¹⁰⁴ Durch Veränderung der Gantargeting-Strategie gelang es Herr et al. 2001, *Anxa7^{-/-}*-Mäuse mit vergleichbar mildem Phänotyp zu generieren.⁹⁷ Diese globale Knockout-Linie diente in den Folgejahren dazu, die Funktion von ANXA7 in verschiedenen Zelltypen zu adressieren, darunter Kardiomyozyten,⁹⁷ Erythrozyten^{105, 106} und Astrozyten¹⁰⁷. Auch Thrombozyten exprimieren ANXA7 und *Anxa7*-defiziente Thrombozyten zeigten eine leicht verzögerte Aggregation nach der Stimulation mit Ristocetin.¹⁰⁵

Neben Tiermodellen werden vor allem spezifische Inhibitoren eingesetzt, um die Bedeutung bestimmter Proteine auf zelluläre Prozesse zu untersuchen. Jiao et al. synthetisierten 2006 ein kleines Molekül namens ABO (6-Amino-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazin), welches die Funktion von ANXA7 moduliert, indem es dessen Proteinlevel, dessen intrazelluläre Verteilung und die Phosphorylierung von ANXA7 beeinflusst.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Unter Einsatz von ABO gelang

es der Arbeitsgruppe um Prof. Miao zudem, den Einfluss von ANXA7 auf die Apoptose und die Autophagie vaskulärer Endothelzellen (VECs) nachzuweisen. Beide Prozesse führen zum programmierten Tod von VECs und sind an der Entstehung und Entwicklung atherosklerotischer Plaques beteiligt. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wiesen Apolipoprotein E-defiziente (*ApoE*^{-/-}) Mäuse, die bei einer fettreichen Ernährung zu Atherosklerose neigen, nach der Behandlung mit ABO einen deutlich milderen Phänotyp auf. Dieser spiegelte sich unter anderem in der reduzierten Fläche und der erhöhten Stabilität der atherosklerotischen Plaques wider, die sich in den Aorten der ABO-behandelten *ApoE*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren bildeten.¹¹¹

Obwohl ANXA7 in anderen Zelltypen Prozesse reguliert, die auch für die Funktion von Thrombozyten entscheidend sind, und bekannt ist, dass Thrombozyten ANXA7 exprimieren, wurde dessen Beitrag an der arteriellen Thrombose bisher kaum untersucht. Dabei hätte eine antithrombotische Wirkung einer ANXA7-Inhibition in Verbindung mit der bekannten antiatherosklerotischen Wirkung entscheidende Vorteile für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Um die Rolle von ANXA7 in der Ca²⁺-Homöostase und dem Lipidmetabolismus von Thrombozyten zu erforschen, wurden in unserer Arbeitsgruppe zunächst Thrombozyten von *Anxa7*-defizienten Mäusen und ABO-behandelte humane Thrombozyten funktionell charakterisiert. *Anxa7*-defiziente oder ABO-behandelte Thrombozyten zeigten nicht nur eine beeinträchtigte Sekretion und Aggregation nach der Stimulation mit CRP, sondern auch eine verminderte Thrombusbildung auf Kollagen *in vitro*. Diese CRP-abhängigen Funktionsdefekte gingen mit einer gestörten Erhöhung der [Ca²⁺]_i einher, die sich auf eine abgeschwächte Aktivität der PLC γ 2 zurückführen ließ. Mittels einer quantitativen Analyse des thrombozytären Lipidoms gelang es, eine ANXA7-abhängige Regulation des Metabolismus von Oxylipinen zu detektieren: *Anxa7*-defiziente Thrombozyten wiesen unter anderem eine reduzierte Menge an prothrombotischem Thromboxan (TxA₂) und 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid (12-HETE) auf, wobei die exogene Zugabe von Letzterem den Phänotyp der *Anxa7*^{-/-}-Thrombozyten vollständig umkehrte.⁹¹ Eine graphische Zusammenfassung des beobachteten Mechanismus ist in Abbildung 6 dargestellt.

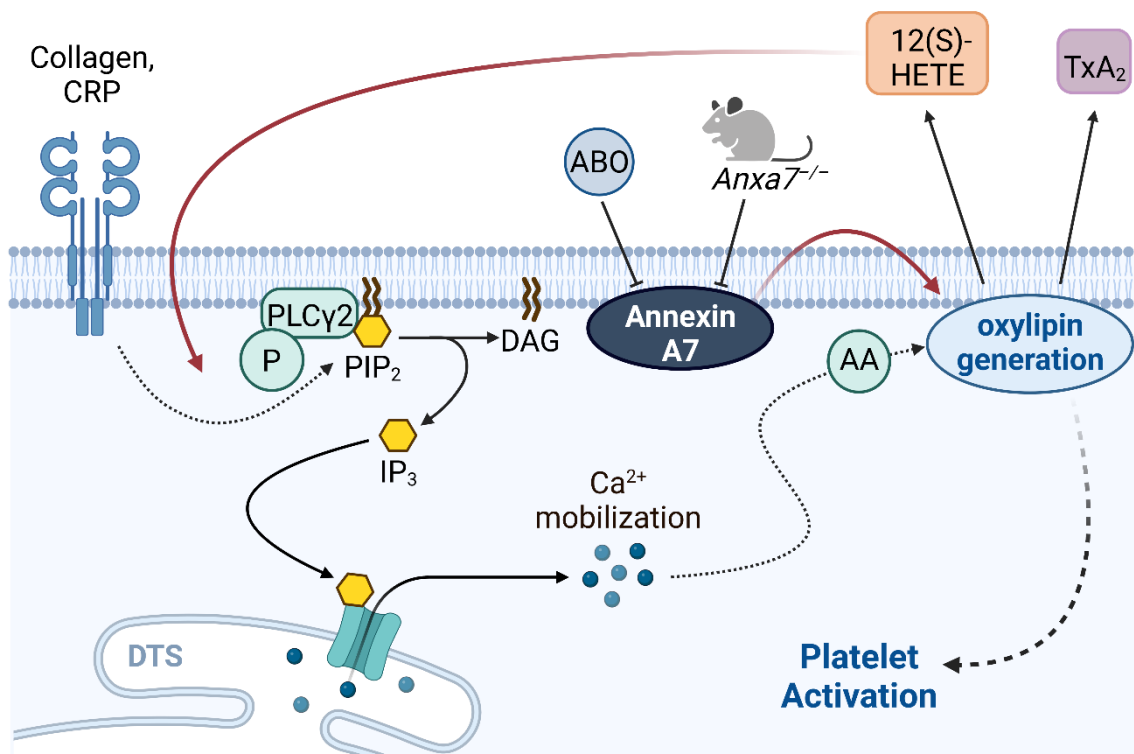


Abbildung 6: Graphische Darstellung der ANXA7-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten.⁹¹
 12(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid (12(S)-HETE), Arachidonsäure (AA), 6-Amino-2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazin (ABO), collagen-related peptide (CRP), 1,2-Diacylglycerin (DAG), dense tubular system (DTS), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Phospholipase C (PLC), Thromboxan A₂ (TxA₂).

Aufgrund der oben beschriebenen kritischen Bedeutung von ANXA7 für die GPVI-vermittelte Aktivierung von Thrombozyten repräsentiert ANXA7 ein vielversprechendes Ziel für künftige Antithrombotika. Gleichzeitig ist für die Entwicklung neuer Medikamente neben einem soliden Verständnis über den zugrunde liegenden Mechanismus auch die Relevanz der Ergebnisse in vivo und die Evaluierung möglicher Nebenwirkungen von besonderem Interesse. Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit den entsprechenden Untersuchungen.

3.2 Ergebnisse

ANXA7 ist entscheidend an der GPVI-vermittelten Aktivierung von Thrombozyten beteiligt.⁹¹ Ein weiterer Immunrezeptor, über den Thrombozyten aktiviert werden und dessen Signalkaskade der von GPVI ähnelt, ist CLEC-2 (1.3.2 C-Typ Lektin-ähnlicher Rezeptor 2). Um zu untersuchen, ob die Signalkaskade downstream von CLEC-2 ebenfalls durch thrombozytäres ANXA7 reguliert wird, wurde ein Teil der funktionellen Messungen in *Anxa7^{-/-}*- und *Anxa7^{+/+}*-Thrombozyten mit den

CLEC-2-spezifischen Agonisten Rhodocytin (RC) und INU-1 wiederholt.^{34, 36} Es wurde beobachtet, dass der extrazelluläre Ca^{2+} -Einstrom in *Anxa7*^{-/-}-Thrombozyten nach der Stimulation mit RC (120ng/mL; Abbildung 7A) oder mit INU-1 (10µg/mL; Abbildung 7B) im Vergleich zu den *Anxa7*^{+/+}-Thrombozyten reduziert ist. Die gestörte Ca^{2+} -Antwort wurde von einer schwächeren Aggregation und ATP-Freisetzung (reflektiert die Sekretion von δ -Granula) der *Anxa7*-defizienten Thrombozyten als Antwort auf CLEC-2-Agonisten begleitet (RC: 240ng/mL, Abbildung 7C; INU-1: 2µg/mL, Abbildung 7D).

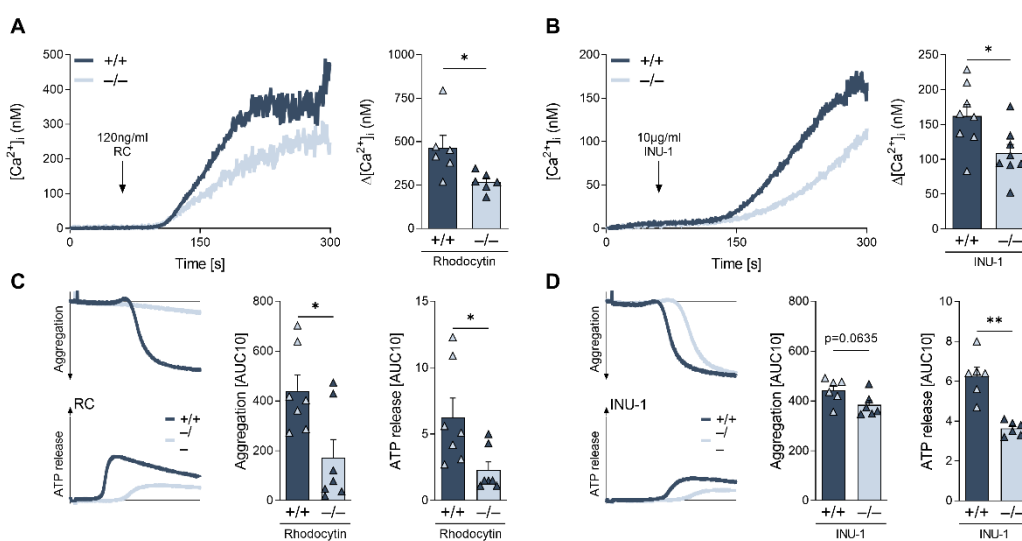


Abbildung 7: Die genetische Deletion von *Anxa7* resultiert in einer reduzierten Ca^{2+} -Mobilisierung und Aktivierung von Thrombozyten nach der Stimulation mit CLEC-2-Agonisten.

A+B. Repräsentative Messung (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von *Anxa7*^{+/+} (dunkelblau) und *Anxa7*^{-/-} (hellblau) Thrombozyten vor und nach der Stimulation mit Rhodocytin (120ng/mL; n=6, Mann-Whitney Test, p=0.0152; A) oder INU-1 (10µg/mL; n=8, p=0.0213; B) in Anwesenheit von 1mM extrazellulärem Ca^{2+} . C+D. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; Fläche unter der Kurve) der Aggregation oder ATP-Freisetzung in Thrombozyten von *Anxa7*^{+/+} (dunkelblau) und *Anxa7*^{-/-} (hellblau) Mäusen als Antwort auf Rhodocytin (240ng/mL; n=7, Mann-Whitney Test, p=0.0170 und p=0.0163; C) oder INU-1 (2µg/mL; n=6, p=0.0635 und p=0.0002; D).

Im nächsten Schritt sollte die Bedeutung und Übertragbarkeit der ANXA7-abhängigen Effekte auf die Funktion von Thrombozyten in vivo beurteilt werden. Dabei ist für die arterielle Thrombose in vivo nicht nur die Interaktion der verschiedenen Blutzellen, sondern auch die Wechselwirkung zwischen Blut- und Endothelzellen relevant. Bei den hier verwendeten *Anxa7*^{-/-}-Mäusen handelt es sich um globale Knockouts, die weder thrombozytäres noch endotheliales ANXA7 exprimieren. Um eine Beteiligung des Fehlens von endothelialem ANXA7 an dem beobachteten Phänotyp auszuschließen, wurde eine

Knochenmarktransplantation durchgeführt: Junge C57BL/6J-Mäuse wurden mit 8 Gray bestrahlt bevor ihnen Knochenmark von *Anxa7^{-/-}*- oder *Anxa7^{+/-}*- Spendertieren injiziert wurde. Nach einer Phase der Regeneration („engraftment“) wurden die *Anxa7*-Chimären in einem Modell der arteriellen Thrombose untersucht. Es zeigte sich, dass 75% der *Anxa7^{-/-}*-Chimären in dem gewählten Zeitraum vor einer FeCl₃-induzierten Okklusion der mesenterialen Arteriolen geschützt waren, wohingegen die Gefäße der *Anxa7^{+/-}*-Chimären im Mittelwert nach 20 Minuten einen Verschluss aufwiesen (Abbildung 8A). Im Einklang mit dieser Beobachtung war die integrierte Fluoreszenzintensität (FI) in den Arteriolen der *Anxa7*-defizienten Chimären in den ersten 20 Minuten deutlich schwächer im Vergleich zur FI in den Kontrolltieren (Abbildung 8B).

Eine gestörte Aktivierung von Thrombozyten kann die Blutstillung beeinflussen und das Blutungsrisiko erhöhen. Zunächst wurde die primäre Hämostase der *Anxa7^{-/-}*-Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Geschwistertieren überprüft. Es wurde weder eine verlängerte Blutungszeit noch ein erhöhter Verlust an Erythrozyten nach der Amputation der Schwanzspitze beobachtet (Abbildung 8C). Gleichzeitig spielt die Oberfläche von Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Regulation der Thrombinbildung und damit der plasmatischen Gerinnung. Diese wurde mittels Thrombinoskop und Fibrometer (bzw. Start4 Coagulation Analyzer) analysiert. Dabei wurde - unabhängig von der Stimulation mit CRP - kein Unterschied zwischen der Thrombinbildung in Thrombozyten-reichem Plasma (platelet-rich plasma (PRP)) von *Anxa7^{-/-}*- und *Anxa7^{+/-}*-Mäusen festgestellt (Abbildung 8D). In Übereinstimmung mit der vergleichbaren Bildung von Thrombin, die als gemeinsamer Endpunkt der Gerinnungskaskaden gilt, waren weder die Prothrombinzeit (PT; extrinsisch) noch die partielle Thromboplastinzeit (PTT; intrinsisch) signifikant unterschiedlich (Abbildung 8E).

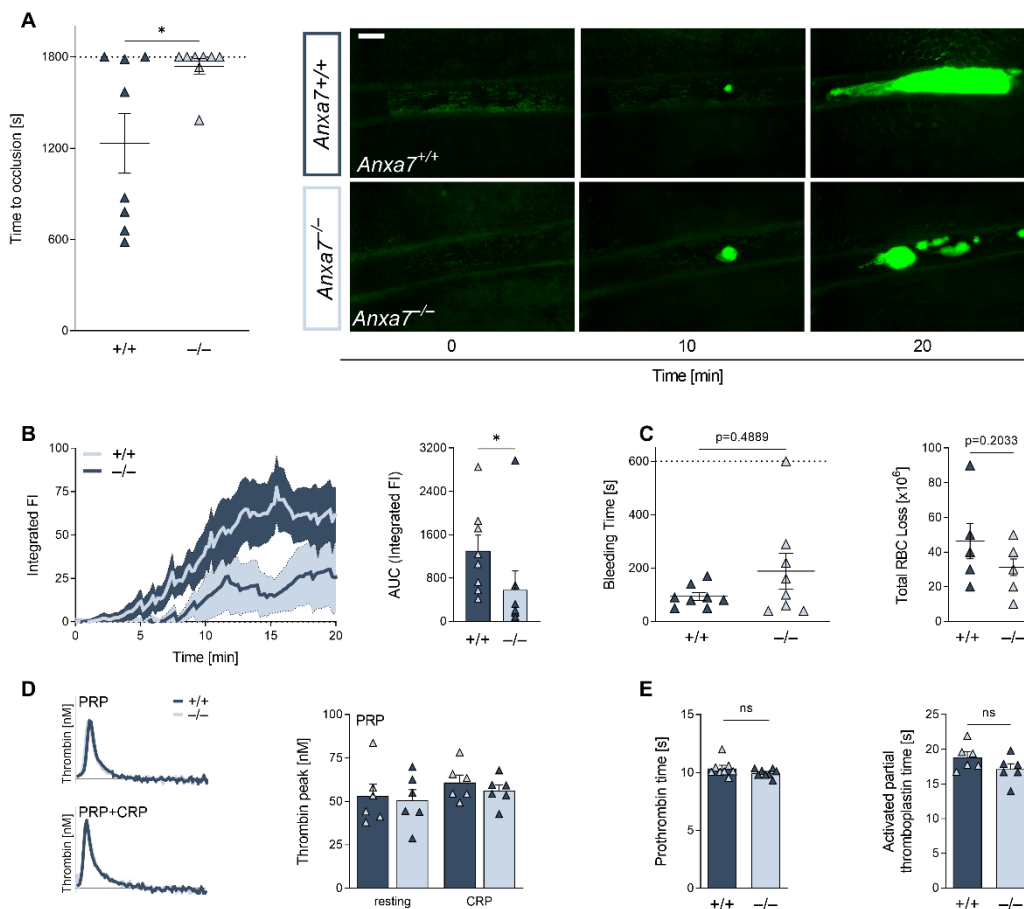


Abbildung 8: Die Anxa7-Defizienz verursacht eine gestörte in vivo Thrombusbildung, wohingegen die Hämostase nicht signifikant beeinträchtigt ist.

A. Repräsentative Abbildung (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links; Okklusionszeit) nach einer FeCl₃-induzierten Verletzung der mesenterialen Arteriolen von Anxa7^{+/+} (dunkelblau) und Anxa7^{-/-} (hellblau) Chimären (n=8, p=0.0249). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. B. Integrierte Fluoreszenzintensität der sich bildenden Thromben über die Zeit (links) und deren arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; Fläche unter der Kurve) zur Veranschaulichung der Thrombusstabilität (n=8, Mann-Whitney Test, p=0.0207). C. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Blutungszeit (links) und des Blutverlustes (rechts) nach der Amputation der Schwanzspitze von Anxa7^{+/+} (dunkelblau) und Anxa7^{-/-} (hellblau) Mäusen (n=8; Mann-Whitney Test, p=0.4889 [Blutungszeit]; p=0.2033, [Blutverlust]). D. Repräsentative Messung (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; Maximum) der Thrombinbildung in Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) von Anxa7^{+/+} (dunkelblau) und Anxa7^{-/-} (hellblau) Mäusen ohne oder mit Stimulation durch 5 μ g/mL CRP (n=6, p=0.8024 und p=0.4078). E. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Prothrombinzeit (links) oder der partiellen Thromboplastinzeit (rechts) in Anxa7^{+/+} (dunkelblau) und Anxa7^{-/-} (hellblau) Vollblut (n=8, Mann-Whitney Test, p=0.3130 [Prothrombinzeit]; n=6, p=0.1488 [partielle Thromboplastinzeit]).

Die Behandlung humaner Thrombozyten mit dem ANXA7-Inhibitor ABO führt zu einem deutlichen Funktionsdefekt, der sich letztlich in einer verminderten in vitro Thrombusbildung in ABO-behandeltem Vollblut widerspiegelt.⁹¹ Um zu kontrollieren, dass dieser Effekt auf eine spezifische Wirkung von ABO auf ANXA7 zurückzuführen ist, wurde das Vollblut von Anxa7^{-/-}- und Anxa7^{+/-}-Mäusen mit ABO oder Ampuwa inkubiert und über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche perfundiert. Den Erwartungen entsprechend ließ sich sowohl die

geringere Adhäsion von unbehandeltem *Anxa7^{-/-}* als auch die von ABO-behandeltem *Anxa7^{+/+}*-Vollblut an Kollagen im Vergleich zu unbehandeltem *Anxa7^{+/+}*-Vollblut reproduzieren. Die ABO-Behandlung von *Anxa7^{-/-}*-Vollblut verursachte keine zusätzliche Beeinträchtigung der in vitro Thrombusbildung. Ein additiver Effekt von ABO auf *Anxa7*-defizientes Blut blieb demnach aus (Abbildung 9A).

Abschließend wurde die Wirkung einer ABO-Applikation im lebenden Organismus erforscht. Dazu wurde entweder eine Dosis von 50mg/kg KG ABO oder Ampuwa als Kontrolle intraperitoneal injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden verschiedene Methoden angewendet, um das thrombotische und hämostatische Potential zu beurteilen: Ein Teil der Mäuse wurde entblutet und das Vollblut wurde in einer Kollagen-beschichteten Flusskammer untersucht. Es zeigte sich, dass die Blutzellen der ABO-behandelten Mäuse in geringerem Maße an Kollagen adhären (Abbildung 9B). Den restlichen behandelten Mäusen wurde das Ende der Schwanzspitze amputiert, um das Blutungsrisiko einer in vivo Applikation von ABO zu evaluieren. Dabei wurde beobachtet, dass ABO-behandelte Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren weder über einen längeren Zeitraum bluten noch mehr Blut (gemessen als Verlust an Erythrozyten) verlieren (Abbildung 9C).

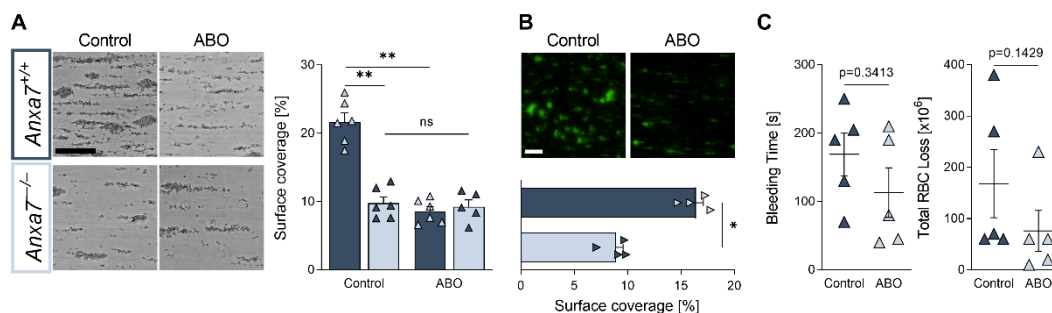


Abbildung 9: ABO inhibiert ANXA7 spezifisch in murinem Vollblut und die Applikation von ABO in vivo wirkt antithrombotisch, ohne das Blutungsrisiko zu steigern.

A. Repräsentative Aufnahmen im Phasenkontrast (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) der Thrombusfläche in der Flusskammer nach der Perfusion von Vollblut über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche bei einer Scherrate von 1700s^{-1} . Das Vollblut stammte entweder von *Anxa7^{+/+}* (dunkelblau) oder *Anxa7^{-/-}* (hellblau) Mäusen und wurde mit $100\mu\text{M}$ ABO oder Ampuwa als Lösungsmittel-Kontrolle behandelt ($n=6$, zweiseitige ANOVA mit Tukey Test, $p<0.0001$ und $p<0.0001$ und $p=0.9840$). Der Maßstabsbalken entspricht $50\mu\text{m}$. B+C. C57BL/6J-Mäusen wurde eine Dosis von 50mg/kg KG ABO oder Ampuwa in Salzlösung intraperitoneal injiziert. B. Nach einer Inkubationszeit von 15min wurde das Vollblut über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche bei einer Scherrate von 1700s^{-1} perfundiert. Repräsentative Aufnahmen im Phasenkontrast (oben) und arithmetisches Mittel \pm SEM (unten) der Thrombusfläche in der Flusskammer

($n=4$, Mann-Whitney Test, $p=0.0286$). Der Maßstabsbalken entspricht $50\mu\text{m}$. C. Nach einer Inkubationszeit von 15min wurde die Schwanzspitze von Ampuwa- (dunkelblau) und ABO-behandelten (hellblau) Mäusen amputiert. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Blutungszeit (links; $n=5$, Mann-Whitney Test, $p=0.3413$) und des Blutverlustes (rechts; $n=5$, Mann-Whitney Test, $p=0.1429$ [Blutverlust]).

Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ANXA7 in Thrombozyten nicht nur in der Signalgebung downstream von GPVI, sondern auch in der von CLEC-2 – und damit in ITAM- und hemITAM-regulierten Signalwegen – eine entscheidende Rolle spielt. Zudem scheint ANXA7 auch in vivo relevant an thrombotischen Prozessen beteiligt zu sein, während kein Einfluss auf die Hämostase festgestellt wurde. Dies konnte sowohl durch die genetische Deletion von *Anxa7* im Mausmodell als auch pharmakologisch durch den Einsatz des spezifischen ANXA7-Inhibitors ABO bestätigt werden.

3.3 Diskussion

Die Eigenschaft von ANXA7 Ca^{2+} -abhängig an Phospholipide zu binden und die beschriebenen Funktionen von ANXA7 in anderen Zelltypen legen nahe, dass ANXA7 an der Schnittstelle zwischen Ca^{2+} -Signalgebung und dem Metabolismus von Lipiden agiert. Dass dies auch in Thrombozyten gilt – wo ANXA7 die Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ reguliert, indem es die Bildung von Oxylipinen, insbesondere 12-HETE, beeinflusst – konnte unsere Arbeitsgruppe in einer kürzlich erschienenen Publikation bekräftigen.⁹¹

In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in *Anxa7*-defizienten Thrombozyten neben der GPVI- auch die CLEC-2-vermittelte Aktivierung beeinträchtigt ist. Dabei wiesen sowohl die Ca^{2+} - als auch die Aggregations- und ATP-Kurven eine verzögerte Reaktion auf, die für geringe Konzentrationen von CLEC-2-Agonisten charakteristisch ist.³⁴ Die Signalkaskaden des GPVI- und des CLEC-2-Rezeptors weichen in den ersten Schritten zwar voneinander ab, resultieren jedoch beide in der Phosphorylierung von Syk, die über weitere Effektoren die PLC γ 2 aktiviert. Dies lässt vermuten, dass die ANXA7-abhängige Regulation von 12-HETE keine direkte Wirkung auf den GPVI-Rezeptor hat, sondern dessen Signalkaskade beeinflusst.

Um weitere Hinweise für die klinische Relevanz der eingeschränkten Funktionsfähigkeit von *Anxa7*-defizienten Thrombozyten zu sammeln, wurden die arterielle Thrombose und die sekundäre Hämostase in vivo untersucht. Nach

einer FeCl₃-induzierten Verletzung der Gefäßwand trat die Okklusion der Arteriolen von *Anxa7*^{-/-}-Chimären deutlich später ein. Auch die mesenterialen Arteriolen von GPVI-defizienten Mäusen und die von Mäusen, die mit dem spezifischen 12-LOX-Inhibitor ML355 behandelt wurden, verschließen sich nach der topischen Applikation von FeCl₃ nicht oder verzögert.^{112, 113} Der thromboprotektive Effekt, der durch den Verlust von GPVI, 12-LOX oder ANXA7 verursacht wird, unterstreicht deren Bedeutung für die arterielle Thrombose in vivo. Gleichzeitig konnte weder bei der Blutungszeit noch bei den in vitro gemessenen Koagulationsparametern ein statistischer Unterschied zwischen *Anxa7*^{-/-}- und *Anxa7*^{+/+}-Mäusen nachgewiesen werden. Auch die systemische Behandlung von C57BL/6J-Mäusen mit dem ANXA7-Inhibitor ABO resultierte in keiner nachweislich erhöhten Blutungstendenz. Diese Befunde decken sich ebenfalls mit dem Phänotyp der GPVI-defizienten und ML355-behandelten Mäuse.^{113, 114}

Mit ABO existiert ein ANXA7-Inhibitor, der theoretisch als Basis für die Entwicklung neuer Antithrombotika einsetzbar ist. Die Spezifität und die angemessene Dosis von ABO in Thrombozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels Flusskammer validiert. Nach der Inkubation von murinem Vollblut mit 100µM ABO bedeckten deutlich weniger Thromben die Kollagen-beschichteten Oberflächen. Da die Thrombusfläche in ABO-behandeltem *Anxa7*^{-/-}-Vollblut nicht weiter abnahm, ist von einer ANXA7-spezifischen Wirkung auszugehen, auch wenn Off-Target-Effekte durch diesen Ansatz nicht vollkommen ausgeschlossen werden können. Angesichts der kurzen Inkubationszeit und der Abwesenheit eines Zellkerns reguliert ABO in Thrombozyten vermutlich hauptsächlich die Phosphorylierung von ANXA7. Dass eine Dosis von 100µM ABO sowohl in murinem als auch in humanem Vollblut einen antithrombotischen Effekt zeigt, lässt auf ähnliche ANXA7-abhängige Mechanismen innerhalb der beiden Spezies schließen und auf eine Übertragbarkeit der in vivo Ergebnisse hoffen. Neben der externen Zugabe verringerte auch die systemische Applikation von ABO bei Mäusen die Kollagen-abhängige Thrombusbildung unter hohen Scherraten. Gleichzeitig wirkte die langfristige Behandlung von *ApoE*^{-/-}-Mäusen mit der gleichen Dosis (50mg/kg KG ABO) antiatherosklerotisch.¹¹¹ Eine

Eigenschaft, die darauf zurückgeführt wurde, dass ABO die Apoptose von VECs inhibiert und die Autophagie dieser Zellen fördert und sie dadurch schützt.^{109, 115} Die Kombination aus antiatherosklerotischem und antithrombotischem Effekt ist gerade im Hinblick auf die Kausalität der zugrunde liegenden Pathomechanismen vielversprechend und könnte für ein breites Spektrum an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen vorteilhaft sein. Dadurch bietet ABO – unter der Voraussetzung, dass klinische Studien diese Wirkungen für den Menschen bestätigen – nicht nur eine Therapie arterieller Thrombosen, sondern kann auch präventiv gegen deren Ursache eingesetzt werden.

4 Niemann-Pick C1 Protein

Ein weiteres Molekül, welches an der Schnittstelle zwischen Ca^{2+} -Signalgebung und Lipidtransport bzw. -metabolismus agiert, ist das Membranprotein Niemann-Pick C1 Protein (NPC1).

4.1 Einleitung

Die beiden Gene *Npc1* und *Npc2* kodieren für lysosomale Proteine, welche Cholesterin binden und gemeinsam dessen Transport aus dem Lysosom vermitteln.^{116, 117} Strukturell zeichnet sich NPC1 durch 13 transmembrane Helices und drei große luminalen Loops (schleifenförmige Strukturen) aus, von denen eine die N-terminale Domäne ist.¹¹⁸ Kürzlich veröffentlichte Studien legen nahe, dass Cholesterin zuerst von dem löslichen NPC2 gebunden wird, rückwärts an die N-terminale Domäne von NPC1 übertragen wird und so in einen internen Tunnel gelangt, durch den es über die lysosomale Membran befördert wird.^{116, 119}

Bei einem Funktionsverlust von NPC1 oder NPC2 akkumulieren Cholesterin und andere Lipide im endosomalen/lysosomalen Kompartiment. Klinisch äußert sich der gestörte Lipidmetabolismus durch progressive neuroviszerale Symptome und wird als Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NPC; bzw. Morbus Niemann-Pick Typ C) bezeichnet. Dabei wird die Erkrankung als lysosomale Speicherkrankheit klassifiziert und in 95% der Fälle durch autosomal-rezessive Mutationen im *Npc1*-Gen verursacht.¹²⁰ Patienten mit NPC weisen neben einer verkürzten Lebenserwartung und weiteren schwerwiegenden Komplikationen auch eine moderate Thrombozytopenie auf.¹²¹⁻¹²³ Funktionelle Untersuchungen zeigten zudem eine beeinträchtigte Aggregation und Sekretion der Thrombozyten von NPC-Patienten.^{121, 122}

Interessanterweise gelang es Llyod-Evans et al. 2008, einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Lipiden, insbesondere Sphingosin, und der gestörten Ca^{2+} -Homöostase in den Lysosomen von *Npc1*-defizienten RAW-Makrophagen herzustellen.¹²⁴ Aufgrund der zentralen Bedeutung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die Aktivierung von Thrombozyten (siehe 1.4 Ca^{2+} -Signalgebung in Thrombozyten) könnte dieser molekulare Mechanismus auch für den NPC1-abhängigen Funktionsdefekt dieser Zellen verantwortlich sein. Der zweite Teil

dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Überprüfung dieser Hypothese und soll darüber hinaus den potentiellen Einfluss von thrombozytärem NPC1 auf arterielle Thrombosen untersuchen.

4.2 Ergebnisse

NPC1 ist ein intrazellulärer Cholesterin-Transporter, der in der lysosomalen Membran sitzt und dessen Funktionsverlust zur Niemann-Pick-Krankheit Typ C (NPC) führt. Obwohl verschiedene Studien zeigten, dass die Aggregation der Thrombozyten von NPC-Patienten nur eingeschränkt funktioniert,^{121, 122} sind die Ursachen dafür weitestgehend unbekannt.

Ähnlich der klinischen Heterogenität von NPC-Patienten weisen *Npc1*-defiziente Mäuse in Abhängigkeit von der genetischen Modifikation und ihrem genetischen Hintergrund unterschiedliche Schweregrade der Erkrankung auf.¹²⁵ Um die Rolle von thrombozytärem NPC1 isoliert beobachten zu können und zu verhindern, dass systemische Symptome mit unseren Untersuchungen interferieren, wurden Megakaryozyten (MK)-/ Thrombozyten-spezifische Knockouts generiert. Dazu wurden *Npc1^{lox/lox}*-Mäuse mit Mäusen gekreuzt, die eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Plättchenfaktor 4 (Pf4)-Promotors exprimieren (2.1 Versuchstiere).^{98, 100}

Mittels RT-PCR wurde zunächst die erfolgreiche Deletion des *Npc1*-Gens in *Npc1^{lox/lox}Pf4-Cre⁺* (*Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*)-Thrombozyten verifiziert: In isolierten Thrombozyten von *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäusen war im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren (*Npc1^{lox/lox}Pf4-Cre⁻* (*Npc1^{lox/lox}*)) keine NPC1-mRNA detektierbar (Abbildung 10A). Gleichzeitig wurden keine phänotypischen Auffälligkeiten beobachtet und es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Blutwerte oder das Expressionsmuster thrombozytärer Rezeptoren festgestellt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Blutwerte und Expressionsmuster thrombozytärer Rezeptoren in *Npc1^{lox/lox}*- und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäusen.

Blutwerte	<i>Npc1^{lox/lox}</i>	<i>Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}</i>	p value
Platelets (x10 ³ /μl)	1004.71 ± 63.92	1007.71 ± 70.88	0.9757
MPV (fl)	6.13 ± 0.03	6.19 ± 0.05	0.3584
PDW (fl)	6.95 ± 0.06	7.10 ± 0.08	0.1543

P-LCR (%)	3.56 ± 0.16	3.73 ± 0.24	0.5681
RBC (x10 ⁶ /μl)	9.54 ± 0.11	9.52 ± 0.15	0.9366
HGB (g/dl)	14.56 ± 0.18	14.40 ± 0.20	0.5775
HCT (%)	50.79 ± 0.58	50.70 ± 0.71	0.9319
MCV (fl)	53.27 ± 0.09	53.27 ± 0.15	0.9786

Thrombozytäre Rezeptoren

GPIbα	175.00 ± 7.26	164.21 ± 14.24	0.5248
GPV	189.75 ± 6.77	195.25 ± 1.89	0.4639
GPVI	129.00 ± 10.80	121.50 ± 3.84	0.5372
GPIX	794.75 ± 25.19	811.50 ± 9.35	0.5560
Integrin α2	102.03 ± 1.66	104.75 ± 1.25	0.2382
Integrin αIIb	1363.75 ± 107.95	1267.00 ± 88.27	0.5137
Integrin β1	273.75 ± 7.74	293.00 ± 15.02	0.2979
Integrin β3	418.75 ± 42.16	408.25 ± 28.44	0.8432

MPV: mean platelet volume, PDW: platelet distribution width, P-LCR: platelet large cell ratio, RBC: red blood cells, HGB: haemoglobin, HCT: haematocrit, MCV: mean cell volume, GP: Glykoprotein.

Um die funktionelle Relevanz von NPC1 in Thrombozyten zu eruieren, wurden unterschiedliche Aktivierungsmarker im Durchflusszytometer untersucht. Die *Npc1*-defizienten Thrombozyten zeigten nach der Stimulation mit geringen Konzentrationen von Thrombin oder CRP eine verminderte Aktivierung des Integrins αIIbβ3 (Abbildung 10B), die mit einem gestörten Spreading auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen einherging (Abbildung 10C+D). Des Weiteren war die Agonisten-induzierte Sekretion der α-Granula (reflektiert durch die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche) durch die genetische Deletion von *Npc1* beeinträchtigt (Abbildung 10E). Mittels Luciferase-Assay konnte darüber hinaus ermittelt werden, dass *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten im Vergleich zu den Wildtypen weniger ATP (und damit δ-Granula) ausschütten (Abbildung 10F). Im Einklang mit den Befunden bei NPC-Patienten war im Vollblut der *Npc1*-defizienten Mäuse ein Aggregationsdefekt auf niedrige Kollagen-Konzentrationen zu beobachten, der – analog zur Sekretion – nicht bei höheren Konzentrationen auftrat (Abbildung 10G). Abschließend wurde die *in vitro* Thrombusbildung auf Kollagen-beschichteten Oberflächen kontrolliert. Bei hohen arteriellen Scherraten war die Anzahl der adhärenierten Thrombozyten deutlich geringer, wenn *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Vollblut durch die Flusskammer perfundiert wurde. Interessanterweise ließ sich dieser Effekt durch ADP kompensieren: Nach der externen Zugabe von 2,5μM ADP waren keine signifikanten Unterschiede

mehr zu der in vitro Thrombusbildung von *Npc1^{lox/lox}*-Vollblut zu erkennen (Abbildung 10H).

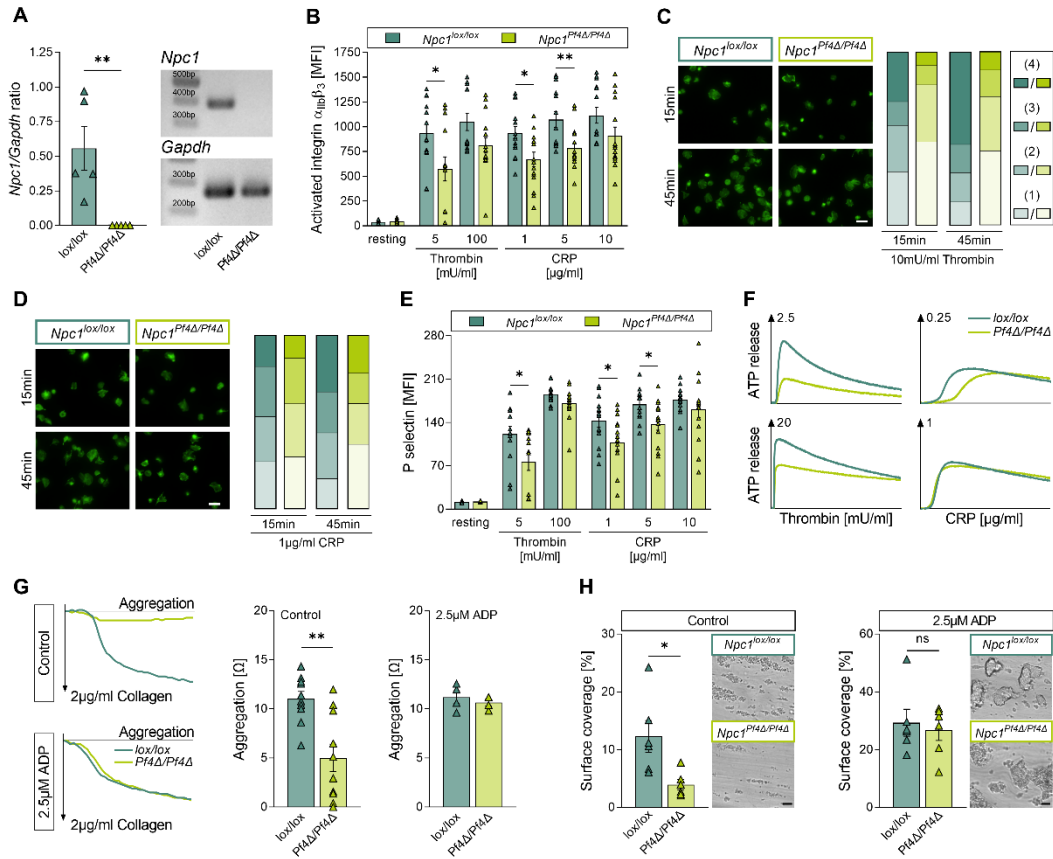


Abbildung 10: Die genetische Deletion von *Npc1* resultiert in einer beeinträchtigten Aktivierung der Thrombozyten und lässt sich durch die Zugabe von ADP kompensieren.

A. Repräsentative PCR-Banden (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links; Intensität) der *Npc1*-Transkription in Thrombozyten von *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Mäusen im Verhältnis zur Transkription von *Gapdh* ($n=5$, $p=0.0078$). B. Arithmetisches Mittel \pm SEM (MFI/PE); $n=13$, $p=0.0278$ und $p=0.0135$ und $p=0.0054$ der Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten nach der Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von Thrombin (in mU/mL) oder CRP (in $\mu\text{g/mL}$). C+D Repräsentative Bilder (links) und gestapelte Säulen (rechts; $n=4$) zur Darstellung des Spreadings von Thrombin- oder CRP-behandelten *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen nach einer Inkubation von 15 oder 45min. Von hell- zu dunkelgrün: (1) keine Filopodien, keine Lamellipodien, (2) nur Filopodien, (3) partielles Spreading, (4) vollständiges Spreading. E. Arithmetisches Mittel \pm SEM (MFI/FITC); $n=13$, $p=0.0251$ und $p=0.0271$ und $p=0.0160$ der Freisetzung von P-Selektin (α -Granula) auf *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten nach der Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von Thrombin (in mU/mL) oder CRP (in $\mu\text{g/mL}$). F. Repräsentative Messungen der ATP-Freisetzung (δ -Granula) in Thrombozyten von *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Mäusen als Antwort auf verschiedene Konzentrationen von Thrombin (in mU/mL) oder CRP (in $\mu\text{g/mL}$). G. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; Fläche unter der Kurve) der Aggregation von *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Vollblut nach der Stimulation mit $2\mu\text{g/mL}$ CRP in An- oder Abwesenheit von $2.5\mu\text{M}$ ADP (Control: $n=10$, $p=0.0014$; ADP: $n=4$, $p=0.4955$). H. Repräsentative Aufnahmen im Phasenkontrast (jeweils rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (jeweils links) der Thrombusfläche in der Flusskammer (Control: $n=6$, $p=0.0158$; ADP: $n=6$, $p=0.6639$). Das Vollblut der *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Mäuse wurde in An- oder Abwesenheit von $2.5\mu\text{M}$ ADP bei einer Scherrate von 1700s^{-1} über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche perfundiert. Der Maßstabsbalken entspricht $50\mu\text{m}$.

In anderen Zelltypen resultiert die Mutation von *Npc1* in einer Akkumulation von Lipiden, insbesondere Cholesterin, Sphingomyelin, Glykosphingolipiden und Sphingosin.¹²⁶ Um zu überprüfen, ob dies auch für das hier beschriebene Mausmodell zutrifft, wurde eine quantitative Lipidom-Analyse durchgeführt. Die erhobenen Daten zeigen ein Ungleichgewicht im Metabolismus der Sphingolipide, welches sich in einer Erhöhung verschiedener Sphingomyeline äußerte. Dabei waren die Level von Sphinganine und Sphingosin am deutlichsten in unstimulierten *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten erhöht (Abbildung 11A).

Lloyd-Evans et al. postulierten 2008, dass nicht die Akkumulation von Cholesterin sondern vielmehr die von Sphingosin die lysosomale Ca²⁺-Homöostase stört.¹²⁴ Daher wurde im nächsten Schritt die Reaktion der [Ca²⁺]_i auf verschiedene Agonisten in *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten mit der von *Npc1*^{lox/lox}-Thrombozyten verglichen. Die Thrombozyten wurden mit Fura-2AM inkubiert und dessen Emission wurde mittels Spektrofluorometer in Gegenwart von 1mM Ca²⁺ oder 500μM EGTA detektiert. Es wurden weder nach der Zugabe von Thrombin noch von CRP statistisch signifikante Unterschiede in dem extrazellulären Ca²⁺-Einstrom oder der Mobilisierung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern beobachtet (Abbildung 11B). Um die Freisetzung von Ca²⁺ aus den verschiedenen Speichern separat zu evaluieren, wurden der SERCA2b-spezifische Inhibitor Thapsigargin (TG) oder der SERCA3-spezifische Inhibitor 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone (TBHQ) verwendet. Die Inkubation der Thrombozyten mit TBHQ verursacht eine Entleerung der SERCA3-abhängigen Ca²⁺-Speicher, weshalb die Ca²⁺-Antwort hauptsächlich auf den SERCA2b-abhängigen Speichern basiert. Analog zu den vorherigen Ergebnissen wurden keine Genotyp-bedingten Unterschiede in der Agonisten-induzierten Erhöhung von [Ca²⁺]_i in TBHQ-behandelten Thrombozyten registriert (Abbildung 11C). Die Funktionsfähigkeit der SERCA2b-abhängigen Ca²⁺-Speicher wurde zudem dadurch bekräftigt, dass weder Unterschiede in der Konzentration von IP₁ (repräsentiert das instabile IP₃) noch in der IP₃-induzierten Ca²⁺-Freisetzung gemessen wurden (Abbildung 11D+E). Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Inkubation mit TG und der Aktivierung durch Thrombin oder CRP eine verminderte Mobilisierung von Ca²⁺ aus den verbleibenden SERCA3-abhängigen

Speichern in *Npc1*-defizienten Thrombozyten (Abbildung 11G). Dieser Befund weist auf eine vorrangige Beteiligung der SERCA3-abhängigen Ca^{2+} -Speicher an der Pathogenese von NPC in Thrombozyten hin.

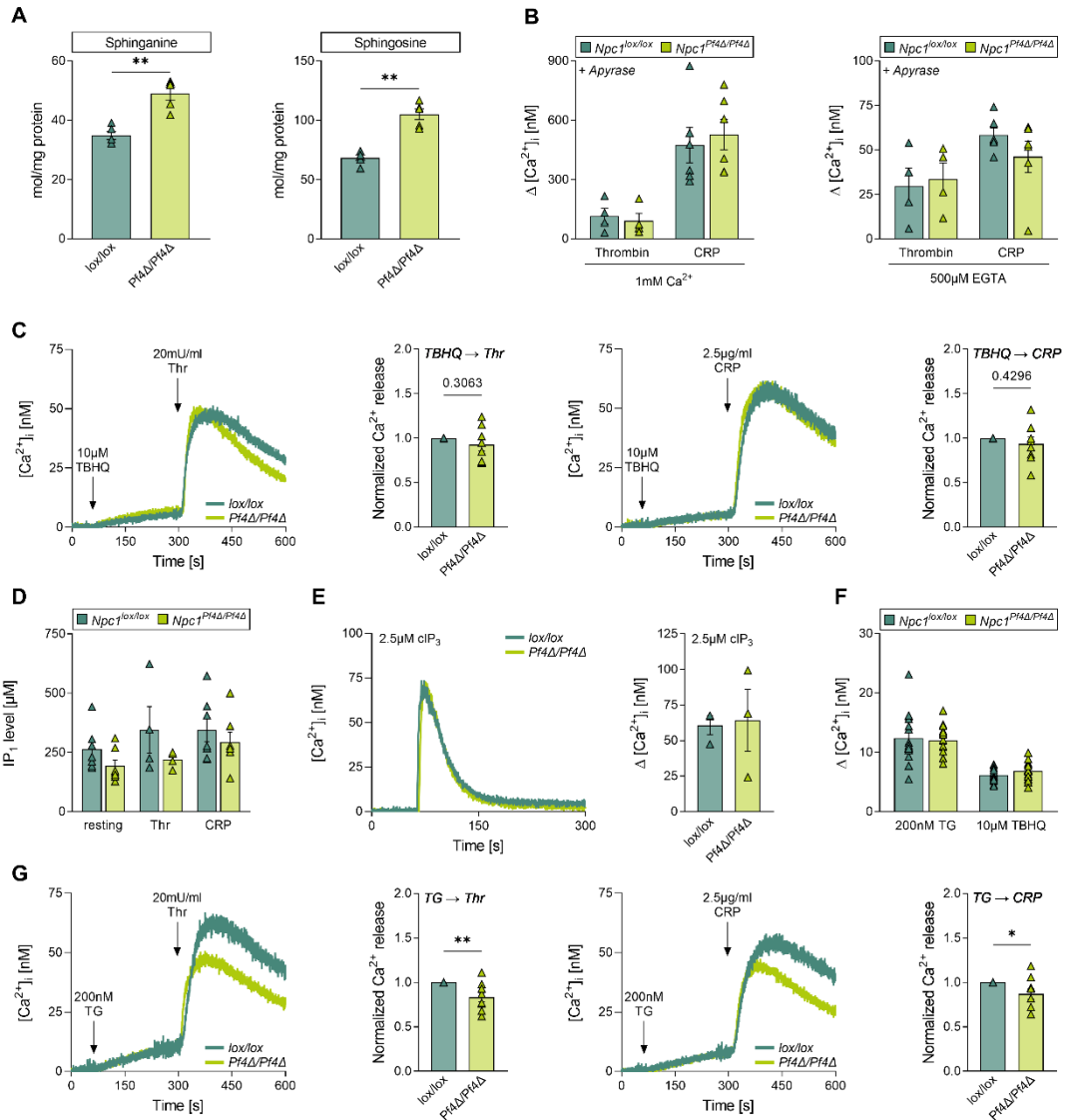


Abbildung 11: *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten weisen erhöhte Level an Spingolipiden und eine gestörte SERCA3-abhängige Ca^{2+} -Antwort auf.

A. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Level von Sphinganine (links; $n=5$, $p=0.0007$) und Sphingosin (rechts; $n=5$, $p=0.0001$) in Thrombozyten von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Mäusen. B. Arithmetisches Mittel \pm SEM (maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Thrombozyten vor und nach der Stimulation mit Thrombin (20mU/mL; 1mM Ca^{2+} ; $n=4$, $p=0.6767$; 500μM EGTA: $n=4$, $p=0.7740$) oder CRP (2.5μg/mL; 1mM Ca^{2+} ; $n=6$, $p=0.6607$; 500μM EGTA: $n=6$, $p=0.2365$) in An- (links) oder Abwesenheit (rechts) von extrazellulärem Ca^{2+} . C. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von TBHQ-behandelten *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Thrombozyten vor (siehe 11F) und nach der Stimulation mit 20mU/mL Thrombin (rechts; $n=8$, $p=0.3063$) oder CRP (links; $n=8$, $p=0.4296$) in Anwesenheit von 500μM EGTA. D. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Level von IP_1 in *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Thrombozyten als Antwort auf die Stimulation mit 20mU/mL Thrombin oder 2.5μg/mL CRP ($n=7$, $p=0.1235$).

und $p=0.2590$ und $p=0.4392$). D. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten nach der Inkubation mit $2.5\mu M$ caged IP_3 und einem $365nm$ Lichtpuls in Anwesenheit von $500\mu M$ EGTA ($n=3$, $p=0.8848$). F. Arithmetisches Mittel \pm SEM (maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von TBHQ- oder TG-behandelten *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten vor der Aktivierung in Anwesenheit von $500\mu M$ EGTA ($n=19$, $p=0.9610$ und $p=0.3694$). G. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; maximale Differenz) der $[Ca^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von TG-behandelten *Npc1^{lox/lox}* (dunkelgrün) und *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* (hellgrün) Thrombozyten vor (siehe 11F) und nach der Stimulation mit $20mU/mL$ Thrombin (rechts; $n=9$, $p=0.0049$) oder CRP (links; $n=9$, $p=0.0402$) in Anwesenheit von $500\mu M$ EGTA.

Im Anschluss sollte ermittelt werden, inwiefern sich die partielle bzw. lokale Einschränkung der Ca^{2+} -Signalgebung auf arterielle Thrombosen in vivo auswirkt. Dazu wurde sowohl in den Carotiden als auch in den mesenterialen Arteriolen von *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*- und *Npc1^{lox/lox}*-Mäusen eine Thrombusbildung mit $FeCl_3$ induziert. Unabhängig von dem untersuchten Gefäßbett kam es in den Mäusen mit einer MK-/Thrombozyten-spezifischen Deletion von *Npc1* zu einem verzögerten Verschluss der verletzten Gefäße (Abbildung 12A+C). So betrug die Okklusionszeit in den Carotiden der *Npc1*-defizienten Mäuse im Mittelwert \pm SEM $1025\pm 94s$, wohingegen diese in den Kontrolltieren bei $590\pm 72s$ lag. Parallel dazu konnte durch die Analyse der Fluoreszenzintensitäten (FI) in den Arterien nachgewiesen werden, dass die Thrombusbildung in den *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Carotiden deutlich schwächer war bzw. dass die gebildeten Thromben deutlich instabiler waren (Abbildung 12B).

Ein protektiver Effekt gegen arterielle Thrombosen kann – ähnlich wie bei Aspirin – mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehen. Durch die Bestimmung der Blutungszeit lässt sich experimentell ein erster Eindruck zu der Beschaffenheit der Hämostase in dem gewählten Modell gewinnen. Nach der Amputation der Schwanzspitze wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Blutstillung der *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse im Vergleich zu den *Npc1^{lox/lox}*-Mäusen beobachtet (Abbildung 12D). Darüber hinaus wurde weder ein Unterschied in der Bildung von Thrombin gemessen (Abbildung 12E) noch wiesen *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Thrombozyten eine verminderte Expression von Phosphatidylserin auf (Abbildung 12F), was auf eine intakte plasmatische Gerinnungskaskade hindeutet.

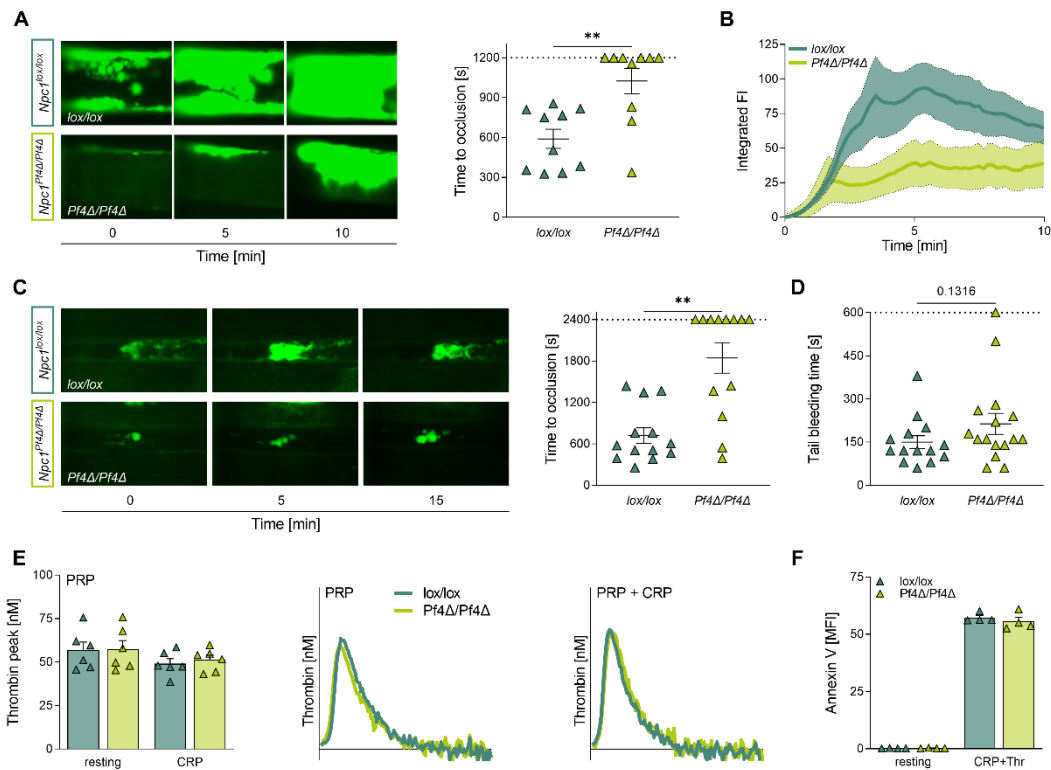


Abbildung 12: Die *Npc1*-Defizienz verursacht eine gestörte *in vivo* Thrombusbildung, wohingegen die Hämostase nicht signifikant beeinträchtigt ist.

A. Repräsentative Abbildung (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links; Okklusionszeit) nach einer FeCl_3 -induzierten Verletzung der Carotiden von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Mäusen ($n=10$; Mann-Whitney Test, $p=0.0043$). B. Integrierte Fluoreszenzintensität der sich bildenden Thromben über die Zeit zur Veranschaulichung der Thrombusstabilität. C. Repräsentative Abbildung (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links; Okklusionszeit) nach einer FeCl_3 -induzierten Verletzung der mesenterialen Arteriolen von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Mäusen ($n=13$; Mann-Whitney Test, $p=0.0007$). D. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Blutungszeit nach der Amputation der Schwanzspitze von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Mäusen ($n=14$; Mann-Whitney Test, $p=0.1316$). E. Repräsentative Messungen (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links; Maximum) von Thrombinbildung in Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) von *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Mäusen ohne oder mit Stimulation durch $10\mu\text{g/mL}$ CRP ($n=6$, $p=0.9287$ und $p=0.5949$). F. Arithmetisches Mittel \pm SEM (MFI(FITC); $n=4$, $p=0.5508$ und $p=0.4733$) der Freisetzung von Annexin V auf *Npc1*^{lox/lox} (dunkelgrün) und *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellgrün) Thrombozyten nach der Stimulation mit einer Kombination von Thrombin (10mU/mL) und CRP ($5\mu\text{g/mL}$).

Alles in allem weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass der Funktionsverlust von NPC1 auch in Thrombozyten die Homöostase von Lipiden und Ca^{2+} beeinträchtigt. Dabei scheint der NPC1-abhängige Ca^{2+} -Defekt mit der Aktivierung der Thrombozyten zu interferieren, obwohl er auf die SERCA3-abhängigen Speicher limitiert ist. Die pharmakologische bzw. klinische Relevanz dieser Beobachtungen wird dadurch gestützt, dass Mäuse mit einer MK-/Thrombozyten-spezifischen *Npc1*-Defizienz gegen arterielle Thrombosen geschützt sind, ohne unter längeren Blutungen zu leiden.

4.3 Diskussion

NPC ist eine seltene Erbkrankheit, die sich durch die Akkumulation von Lipiden in den Lysosomen der Betroffenen auszeichnet. Obwohl in anderen Zelltypen ein Zusammenhang zwischen dem defekten Lipidmetabolismus und der Ca^{2+} -Signalgebung beschrieben wurde und die Thrombozyten von NPC-Patienten eine gestörte Funktion aufweisen, wurden die zugrunde liegenden Mechanismen in Thrombozyten bisher nur unzureichend untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Bedeutung von NPC1 für die Funktion von Thrombozyten. Eine genetische Deletion des *Npc1*-Gens resultierte in einem gestörten Metabolismus von Sphingolipiden und einer beeinträchtigten Mobilisierung von Ca^{2+} aus SERCA3-abhängigen Speichern. Es ist anzunehmen, dass Letzteres an der eingeschränkten Aktivierung der *Npc1*-defizienten Thrombozyten beteiligt ist, welche mit einem protektiven Effekt gegen vaskuläre Okklusionen einhergeht.

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beobachteten Chen et al. eine verminderte Thrombin-induzierte Aggregation von *Npc1*^{-/-}-Thrombozyten. Darüber hinaus zeigten die untersuchten *Npc1*-defizienten Mäuse erhöhte Thrombozytenzahlen und verlängerte Blutungszeiten im Vergleich zu wildtypischen Geschwistertieren.¹²¹ Diese Befunde widersprechen den hier erhobenen Daten, die weder einen NPC1-abhängigen Effekt auf die Thrombopoese noch auf die Blutgerinnung nachweisen konnten. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser beiden Datensätze liefert die genauere Betrachtung der eingesetzten Mausmodelle. Bei Chen et al. wurden globale Knockouts auf einem BALB/c-Hintergrund verwendet, die frühzeitig neurologische Symptome entwickeln und eine verkürzte Lebensdauer von 10-12 Wochen besitzen.¹²¹ Im Gegensatz dazu wiesen die MK-/Thrombozyten-spezifischen Knockouts mit C57BL/6J-Hintergrund keine Belastung auf, wodurch deren Charakterisierung eine isolierte Beurteilung von thrombozytärem NPC1 im Kontext von Thrombose und Hämostase erlaubt.

In ihrer Studie berichteten Chen et al. zudem, dass die Inhibition von NPC1 die Ca^{2+} -Freisetzung aus den acidic Ca^{2+} stores von MEG-01-Zellen verringert.¹²¹

Die hier erhobenen Daten legen nahe, dass intaktes NPC1 auch in Thrombozyten für die Signaltransduktion der SERCA3-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung relevant ist. Diese Hypothese wird dadurch bekräftigt, dass adhärenzte $\text{Npc1}^{\text{Pf4}\Delta/\text{Pf4}\Delta}$ -Thrombozyten nach der Stimulation mit verschiedenen Agonisten eine abgeschwächte Erhöhung der membran-assoziierten Ca^{2+} -Konzentration aufwiesen (Abbildung 13A). Interessanterweise galt dies nicht nur für die Zugabe von Thrombin oder CRP, sondern auch für die von NAADP, einem spezifischen Agonisten der acidic Ca^{2+} stores.¹²⁷

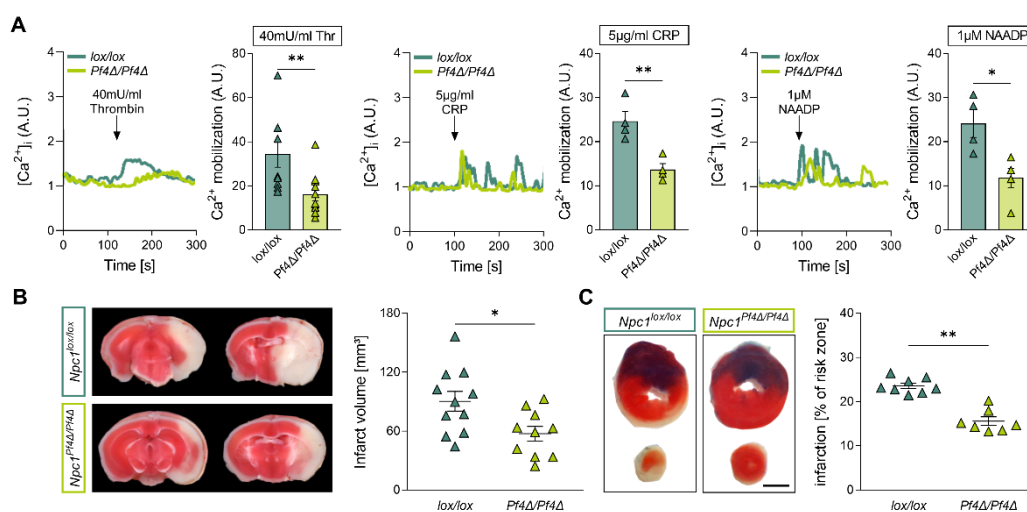


Abbildung 13: $\text{Npc1}^{\text{Pf4}\Delta/\text{Pf4}\Delta}$ -Mäuse sind vor der Entwicklung zerebraler und myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschäden geschützt.¹²⁷

A. Repräsentative Messungen (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen als Fura-2NM-Fluoreszenz von $\text{Npc1}^{\text{lox/lox}}$ (dunkelgrün) und $\text{Npc1}^{\text{Pf4}\Delta/\text{Pf4}\Delta}$ (hellgrün) Thrombozyten nach der Stimulation mit 40 μM Thrombin, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CRP oder 1 μM NAADP in Anwesenheit von 100 μM EGTA. B. Repräsentative Abbildung (links) von TTC-gefärbten Gehirnschnitten und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) der Infarktgrößen von $\text{Npc1}^{\text{lox/lox}}$ (dunkelgrün) und $\text{Npc1}^{\text{Pf4}\Delta/\text{Pf4}\Delta}$ (hellgrün) Mäusen nach der Ligatur der Arteria cerebri media (30 Minuten Ischämie, 24 Stunden Reperfusion). C. Repräsentative Abbildung (links) von TTC-gefärbten Myokardschnitten und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) der Infarktgrößen von $\text{Npc1}^{\text{lox/lox}}$ (dunkelgrün) und $\text{Npc1}^{\text{Pf4}\Delta/\text{Pf4}\Delta}$ (hellgrün) Mäusen nach der Ligatur der linken Koronararterie (30 Minuten Ischämie, 2 Stunden Reperfusion). Der Maßstabsbalken entspricht 1 mm.

Die Ergebnisse der beiden Methoden legen nahe, dass sich die NPC1-abhängigen Effekte auf die acidic Ca^{2+} stores und die unmittelbare Umgebung der Membran beschränken. Dies wird nicht zuletzt dadurch deutlich, dass die gemessenen Unterschiede im Verhältnis zu der gesamten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gering waren. Die Bedeutung dieser lokalen Ca^{2+} -Ströme für die Funktion der Thrombozyten wurde von der Arbeitsgruppe um Prof. Rosa und Prof. Bobe untersucht. Diese stellte fest, dass die Mobilisierung von Ca^{2+} aus den SERCA3-abhängigen Speichern essentiell für die frühe ADP-Sekretion und somit die Aktivierung der

Thrombozyten bis hin zur Entstehung okklusiver Thromben ist.^{58, 61} Parallel zu dem Phänotyp der *Serca3*^{-/-}-Mäuse ließen sich die defekte Aggregation und in vitro Thrombusbildung im Vollblut der *Npc1*-defizienten Mäuse durch die exogene Zugabe von ADP überwinden. Die Versuche von Elaib et al. offenbarten jedoch auch ein erhebliches Blutungsrisiko der *Serca3*-defizienten Mäuse, welches bei den *Npc1*-defizienten Mäusen nicht auftrat.⁶¹ Das Ausbleiben anhaltender Blutungen bei *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Mäusen könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Funktion der SERCA3 durch die Akkumulation von Sphingosin zwar reduziert, aber nicht vollständig abwesend ist. Das eine erhöhte Sphingosin-Konzentration mit der Aktivität verschiedener Ca²⁺-ATPasen interferiert, konnte bereits in anderen Zelltypen gezeigt werden.¹²⁸⁻¹³⁰

Die Entwicklung neuer Antithrombotika, welche die hämostatische Funktion der Thrombozyten kaum bis gar nicht stören, ist zwingend notwendig, um schwere Blutungskomplikationen bei Patienten zu verhindern. In diesem Zusammenhang ist es aussichtsreich, dass *Npc1*-defiziente Mäuse weitestgehend vor FeCl₃-induzierten Okklusionen geschützt waren, ohne veränderte Blutungszeiten aufzuweisen. Weitere in vivo Experimente ergaben, dass *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Mäuse nach zerebralen oder myokardialen Ischämie-/Reperfusionverletzungen geringere Infarktgrößen entwickeln (Abbildung 13B+C).¹²⁷ Einen ähnlichen Effekt beobachteten Davidson et al. nach der Applikation eines NAADP-Antagonisten.¹³¹ Gleichzeitig deuten verschiedene Studien an, dass der Schweregrad kardiovaskulärer Erkrankungen mit Veränderungen des thrombozytären Lipidoms verbunden ist.^{132, 133} Daraus ergibt sich eine hohe klinische Relevanz und ein therapeutisches Potential der hier erforschten molekularen Mechanismen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vertiefen das Wissen über die Funktion von NPC1 in Thrombozyten sowie die lokale Interaktion zwischen dem Metabolismus thrombozytärer Lipide und SERCA3-abhängigen Ca²⁺-Speichern (Abbildung 14). Die protektiven Effekte einer *Npc1*-Defizienz in verschiedenen in vivo Modellen thrombo-okklusiver Erkrankungen erscheinen zunächst vielversprechend. Andererseits entwickeln NPC-Patienten oftmals ernste klinische Symptome, die mit einem frühen Tod einhergehen können.^{123, 134}

Weitere Studien müssen beleuchten, ob sich eine Zelltyp-spezifische oder eine partielle Inhibition der NPC1-abhängigen Signalkaskade als Ziel künftiger Antithrombotika eignet.

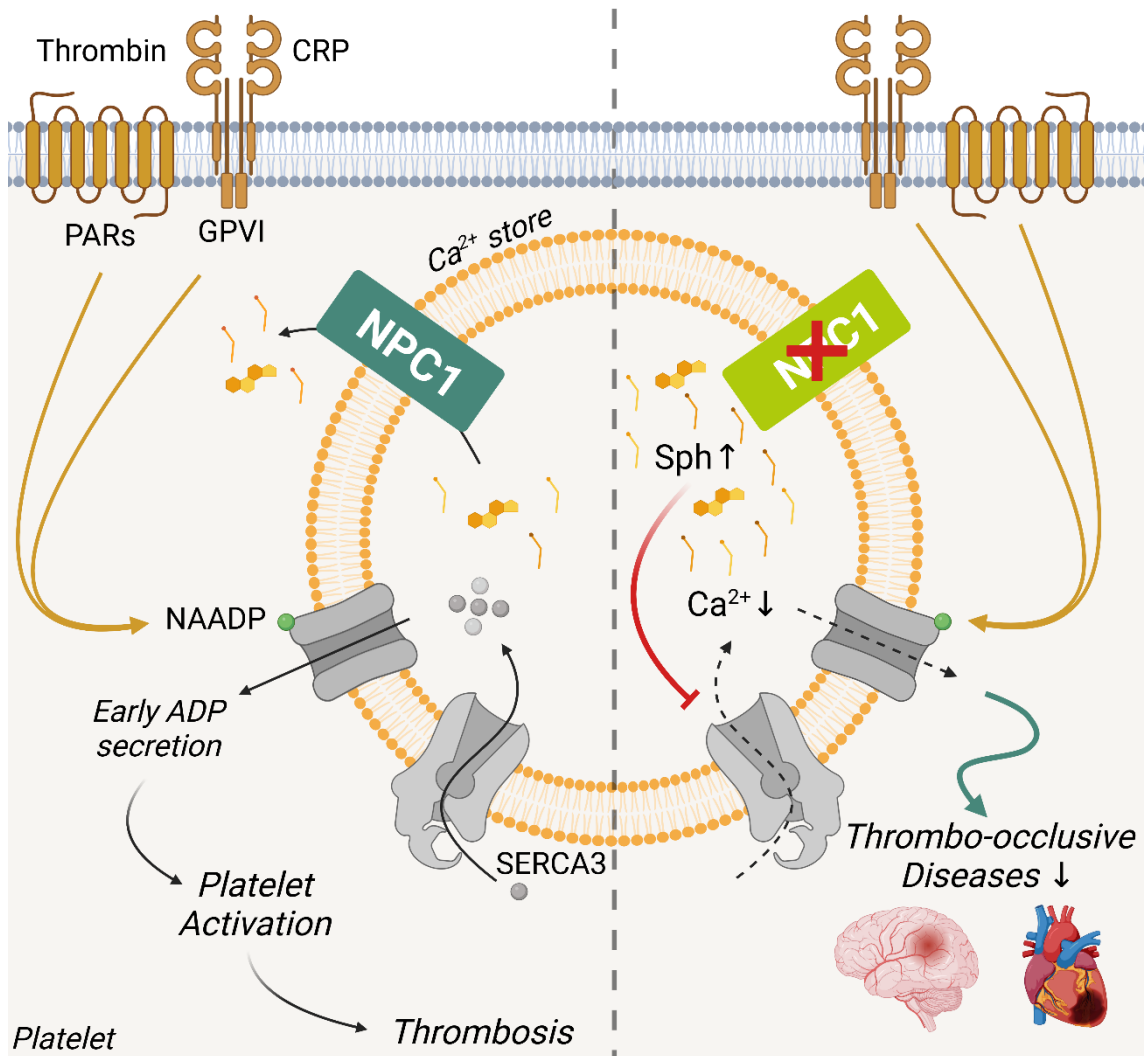


Abbildung 14: Graphische Darstellung der NPC1-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten.¹²⁷
 Adenosindiphosphat (ADP), collagen-related peptide (CRP), Glykoprotein VI (GPVI), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), Niemann-Pick C1 Protein (NPC1), Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 3 (SERCA3), Sphingosin (Sph).

5 Casein Kinase 2 α

5.1 Einleitung

Die Casein Kinase 2 (Csnk2; CK2) ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die ubiquitär exprimiert wird und konstitutiv aktiv ist.¹³⁵ Die CK2 liegt meistens als Tetramer vor, welcher aus zwei β -Untereinheiten besteht, die zwei α - oder α' -Untereinheiten miteinander verbinden.¹³⁶ Die Funktion der CK2 β besteht vornehmlich darin, das Holoenzym zu stabilisieren und dessen Substratspezifität zu regulieren.¹³⁷ Die Phosphorylierung der Substrate wird hingegen durch CK2 α oder CK2 α' katalysiert, welche auch als Monomere wirksam sind.¹³⁸ Dabei handelt es sich bei CK2 α um die Isoform, welche in den meisten humanen Geweben häufiger vorkommt.¹³⁹ Die Sequenz der katalytischen Untereinheiten zeichnet sich durch ein Cluster basischer bzw. positiv geladener Aminosäuren aus (K⁷⁴KKKIKR⁸⁰), welches Interaktionen mit der regulatorischen CK2 β sowie potentiellen Bindungspartnern vermittelt.^{136, 140} Letzteres spiegelt sich einerseits in der Konsensussequenz (pS/pT)DXE der CK2 wider und wird andererseits durch die erhöhte Anzahl an sauren Aminosäuren in der Nähe der Phosphorylierungsstelle betont.¹⁴¹

Die CK2 phosphoryliert eine Vielzahl an Substraten und reguliert so diverse Signalkaskaden, wie zum Beispiel PI3K/Akt, JAK2/STAT3 oder Wnt/ β -catenin.¹⁴² Folglich ist die CK2 an einer beachtlichen Anzahl zellulärer Prozesse beteiligt und verursacht pleiotrope Effekte. Neben Inflammation, zellulärer Adhäsion oder der Organisation des Zytoskeletts beeinflusst die CK2 auch den Zellzyklus und die Apoptose.^{135, 143, 144} Die pathophysiologische Relevanz von Letzterem wird dadurch hervorgehoben, dass zahlreiche Publikationen eine Überexpression von CK2 in unterschiedlichen Tumorzellen dokumentieren und dass bereits zwei CK2-Inhibitoren (Cx-4945 und Cigb-300) im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung von Krebs untersucht werden.^{145, 146} Darüber hinaus wird eine abnormale Aktivität der CK2 mit weiteren Krankheitsbildern assoziiert, darunter Infektionen sowie neurodegenerative oder kardiovaskuläre Erkrankungen.¹⁴²

In Thrombozyten wurde die CK2 1994 durch Hoyt et al. identifiziert.¹⁴⁷ Funktionell wurde die Rolle der thrombozytären CK2 zunächst durch den Einsatz

spezifischer Inhibitoren erforscht. Verschiedene Arbeitsgruppen beobachteten, dass CK2-Inhibitoren die Agonisten-induzierte Aktivierung humaner Thrombozyten beeinträchtigen und darüber hinaus die plasmatische Koagulation stören.¹⁴⁸ Eine pharmakologische Inhibition erlaubt in der Regel weder die Differenzierung zwischen enzymatischen Untereinheiten noch können Off-Target-Effekte vollständig ausgeschlossen werden. Um die Funktionen der einzelnen Untereinheiten von CK2 in Thrombozyten zu entschlüsseln, wurden in unserer Arbeitsgruppe Megakaryozyten (MK)-/Thrombozyten-spezifische *Csnk2β*- und *Csnk2α1*-Knockouts gezüchtet. Die Charakterisierung der *Csnk2β*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten zeigte, dass die regulatorische β-Untereinheit essentiell für die Dynamik der Mikrotubuli ist.¹⁴⁹ Aus der gestörten Polymerisierung von Tubulin in *Csnk2β*-defizienten Thrombozyten resultierte eine verringerte IP₃-vermittelte Mobilisierung von Ca²⁺ aus dem DTS. Ferner regulierte die CK2β die Aktivierung der Thrombozyten bis hin zur Pathogenese arterieller Thrombosen sowie die Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten.¹⁴⁹

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung der CK2α für die Signaltransduktion von Thrombozyten erforscht werden. Dazu wurde zunächst in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Sickmann (Leibniz-Institut für Analytische Wissenschaften, Dortmund) eine quantitative Analyse des Phosphoproteoms von unstimulierten *Csnk2α1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}- und *Csnk2α1*^{lox/lox}-Thrombozyten durchgeführt. Die Messungen ergaben, dass sich 3,26% der detektierten Phosphopeptide signifikant zwischen den beiden Genotypen unterscheiden. Dabei waren in den *Csnk2α1*-defizienten Thrombozyten im Verhältnis zu den wildtypischen Kontrollen ähnlich viele Phosphopeptide hoch- wie runterreguliert (Abbildung 15A+B). Bei den schwächer phosphorylierten Peptiden handelt es sich um potentielle Substrate der CK2α und von diesen konnte ein Drittel mit der Konsensussequenz der CK2 assoziiert werden (Abbildung 15C). Um mehr über die funktionellen Gemeinsamkeiten der CK2α-abhängig regulierten Phosphorylierungen zu erfahren, wurde eine Anreicherungsanalyse (Gene Set Enrichment Analysis; GSEA) mittels Metascape durchgeführt.¹⁵⁰ Diese zeigte, dass sich die zugehörigen Gene in

Clustern befinden, die für die Funktion von Thrombozyten relevant sind. Dazu zählen die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (GO:0030036), die Regulation von Ca^{2+} -vermittelten Signalwegen (GO:0050848) oder die thrombozytäre Aktivierung (KEGG:mmu04611; Abbildung 15D). Den letzten beiden Kategorien lässt sich auch das Gen *Itpr1* zuordnen, welches den IP_3 -Rezeptor Typ 1 ($\text{IP}_3\text{R1}$) kodiert (Abbildung 15E).

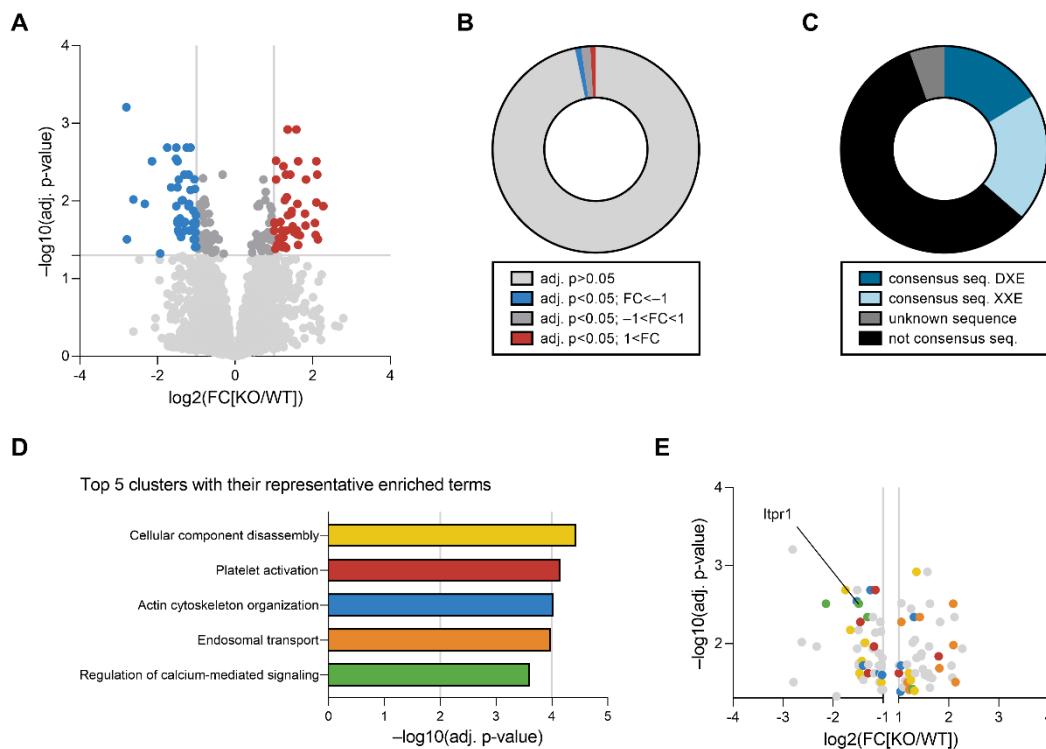


Abbildung 15: Quantitative Analyse des Phosphoproteoms von unstimulierten *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* - und *Csnk2 α 1^{lox/lox}*-Thrombozyten.

A. Volcano Plot der detektierten Phosphopeptide. Aufgetragen wurden der \log_2 vom Verhältnis (fold change; FC) der Intensitäten von *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* (KO) und *Csnk2 α 1^{lox/lox}* (WT) Thrombozyten vs. den $-\log_{10}$ des adjustierten (adj.) p-Wertes. Insgesamt wurden 99 signifikant unterschiedliche Phosphopeptide identifiziert (47 erhöht (1 < FC, rot); 52 erniedrigt (FC < -1; blau)). B. Verteilung von signifikant und nicht signifikant regulierten Phosphopeptiden in *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* im Verhältnis zu *Csnk2 α 1^{lox/lox}* Thrombozyten. Das Farbschema stimmt mit der Abbildung 15A überein. C. Verteilung von Merkmalen der Konsensussequenz in den schwächer phosphorylierten Peptiden (adj. p < 0.05 und FC < -1; blau) der *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* im Verhältnis zu den *Csnk2 α 1^{lox/lox}* Thrombozyten. D. Balkendiagramm mit den fünf Clustern, denen in der Anreicherungsanalyse mittels Metascape die höchsten Signifikanzwerte zugeordnet wurden. E. Volcano Plot der detektierten Phosphopeptide wie in Abbildung 15A. Das Farbschema stimmt mit der Abbildung 15D überein und kennzeichnet die relevanten Cluster.

Der dritte Teil dieser Arbeit widmet sich der Bedeutung der CK2 α -vermittelten Signaltransduktion für die Aktivierung von Thrombozyten bis hin zur in vivo Thrombusbildung im Rahmen arterieller Thrombosen.

5.2 Ergebnisse

Die MK-/Thrombozyten-spezifischen *Csnk2α1*-defizienten Mäuse wiesen keine Genotyp-bedingten Belastungen auf. Gleichzeitig ergab die Untersuchung der Blutparameter eine Makrothrombozytopenie dieser Mäuse im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren (Abbildung 16A). Die CK2 setzt sich aus vier Untereinheiten zusammen. Dazu gehören zwei regulatorische β-Untereinheiten und zwei katalytische α- oder α'-Untereinheiten. Mittels Western Blot wurde zunächst verifiziert, dass in den Thrombozyten von *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäusen keine CK2α exprimiert wird (Abbildung 16B). Darüber hinaus wurde überprüft, ob sich die genetische Deletion von *Csnk2α1* auf die Expression der anderen Untereinheiten auswirkt. Während kein signifikanter Unterschied bezüglich CK2α' beobachtet wurde, wurde eine verringerte Menge an CK2β in den *Csnk2α1*-defizienten Thrombozyten detektiert (Abbildung 16B).

Die globale Analyse der CK2α-abhängigen Phosphorylierungen in murinen Thrombozyten ergab eine Vielzahl potentieller Substrate. Interessanterweise war unter diesen Substraten auch der IP₃R1, welcher den Ausstrom von Ca²⁺ aus dem DTS steuert. Um diesen Befund zu validieren, wurden Western Blots durchgeführt. Diese bestätigten, dass die detektierte Phosphorylierungsstelle pSer1755 in *Csnk2α1*-defizienten Thrombozyten deutlich schwächer phosphoryliert ist (Abbildung 16C). Da die Aktivität bzw. Öffnungswahrscheinlichkeit des IP₃R1s durch die Phosphorylierung an Ser1755 reguliert werden kann, wurde anschließend die IP₃-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung untersucht. Die fluoreszenzspektrometrischen Messungen zeigten eine reduzierte Erhöhung von [Ca²⁺]_i nach der photochemischen Freisetzung von IP₃ in *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Thrombozyten im Vergleich zu den Thrombozyten der Kontrolltiere (Abbildung 16D). Gleichzeitig wurde kein signifikanter Unterschied in den IP₁-Leveln dieser Zellen gemessen, wobei IP₁ als stabiler Metabolit von IP₃ dessen Konzentration wiedergibt (Abbildung 16E). Neben der gestörten IP₃R1-vermittelten Ca²⁺-Mobilisierung wiesen *Csnk2α1*-defiziente Thrombozyten auch eine abgeschwächte Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern nach der Stimulation mit CRP oder Thrombin auf (Abbildung 16F+G). Aufgrund des stärkeren Effektes der *Csnk2α1*-Defizienz auf die CRP-induzierte

Ca²⁺-Antwort wurde im Folgenden hauptsächlich die Signaltransduktion downstream von GPVI untersucht.

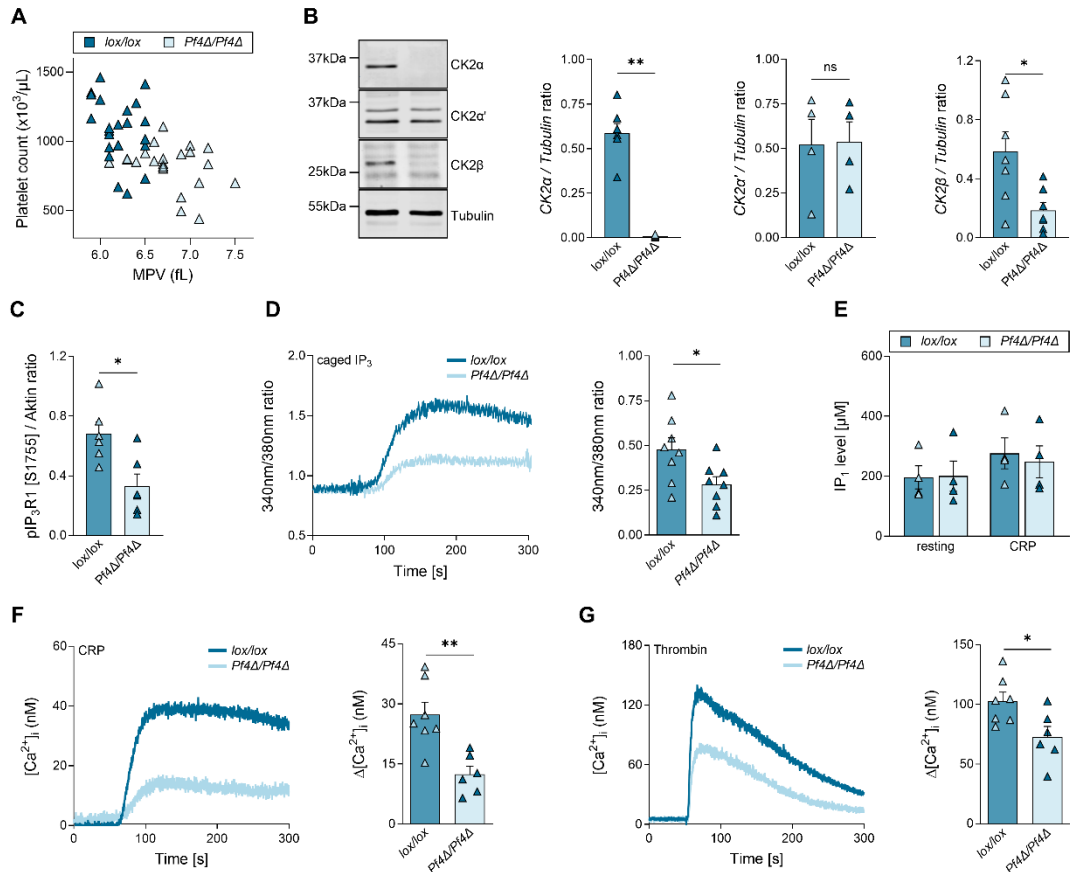


Abbildung 16: Die genetische Deletion von Csnk2α1 resultiert in einer gestörten Thrombopoese und einer reduzierten IP₃R1-abhängigen Ca²⁺-Mobilisierung aus intrazellulären Speichern.

A. Blutparameter von Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Mäusen wurden mit einem Hämatologie-Analysesystem (KX-21N, Sysmex) analysiert. Jedes Dreieck entspricht der Thrombozytenanzahl und -größe einer Maus (n=22). MPV: mean platelet volume. B. Repräsentative Western Blot-Banden (links) und arithmetisches Mittel ± SEM (rechts; Intensität) der Expression von CK2α, CK2α' und CK2β in Thrombozyten von Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Mäusen im Verhältnis zur Expression von Tubulin (CK2α: n=7, Mann-Whitney Test, p=0.0006; CK2α': n=4, p=0.9363; CK2β: n=7, p=0.0168). C. Arithmetisches Mittel ± SEM (Intensität) der Phosphorylierung von IP₃-Rezeptor Typ 1 an Serin 1755 (S1755) in Thrombozyten von Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Mäusen im Verhältnis zur Expression von Aktin (n=6, p=0.0114). D. Repräsentative Messung (links) und arithmetisches Mittel ± SEM (rechts; maximale Differenz) der [Ca²⁺]_i, gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz in Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Thrombozyten nach der Inkubation mit 2.5μM caged IP₃ und einem 365nm Lichtpuls in Anwesenheit von 500μM EGTA (n=8, p=0.0254). E. Arithmetisches Mittel ± SEM der Level von IP₁ in Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Thrombozyten mit und ohne Stimulation durch 2.5μg/mL CRP (n=4, p=0.9509 und p=0.7147). F+G. Repräsentative Messung (links) und arithmetisches Mittel ± SEM (rechts; maximale Differenz) der [Ca²⁺]_i, gemessen als Fura-2AM-Fluoreszenz von Csnk2α1^{lox/lox} (türkis) und Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ} (hellblau) Thrombozyten nach der Stimulation mit CRP (5μg/mL; n=6, p=0.0028) und Thrombin (20mU/mL; n=6, p=0.0234) in Anwesenheit von 500μM EGTA.

Als Nächstes wurde evaluiert, welche Auswirkungen der CK2α-abhängige Defekt in der Ca²⁺-Signalgebung auf die Aktivierung der Thrombozyten hat. Dazu

wurden unterschiedliche funktionelle Messungen mit den Thrombozyten der *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse durchgeführt und mit denen von *Csnk2α1^{lox/lox}*-Kontrollen verglichen. *Csnk2α1*-defiziente Thrombozyten zeigten eine abgeschwächte Integrin αIIbβ3-Aktivierung nach der Stimulation mit CRP, welche mit einem beeinträchtigten Spreading auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen einherging (Abbildung 17A+B). Darüber hinaus waren die Aggregation und die Sekretion der *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Thrombozyten gestört, wobei sich Letzteres sowohl in einer verringerten Freisetzung von P-Selektin als auch von ATP widerspiegelte (Abbildung 17C+D). Diese Effekte traten vornehmlich bei geringen CRP-Konzentrationen auf und blieben bei hohen Konzentrationen des Agonisten aus. Um zu ermitteln, inwiefern sich die reduzierte Aktivierung der Thrombozyten auf die Thrombusbildung auswirkt, wurde das Vollblut von *Csnk2α1^{lox/lox}*- und *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäusen bei hohen oder niedrigen Scherraten über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche perfundiert. Die Ergebnisse in Abbildung 17E veranschaulichen, dass *Csnk2α1*-defiziente Thrombozyten unabhängig von der Scherrate nur eingeschränkt an Kollagenfasern adhären und weniger bzw. kleinere Thromben bilden (Abbildung 17E). Abschließend wurde in einem experimentellen Modell der arteriellen Thrombose erforscht, ob sich diese in vitro Befunde auch auf die Thrombusbildung in vivo übertragen lassen. Dazu wurden die Carotiden von narkotisierten *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*- und *Csnk2α1^{lox/lox}*-Mäusen exponiert und mit einem FeCl₃-getränktem Filterpapier verletzt. Es dauerte deutlich länger bis in den Carotiden der *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse aufgrund der induzierten Gefäßverletzung eine vollständige Okklusion auftrat (Abbildung 17F). Trotz dieses protektiven Effektes konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Blutungszeiten der *Csnk2α1*-defizienten Mäuse und denen der wildtypischen Geschwistertiere nachgewiesen werden (Abbildung 17G).

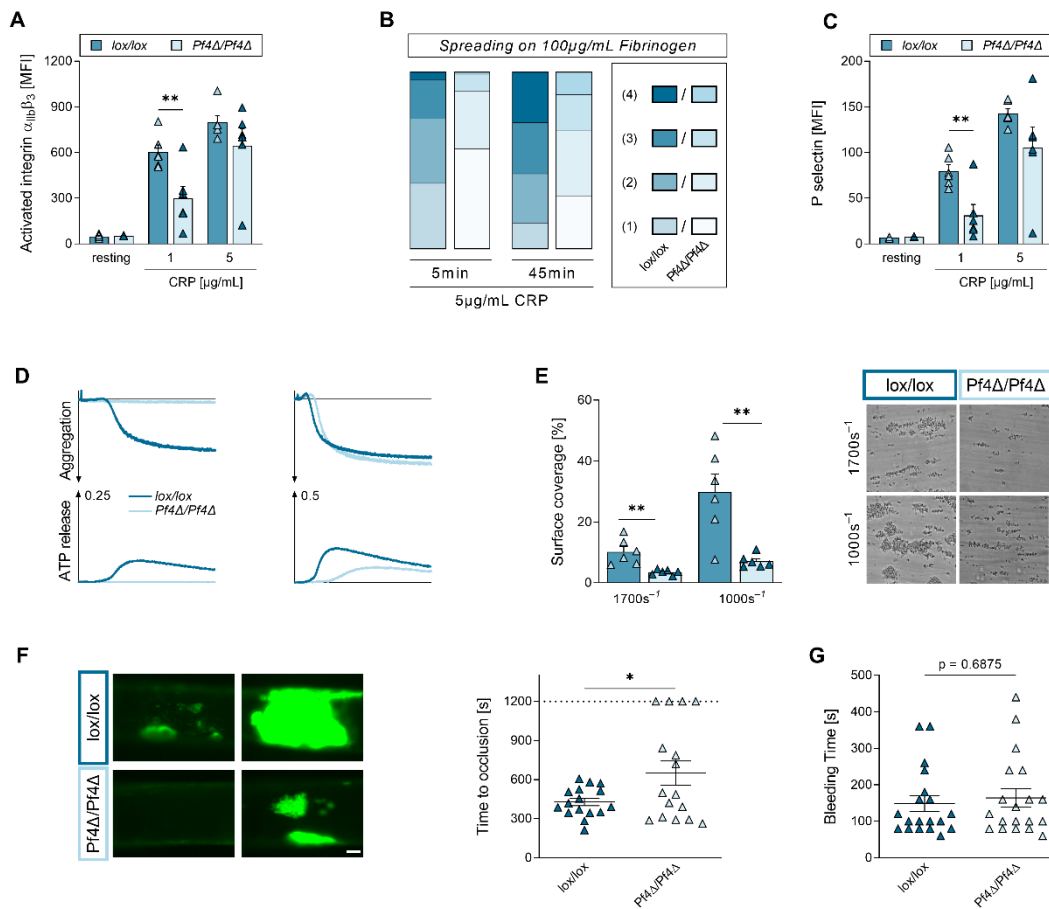


Abbildung 17: Die CK2 α -Defizienz beeinträchtigt die Aktivierung, Aggregation und Thrombusbildung der Thrombozyten, ohne das Blutungsrisiko der Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} -Mäuse zu beeinflussen.

A. Arithmetisches Mittel \pm SEM (MFI(PE); n=6, CRP: p=0.0071 und p=0.2260) der Aktivierung von Integrin α IIb β 3 auf Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Thrombozyten nach der Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von CRP (in μ g/mL). B. Gestapelte Säulen (n=5) zur Darstellung des Spreadings von CRP-behandelten Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Thrombozyten auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen nach einer Inkubation von 5 oder 45min. Von hellblau zu türkis: (1) keine Filopodien, keine Lamellipodien, (2) nur Filopodien, (3) partielles Spreading, (4) vollständiges Spreading. C. Arithmetisches Mittel \pm SEM (MFI(FITC); n=6, CRP: p=0.0053 und p=0.1315) der Freisetzung von P-Selektin (α -Granula) auf Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Thrombozyten nach der Stimulation mit aufsteigenden Konzentrationen von CRP (in μ g/mL). D. Repräsentative Messungen der Aggregation und der ATP-Freisetzung (δ -Granula) in Thrombozyten von Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Mäusen als Antwort auf verschiedene Konzentrationen von CRP (in μ g/mL). E. Repräsentative Aufnahmen im Phasenkontrast (rechts) und arithmetisches Mittel \pm SEM (links) der Thrombusfläche in der Flusskammer (1700s⁻¹: n=6, p=0.0036; 1000s⁻¹: n=6, p=0.0035). Das Vollblut der Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Mäuse wurde bei einer Scherrate von 1700s⁻¹ oder 1000s⁻¹ über eine Kollagen-beschichtete Oberfläche perfundiert. F. Repräsentative Abbildung (links) und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts; Okklusionszeit) nach einer FeCl₃-induzierten Verletzung der Carotiden von Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Mäusen (n=16; p=0.0305). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. G. Arithmetisches Mittel \pm SEM der Blutungszeit nach der Amputation der Schwanzspitze von Csnk2 α ^{lox/lox} (türkis) und Csnk2 α ^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} (hellblau) Mäusen (n=19; Mann-Whitney Test, p=0.6875).

Insgesamt weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die genetische Deletion der Csnk2 α in Thrombozyten eine verminderte IP₃R1-abhängige Erhöhung der [Ca²⁺]_i verursacht und auf diese Weise die thrombozytäre Aktivierung stört. In der

Folge scheint die CK2 α -Defizienz vor arteriellen Thrombosen zu schützen, wobei jedoch kein Einfluss auf die Hämostase festgestellt werden konnte.

5.3 Diskussion

Es ist bekannt, dass die CK2 in eukaryotischen Zellen pleiotrope Funktionen übernimmt und diverse Substrate phosphoryliert. Eine Studie aus dem Jahr 2011 schätzte, dass die CK2 bis zu einem Viertel aller Phosphorylierungen im humanen Serin-/Threonin-Phosphoproteom katalysiert.^{151, 152} Die existenzielle Bedeutung der CK2 spiegelt sich zudem in der embryonalen Letalität globaler *Csnk2 α 1*- oder *Csnk2 β* -Knockouts wider.^{153, 154} Im Gegensatz dazu sind *Csnk2 α 2*^{-/-}-Mäuse zwar lebensfähig, die Männchen können jedoch keine Nachkommen zeugen.¹⁵⁵ Dieser Befund deutet auf eine funktionelle Spezialisierung der verschiedenen katalytischen Untereinheiten hin und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit: Obwohl murine Thrombozyten CK2 α' exprimieren und sich deren Proteinlevel nicht signifikant durch die genetische Deletion von *Csnk2 α 1* verändert, konnte diese Isoform die Abwesenheit von CK2 α nicht vollständig kompensieren. Gleichzeitig wiesen *Csnk2 α 1*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} -Thrombozyten analog zu *Csnk2 α 1*^{-/-}-Embryonen verminderte CK2 β -Level auf.¹⁵³ Eine mögliche Erklärung hierfür liefert eine Arbeit von Zhang et al., in der ein Zusammenhang zwischen der Autophosphorylierung von CK2 β und deren Stabilität hergestellt werden konnte.¹⁵⁶

Ferner ist zu berücksichtigen, dass alle drei Untereinheiten der CK2 unabhängig von dem Holoenzym agieren können.¹³⁵ Durch die genetische Deletion der *Csnk2 α 1* entfällt nicht nur die Wirkung der CK2 α , sondern verschiebt sich mutmaßlich auch das Gleichgewicht zwischen dem Holoenzym (CK2 α' CK2 β)₂ und den isolierten Untereinheiten CK2 α' sowie CK2 β . Die komplexen Zusammenhänge und der Mangel an Isoform-spezifischen Inhibitoren erschweren eine individuelle Funktionsanalyse. Ein umfassendes Verständnis könnte jedoch notwendig sein, um die Effizienz bzw. die Verträglichkeit von CK2-Inhibitoren zu verbessern und deren Indikationsspektrum zu erweitern. Beispielsweise zeigten kürzlich veröffentlichte Daten einer Phase-Ib/II-Studie, dass knapp jeder zwölfte Patient, der mit Cx-4945 behandelt wurde, eine

Thrombozytopenie entwickelt.¹⁵⁷ Dieser Befund deckt sich mit den Makrothrombozytopenien der untersuchten *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*- und *Csnk2β^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse. Falls weitere Studien zeigen sollten, dass CK2α nicht relevant für die Thrombopoese ist, wären Isoform-spezifische Inhibitoren eventuell eine Möglichkeit diese unerwünschte Nebenwirkung zu umgehen. Neueste Fortschritte im Bereich Zell-basierter Assays und Inhibitor-resistenter CK2-Mutanten versprechen nicht nur eine systematische Identifikation von bona fide Substraten in lebenden Zellen, sondern könnten auch bei der differenzierten Charakterisierung der einzelnen Untereinheiten helfen.¹⁵⁸

Die quantitative Analyse des CK2α-abhängigen Phosphoproteoms ergab, dass *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Thrombozyten eine abgeschwächte Phosphorylierung des IP₃R1 an Ser1755 aufweisen. Dass diese Phosphorylierung spezifisch auf die genetische Deletion von *Csnk2α1* zurückzuführen ist, wird unter anderem durch den unveränderten Phosphorylierungsstatus von Ser1755 in *Csnk2β^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Thrombozyten bekräftigt.¹⁴⁹ Die Wirkung dieser Phosphorylierung wurde über viele Jahre kontrovers diskutiert mit dem aktuellen Konsens, dass die Phosphorylierung die Öffnungswahrscheinlichkeit des IP₃R1 erhöht und damit dessen Aktivität steigert.¹⁵⁹ In Hepatozyten resultierte der Austausch von Ser1756 und Ser1589 gegen Alanin beispielsweise in einer gestörten Ca²⁺-Mobilisierung und einer verringerten Glukagon-induzierten Sekretion von Glukose.⁵⁰ Analog zu diesem Befund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine beeinträchtigte Ca²⁺-vermittelte Aktivierung von *Csnk2α1*-defizienten Thrombozyten beobachtet. Es bleibt anzumerken, dass die detektierte Phosphorylierung an Ser1755 im Allgemeinen der Proteinkinase A zugeordnet wird.¹⁶⁰ Aus diesem Grund ist eher von einem indirekten Einfluss der CK2α-Defizienz auf die reduzierte Phosphorylierung des IP₃R1 auszugehen, zum Beispiel durch ein fehlendes Priming der Proteinkinase A-abhängigen Phosphorylierung.¹⁶¹

Die Daten der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, dass CK2α essentiell an der Ca²⁺-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten und an der Entwicklung arterieller Thrombosen in vivo beteiligt ist. Damit ähnelt der Phänotyp der *Csnk2α1^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse dem der *Csnk2β^{Pf4Δ/Pf4Δ}*-Mäuse, auch wenn sich die

zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden.¹⁴⁹ In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen belegen zahlreiche Studien den antithrombotischen Effekt einer Inhibition von CK2. Nach der Inkubation mit verschiedenen CK2-Inhibitoren wiesen humane Thrombozyten eine abgeschwächte Aggregation als Antwort auf PAR1/4-AP, (2-MeS)ADP oder CRP auf, die unter anderem von einer verminderten Sekretion, Integrin α IIb β 3 Aktivierung und TxA₂-Synthese begleitet wurde.^{149, 162-164} Außerdem stellten Ampofo et al. in einem in vivo Modell fest, dass sich die Venolen von Cx-4945-behandelten Mäusen nach einer photochemisch-induzierten Thrombusbildung deutlich später verschließen.¹⁶⁴ Abhängig von der Lokalisation eines thrombotischen Verschlusses kann dieser einen Herzinfarkt verursachen.^{10, 11} In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, dass Zhou et al. eine Hochregulierung der CK2 α -Expression im Rahmen eines myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschadens beobachteten. Umgekehrt ergaben ihre Untersuchungen, dass Mäuse mit einer Myokard-spezifischen Deletion von *Csnk2 α* signifikant kleinere Infarkte entwickeln.¹⁶⁵ Messungen unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* -Mäuse ebenfalls vor myokardialen Ischämie-/Reperfusionsschäden geschützt sind. In einem vergleichbaren in vivo Modell zeigten *Csnk2 α 1*-defiziente Mäuse nicht nur verminderte Infarktgrößen, sondern auch ein erhöhtes Schlagvolumen im Vergleich zu *Csnk2 α 1^{lox/lox}*-Mäusen (Abbildung 18A+B).

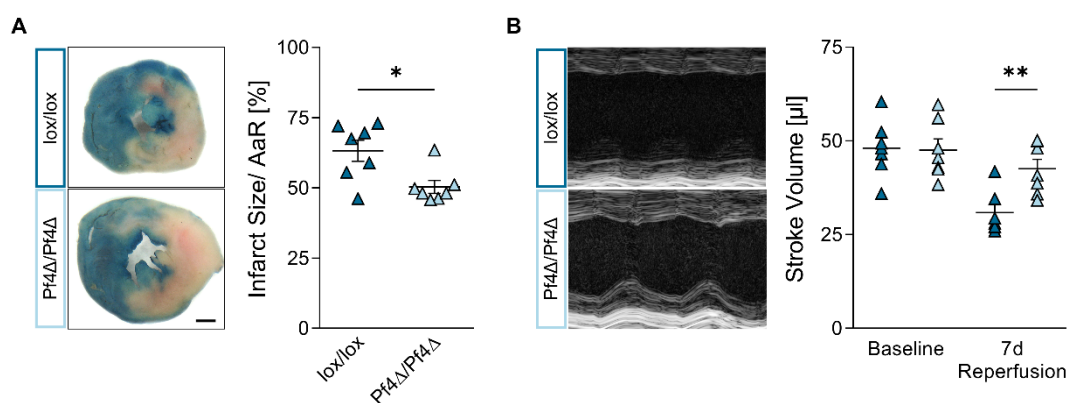


Abbildung 18: *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* -Mäuse sind vor der Entwicklung myokardialer Ischämie-/Reperfusionsschäden geschützt.

A. Repräsentative Abbildung (links) von TTC-gefärbten Myokardschnitten und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) der Infarktgrößen von *Csnk2 α 1^{lox/lox}* (türkis) und *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* (hellblau) Mäusen nach der Ligatur der linken Koronararterie (30 Minuten Ischämie, 7 Tage Reperfusion). Der Maßstabsbalken entspricht 1mm. AaR: Area at Risk bezeichnet das potentielle Infarktgebiet. B. Repräsentative Abbildung (links) der

linksventrikulären Wandbewegungen im M-Mode und arithmetisches Mittel \pm SEM (rechts) des Schlagvolumens der operierten *Csnk2 α 1^{lox/lox}* (türkis) und *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* (hellblau) Mäuse gemessen mittels Echokardiografie.

Zusätzlich zu den antithrombotischen und kardioprotektiven Effekten berichteten andere Arbeitsgruppen auch von reno- sowie neuroprotektiven Eigenschaften unterschiedlicher CK2-Inhibitoren.^{166, 167} Gleichzeitig scheint das Risiko für schwere Blutungen gering zu sein, was sich unter anderem in den nicht signifikant unterschiedlichen Blutungszeiten der *Csnk2 α 1^{Pf4 Δ /Pf4 Δ}* - und *Csnk2 α 1^{lox/lox}*-Mäuse widerspiegelte. Aufgrund dieses günstigen Wirkprofils eignet sich die CK2 als pharmakologisches Ziel für die Entwicklung zukünftiger Therapien gegen kardiovaskuläre Erkrankungen. Dabei befindet sich die Entwicklung wegen des Vorhandenseins spezifischer und klinisch getesteter CK2-Inhibitoren bereits im fortgeschrittenen Stadium, was einen großen Vorteil gegenüber alternativen Strategien darstellt.

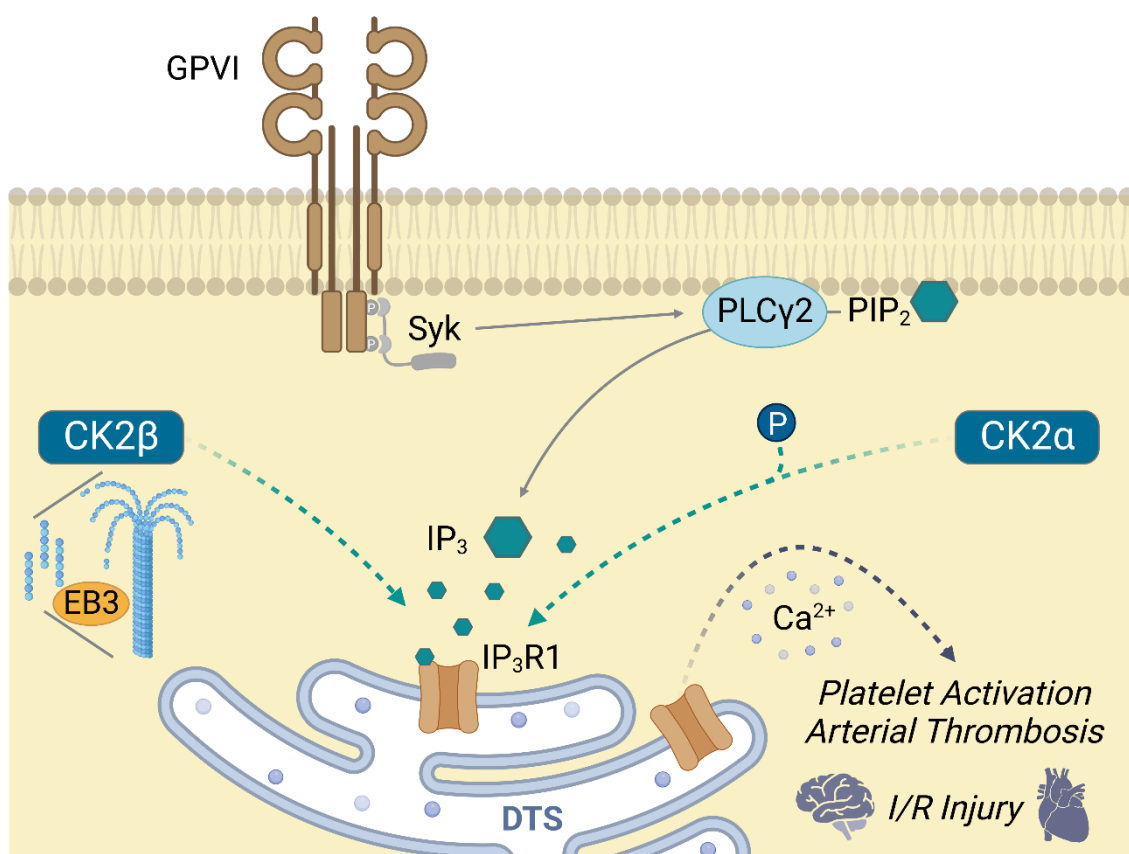


Abbildung 19: Graphische Darstellung der CK2 α -abhängigen Aktivierung von Thrombozyten.

Casein Kinase 2 (CK2), dense tubular system (DTS), Glykoprotein VI (GPVI), end-binding protein 3 (EB3), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$), IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R), Ischämie/Reperfusion (I/R), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$), Phospholipase C (PLC).

6 Zusammenfassung

Thrombo-okklusive Erkrankungen, wie zum Beispiel Herzinfarkt oder Schlaganfall, resultieren hauptsächlich aus der übersteigerten Aktivierung von Thrombozyten. Dabei werden die thrombozytäre Adhäsion und Aggregation sowie die Thrombusbildung durch ein komplexes Netzwerk gesteuert, welches erhebliche Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ und des Lipidmetabolismus verursacht. Diese Prozesse werden wiederum von einer Vielzahl an Regulatoren beeinflusst, zu denen beispielsweise Lipid-bindende Proteine oder Kinasen zählen. Die Erforschung dieser Regulatoren erweitert nicht nur unser Verständnis für die molekularen Mechanismen in Thrombozyten, sondern ermöglicht auch die Identifizierung neuer Ansatzpunkte für antithrombotische Therapien. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Proteine (Annexin A7, Niemann-Pick C1 Protein und Casein Kinase 2 α) untersucht werden, die über die Lipid- und Ca^{2+} -abhängige Signaltransduktion auf die Aktivierung von Thrombozyten wirken.

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Lipid- und Ca^{2+} -bindenden Protein Annexin A7. Funktionelle Messungen ergaben eine abgeschwächte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ und eine verminderte Aggregation sowie Sekretion der Thrombozyten von *Anxa7^{-/-}*-Mäusen nach der Stimulation von CLEC-2 im Vergleich zu *Anxa7^{+/+}*-Thrombozyten. Während *Anxa7^{-/-}*-Chimären in einem Modell der $FeCl_3$ -induzierten Gefäßverletzung vor thrombotischen Okklusionen geschützt waren, wurde keine Verlängerung der Blutungszeit beobachtet. Eine intakte Hämostase wurde zudem dadurch bekräftigt, dass weder die Bildung von Thrombin noch die plasmatische Koagulation signifikante Unterschiede aufwiesen. Anhand eines Experimentes in der Flusskammer konnte die Spezifität des ANXA7-Inhibitors ABO nachgewiesen werden, der anschließend C57BL/6J-Mäusen appliziert wurde. Analog zu den *Anxa7*-defizienten Mäusen zeigten auch ABO-behandelte Mäuse kein erhöhtes Blutungsrisiko, obwohl das Vollblut dieser Mäuse eine gestörte in vitro Thrombusbildung indizierte.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem lysosomalen Membranprotein Niemann-Pick C1 Protein. Die Ergebnisse demonstrierten eine verminderte Agonisten-induzierte Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$ in

Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten, welche mit einem reduzierten Spreading auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen assoziiert war. Darüber hinaus wiesen *Npc1*-defiziente Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollen eine abgeschwächte Sekretion der Granula auf, was sich in einer erniedrigten Freisetzung von P-Selektin und ATP widerspiegelte. Sowohl die Kollagen-vermittelte Aggregation als auch die in vitro Thrombusbildung waren im Vollblut von *Npc1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Mäusen beeinträchtigt. Beide Reaktionen konnten jedoch durch die Zugabe von exogenem ADP wiederhergestellt werden. Die *Npc1*-defizienten Thrombozyten zeigten erhöhte Level an Sphingolipiden und eine gestörte SERCA3-abhängige Ca²⁺-Mobilisierung, wohingegen die IP₃-induzierte Ca²⁺-Freisetzung unauffällig war. Diese in vitro Befunde mündeten in einem protektiven Effekt der NPC1-Defizienz gegen die FeCl₃-induzierte Thrombusbildung, ohne sich in der Blutungszeit oder der Phosphatidylserin-abhängigen Bildung von Thrombin abzuzeichnen.

Der dritte Teil dieser Arbeit widmet sich der ubiquitär exprimierten Serin-/Threonin-Kinase Casein Kinase 2α. Die quantitative Analyse des CK2α-abhängigen Phosphoproteoms in unstimulierten Thrombozyten ergab, dass der IP₃R1 in *Csnk2α1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Mäusen weniger stark phosphoryliert wird. Diese Beobachtung wurde mittels Western Blot validiert und ging mit einer gestörten IP₃-induzierten Ca²⁺-Mobilisierung einher. Weitere Ca²⁺-Messungen deuteten zudem auf eine verminderte Agonisten-induzierte Erhöhung der [Ca²⁺]_i in *Csnk2α1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollen hin. Außerdem zeichneten sich *Csnk2α1*-defiziente Thrombozyten durch eine reduzierte Freisetzung von P-Selektin sowie durch eine abgeschwächte Aktivierung von Integrin αIIbβ₃ nach der Stimulation mit CRP aus, die mit einem verringerten Spreading auf Fibrinogen-beschichteten Oberflächen verbunden war. Eine gestörte Aggregation und Sekretion der *Csnk2α1*-defizienten Thrombozyten wurde mittels Lumineszenz-Aggregometer nachgewiesen. Im Einklang mit diesen Ergebnissen waren sowohl die in vitro Thrombusbildung als auch die FeCl₃-induzierte Okklusion der Carotiden in *Csnk2α1*^{Pf4Δ/Pf4Δ}-Mäusen

beeinträchtigt, wohingegen die Mäuse im Vergleich zu den *Csnk2α1^{lox/lox}*-Mäusen keinen signifikanten Unterschied in den Blutungszeiten aufwiesen.

Die vorliegende Arbeit bekräftigt, dass es sich bei den ausgewählten Proteinen um wichtige Regulatoren der Lipid- und Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen thrombo-okklusiver Erkrankungen handelt. Folglich stellen Annexin A7, das Niemann-Pick C1 Protein und die Casein Kinase 2α vielversprechende Ziele für die Entwicklung zukünftiger Antithrombotika dar. Weitere Studien sind notwendig, um die klinische Relevanz dieser experimentellen Befunde zu evaluieren.

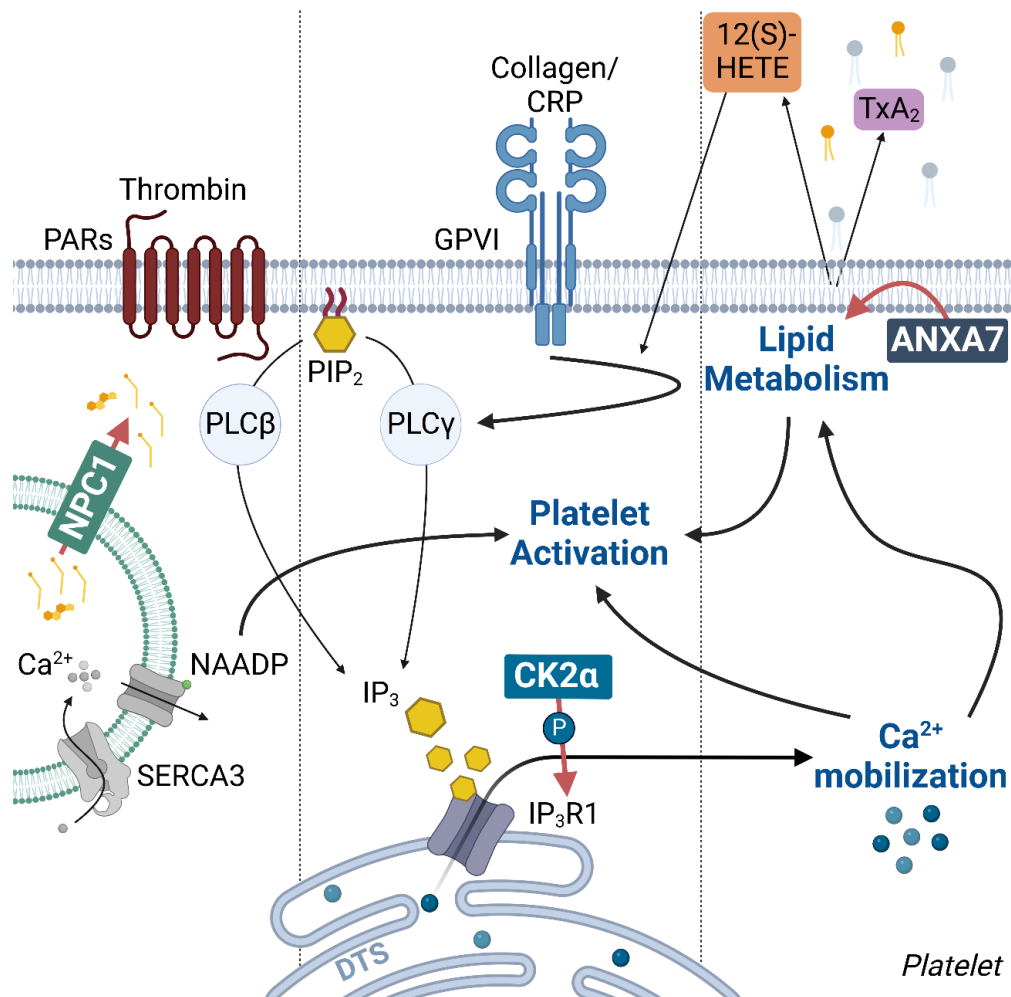


Abbildung 20: Graphische Darstellung der NPC1-, CK2α- und ANXA7-abhängigen Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen der arteriellen Thrombose.

12(S)-hydroxy-eicosatetraenoic acid (12(S)-HETE), Casein Kinase 2 (CK2), collagen-related peptide (CRP), dense tubular system (DTS), Glykoprotein VI (GPVI), Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), IP₃-Rezeptor (IP₃R), nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), Niemann-Pick C1 Protein (NPC1), Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), Phospholipase C (PLC), sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 3 (SERCA3), Thromboxan A₂ (TxA₂).

7 Abstract

Thrombo-occlusive disorders such as myocardial infarction or ischemic stroke result from pathophysiological platelet activation. Lipid metabolism and Ca^{2+} mobilization are key players in the complex orchestration of platelet adhesion, aggregation and thrombus formation. These cellular processes are in turn modulated by a wide variety of regulators like lipid-binding proteins or kinases. Investigating the action of these regulators not only deepens our knowledge about platelet signal transduction and function in general, but also aids to exploit new pharmacological targets for future antithrombotic therapy. Therefore, this work examined the effect of three proteins (namely Annexin A7, Niemann-Pick C1 protein and Casein Kinase 2 α) with distinct properties, but sharing the ability to impact lipid- and Ca^{2+} -dependent signal transduction during platelet activation in arterial thrombosis.

1. *Annexin A7 (ANXA7)*: Experiments revealed a blunted $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and a diminished platelet aggregation and secretion in *Anxa7*^{-/-} platelets after CLEC-2-mediated stimulation when compared with *Anxa7*^{+/+} platelets. Moreover, while *Anxa7*^{-/-} chimeric mice were protected against thrombotic vascular occlusion after FeCl_3 -induced injury, no prolongation of bleeding time was observed in these mice. Unaltered hemostasis was confirmed by the findings that neither thrombin generation nor prothrombin or activated partial thromboplastin time were significantly different between *Anxa7*-deficient mice and wildtype littermates. Next, the specificity of the ANXA7 inhibitor ABO was validated in a flow chamber approach using *Anxa7*^{-/-} and *Anxa7*^{+/+} mice. Lastly, whole blood from ABO-treated wildtype mice exhibited a reduced thrombus formation in vitro, whereas bleeding risk was not affected by treatment with ABO.

2. *Niemann-Pick C1 protein (NPC1)*: The results showed a decreased integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activation of *Npc1*^{Pf4 Δ /Pf4 Δ} platelets in response to thrombin or CRP, which was paralleled by diminished spreading on fibrinogen-coated surfaces. Furthermore, platelet secretion as reflected by P-selectin exposure and ATP release was reduced in *Npc1*-deficient platelets compared to platelets from *Npc1*^{lox/lox} mice. Both, collagen-dependent platelet aggregation and in vitro

thrombus formation were diminished in whole blood from *Npc1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* mice, but could be rescued by exogenous addition of ADP. In addition, *Npc1*-deficient platelets displayed increased levels of different sphingolipids and an impaired SERCA3-mediated Ca^{2+} mobilization, while neither total nor IP_3 -induced Ca^{2+} release were significantly altered. Finally, *Npc1*-deficient mice were protected against FeCl_3 -induced thrombotic occlusion in different vascular beds, whereas bleeding time and phosphatidylserine-dependent thrombin generation remained unaffected.

3. *Casein Kinase 2 α* (*CK2 α*): The quantitative analysis of the *CK2 α* -dependent phosphoproteome in resting platelets uncovered a diminished phosphorylation of the IP_3 receptor type 1 in *Csnk2 α 1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* mice. This finding was validated using western blotting and was accompanied by attenuated IP_3 -induced Ca^{2+} mobilization. Moreover, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase was reduced in *Csnk2 α 1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* platelets after stimulation with CRP or thrombin as compared to wildtype littermates. Functionally, flow cytometric analysis revealed abrogated P-selectin exposure and integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ activation in response to CRP, which was paralleled by decreased platelet spreading on fibrinogen-coated surfaces. In addition, platelet aggregation and secretion were impaired in *Csnk2 α 1*-deficient platelets as measured by luminescence aggregometry. In line with these results, both in vitro thrombus formation and FeCl_3 -induced vascular occlusion were defective in *Csnk2 α 1^{Pf4Δ/Pf4Δ}* mice. Nevertheless, these mice displayed no significant difference in their bleeding times in comparison to *Csnk2 α 1^{lox/lox}* mice.

The present work highlights that all three selected proteins are pivotal regulators of lipid- and Ca^{2+} -dependent platelet activation during thrombo-occlusive disorders and thus may reflect promising targets for novel antiplatelet therapies. However, further studies are required to verify the clinical significance of these findings.

8 Literaturverzeichnis

1. World health organization. Cardiovascular diseases (CVDs). 2021; [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)) [December 5, 2022].
2. Statistisches bundesamt (destatis). Todesursachenstatistik 2021. 2022; https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2022/12/PD22_544_23211.html [April 2, 2023].
3. Collaborators GBDV. Five insights from the global burden of disease study 2019. *Lancet (London, England)*. 2020;396:1135-1159
4. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. Idf diabetes atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract*. 2022;183:109119
5. Cecchini M, Vuik S. The heavy burden of obesity. OECD. 2019.
6. Gawaz M, Geisler T, Borst O. Current concepts and novel targets for antiplatelet therapy. *Nat Rev Cardiol*. 2023
7. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest*. 2005;115:3348-3354
8. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, Poliakov E, Sun M, Finton PJ, Curtis BR, Chen J, Zhang R, Silverstein RL, Hazen SL. Platelet cd36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med*. 2007;13:1086-1095
9. Shattil SJ, Anaya-Galindo R, Bennett J, Colman RW, Cooper RA. Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation. *J Clin Invest*. 1975;55:636-643
10. Jackson SP. Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nat Med*. 2011;17:1423-1436
11. Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007;109:5087-5095
12. Gawaz M, Vogel S. Platelets in tissue repair: Control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*. 2013;122:2550-2554
13. Koupenova M, Clancy L, Corkrey HA, Freedman JE. Circulating platelets as mediators of immunity, inflammation, and thrombosis. *Circ Res*. 2018;122:337-351
14. McFadyen JD, Stevens H, Peter K. The emerging threat of (micro)thrombosis in covid-19 and its therapeutic implications. *Circ Res*. 2020;127:571-587
15. Jackson SP, Darbousset R, Schoenwaelder SM. Thromboinflammation: Challenges of therapeutically targeting coagulation and other host defense mechanisms. *Blood*. 2019;133:906-918
16. McFadyen JD, Schaff M, Peter K. Current and future antiplatelet therapies: Emphasis on preserving haemostasis. *Nature Reviews Cardiology*. 2018;15:181-191
17. Clemetson KJ, Clemetson JM. 9 - platelet receptors. In: Michelson AD, ed. *Platelets (fourth edition)*. Academic Press; 2019:169-192.
18. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: Is gpvi the central receptor? *Blood*. 2003;102:449-461

19. Moroi M, Jung SM. Platelet glycoprotein vi: Its structure and function. *Thrombosis research*. 2004;114:221-233
20. Borst O, Gawaz M. Glycoprotein vi - novel target in antiplatelet medication. *Pharmacol Ther*. 2021;217:107630
21. Clemetson JM, Polgar J, Magnenat E, Wells TN, Clemetson KJ. 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;274:29019-29024
22. Gibbins J, Asselin J, Farndale R, Barnes M, Law CL, Watson SP. Tyrosine phosphorylation of the fc receptor gamma-chain in collagen-stimulated platelets. *J Biol Chem*. 1996;271:18095-18099
23. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein vi is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett*. 1997;413:255-259
24. Knight CG, Morton LF, Onley DJ, Peachey AR, Ichinohe T, Okuma M, Farndale RW, Barnes MJ. Collagen-platelet interaction: Gly-pro-hyp is uniquely specific for platelet gp vi and mediates platelet activation by collagen. *Cardiovasc Res*. 1999;41:450-457
25. Morton LF, Hargreaves PG, Farndale RW, Young RD, Barnes MJ. 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):337-344
26. Ungerer M, Rosport K, Bültmann A, Piechatzek R, Uhland K, Schlieper P, Gawaz M, Münch G. Novel antiplatelet drug revacept (dimeric glycoprotein vi-fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans. *Circulation*. 2011;123:1891-1899
27. Majithia A, Bhatt DL. Novel antiplatelet therapies for atherothrombotic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39:546-557
28. Mayer K, Hein-Rothweiler R, Schüpke S, et al. Efficacy and safety of revacept, a novel lesion-directed competitive antagonist to platelet glycoprotein vi, in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention for stable ischemic heart disease: The randomized, double-blind, placebo-controlled isar-plaster phase 2 trial. *JAMA Cardiol*. 2021;6:753-761
29. Watson SP, Herbert JM, Pollitt AY. Gpvi and clec-2 in hemostasis and vascular integrity. *J Thromb Haemost*. 2010;8:1456-1467
30. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ozaki Y. Novel platelet activation receptor clec-2: From discovery to prospects. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl 1:44-55
31. Rayes J, Watson SP, Nieswandt B. Functional significance of the platelet immune receptors gpvi and clec-2. *J Clin Invest*. 2019;129:12-23
32. Spalton JC, Mori J, Pollitt AY, Hughes CE, Eble JA, Watson SP. The novel syk inhibitor r406 reveals mechanistic differences in the initiation of gpvi and clec-2 signaling in platelets. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1192-1199

33. Manne BK, Badolia R, Dangelmaier C, Eble JA, Ellmeier W, Kahn M, Kunapuli SP. Distinct pathways regulate syk protein activation downstream of immune tyrosine activation motif (itam) and hemitam receptors in platelets. *J Biol Chem*. 2015;290:11557-11568
34. Suzuki-Inoue K, Fuller GL, García A, et al. A novel syk-dependent mechanism of platelet activation by the c-type lectin receptor clec-2. *Blood*. 2006;107:542-549
35. Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, Kaneko MK, Mishima K, Yatomi Y, Yamazaki Y, Narimatsu H, Ozaki Y. Involvement of the snake toxin receptor clec-2, in podoplanin-mediated platelet activation, by cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282:25993-26001
36. May F, Hagedorn I, Pleines I, Bender M, Vögtle T, Eble J, Elvers M, Nieswandt B. Clec-2 is an essential platelet-activating receptor in hemostasis and thrombosis. *Blood*. 2009;114:3464-3472
37. Suzuki-Inoue K, Inoue O, Ding G, Nishimura S, Hokamura K, Eto K, Kashiwagi H, Tomiyama Y, Yatomi Y, Umemura K, Shin Y, Hirashima M, Ozaki Y. Essential in vivo roles of the c-type lectin receptor clec-2: Embryonic/neonatal lethality of clec-2-deficient mice by blood/lymphatic misconnections and impaired thrombus formation of clec-2-deficient platelets. *J Biol Chem*. 2010;285:24494-24507
38. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407:258-264
39. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV, Jr., Tam C, Coughlin SR. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*. 1998;394:690-694
40. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64:1057-1068
41. Offermanns S. Activation of platelet function through g protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006;99:1293-1304
42. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. Par3 is a cofactor for par4 activation by thrombin. *Nature*. 2000;404:609-613
43. Morrow DA, Braunwald E, Bonaca MP, et al. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *New England Journal of Medicine*. 2012;366:1404-1413
44. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:517-529
45. Enyedi A, Sarkadi B, Földes-Papp Z, Monostory S, Gárdos G. Demonstration of two distinct calcium pumps in human platelet membrane vesicles. *J Biol Chem*. 1986;261:9558-9563
46. Cavallini L, Coassin M, Alexandre A. Two classes of agonist-sensitive ca²⁺ stores in platelets, as identified by their differential sensitivity to 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinone and thapsigargin. *Biochemical Journal*. 1995;310:449-452
47. Jardín I, López JJ, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Intracellular calcium release from human platelets: Different messengers for multiple stores. *Trends Cardiovasc Med*. 2008;18:57-61

48. Varga-Szabo D, Braun A, Nieswandt B. Calcium signaling in platelets. *J Thromb Haemost.* 2009;7:1057-1066
49. Münzer P, Borst O. Cracking the molecular regulatory mechanism of soce during platelet activation in thrombo-occlusive diseases. *Cells.* 2022;11
50. Wang Y, Li G, Goode J, Paz JC, Ouyang K, Screatton R, Fischer WH, Chen J, Tabas I, Montminy M. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature.* 2012;485:128-132
51. Taylor CW. Regulation of ip(3) receptors by cyclic amp. *Cell Calcium.* 2017;63:48-52
52. Grosse J, Braun A, Varga-Szabo D, et al. An ef hand mutation in stim1 causes premature platelet activation and bleeding in mice. *J Clin Invest.* 2007;117:3540-3550
53. Varga-Szabo D, Braun A, Kleinschnitz C, Bender M, Pleines I, Pham M, Renné T, Stoll G, Nieswandt B. The calcium sensor stim1 is an essential mediator of arterial thrombosis and ischemic brain infarction. *J Exp Med.* 2008;205:1583-1591
54. Braun A, Varga-Szabo D, Kleinschnitz C, Pleines I, Bender M, Austinat M, Bösl M, Stoll G, Nieswandt B. Orai1 (cracm1) is the platelet soc channel and essential for pathological thrombus formation. *Blood.* 2009;113:2056-2063
55. Tolhurst G, Carter RN, Amisten S, Holdich JP, Erlinge D, Mahaut-Smith MP. Expression profiling and electrophysiological studies suggest a major role for orai1 in the store-operated ca²⁺ influx pathway of platelets and megakaryocytes. *Platelets.* 2008;19:308-313
56. López JJ, Camello-Almaraz C, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Ca²⁺ accumulation into acidic organelles mediated by ca²⁺- and vacuolar h⁺-atpases in human platelets. *Biochem J.* 2005;390:243-252
57. López JJ, Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Rosado JA. Two distinct ca²⁺ compartments show differential sensitivity to thrombin, adp and vasopressin in human platelets. *Cell Signal.* 2006;18:373-381
58. Feng M, Elaïb Z, Borgel D, Denis CV, Adam F, Bryckaert M, Rosa J-P, Bobe R. Naadp/serca3-dependent ca²⁺ stores pathway specifically controls early autocrine adp secretion potentiating platelet activation. *Circulation Research.* 2020;127:e166-e183
59. Coxon CH, Lewis AM, Sadler AJ, Vasudevan SR, Thomas A, Dundas KA, Taylor L, Campbell RD, Gibbins JM, Churchill GC, Tucker KL. Naadp regulates human platelet function. *Biochem J.* 2012;441:435-442
60. Mushtaq M, Nam TS, Kim UH. Critical role for cd38-mediated ca²⁺ signaling in thrombin-induced procoagulant activity of mouse platelets and hemostasis. *J Biol Chem.* 2011;286:12952-12958
61. Elaïb Z, Adam F, Berrou E, Bordet JC, Prévost N, Bobe R, Bryckaert M, Rosa JP. Full activation of mouse platelets requires adp secretion regulated by serca3 atpase-dependent calcium stores. *Blood.* 2016;128:1129-1138
62. Knight DE, Scrutton MC. Direct evidence for a role for ca²⁺ in amine storage granule secretion by human platelets. *Thrombosis research.* 1980;20:437-446

63. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29:153-162
64. H Holmsen a, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Annual Review of Medicine.* 1979;30:119-134
65. Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, White JG, Gahl WA. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry. *J Thromb Haemost.* 2007;5:1945-1955
66. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: As diverse as the granules ... or not? *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2015;13:2141-2151
67. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: Structure, function and implications for haemostasis. *Thrombosis research.* 1999;95:1-18
68. May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: Inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:s5-10
69. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673-687
70. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:403-412
71. Sims PJ, Ginsberg MH, Plow EF, Shattil SJ. Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein iib-iiia complex*. *Journal of Biological Chemistry.* 1991;266:7345-7352
72. O'Toole TE, Loftus JC, Du XP, Glass AA, Ruggeri ZM, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH. Affinity modulation of the alpha iib beta 3 integrin (platelet gpiib-iiia) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul.* 1990;1:883-893
73. Peterson DM, Stathopoulos NA, Giorgio TD, Hellums JD, Moake JL. Shear-induced platelet aggregation requires von willebrand factor and platelet membrane glycoproteins ib and iib-iiia. *Blood.* 1987;69:625-628
74. Peerschke EI, Zucker MB, Grant RA, Egan JJ, Johnson MM. Correlation between fibrinogen binding to human platelets and platelet aggregability. *Blood.* 1980;55:841-847
75. Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium in platelets deficient in glycoproteins iib-iiia, ib, and storage granules. *Blood.* 1986;67:322-330
76. Hartwig JH, Kung S, Kovacsovics T, Janmey PA, Cantley LC, Stossel TP, Toker A. D3 phosphoinositides and outside-in integrin signaling by glycoprotein iib-iiia mediate platelet actin assembly and filopodial extension induced by phorbol 12-myristate 13-acetate*. *Journal of Biological Chemistry.* 1996;271:32986-32993
77. Nurden AT, Caen JP. An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol.* 1974;28:253-260
78. Phillips DR, Agin PP. Platelet membrane defects in glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins. *J Clin Invest.* 1977;60:535-545
79. Agbani EO, Poole AW. Procoagulant platelets: Generation, function, and therapeutic targeting in thrombosis. *Blood.* 2017;130:2171-2179
80. Fager AM, Wood JP, Bouchard BA, Feng P, Tracy PB. Properties of procoagulant platelets: Defining and characterizing the subpopulation

- binding a functional prothrombinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:2400-2407
81. Thiagarajan P, Tait JF. Binding of annexin v/placental anticoagulant protein i to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem.* 1990;265:17420-17423
 82. Papahadjopoulos D, Hanahan DJ. Observations on the interaction of phospholipids and certain clotting factors in prothrombin activator formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1964;90:436-439
 83. Rittenhouse-Simmons S, Russell FA, Deykin D. Mobilization of arachidonic acid in human platelets. Kinetics and ca^{2+} dependency. *Biochimica et biophysica acta.* 1977;488:370-380
 84. Badimon L, Vilahur G, Rocca B, Patrono C. The key contribution of platelet and vascular arachidonic acid metabolism to the pathophysiology of atherothrombosis. *Cardiovasc Res.* 2021;117:2001-2015
 85. Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001;294:1871-1875
 86. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: A new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1975;72:2994-2998
 87. Samuelsson B, Goldyne M, Granström E, Hamberg M, Hammarström S, Malmsten C. Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem.* 1978;47:997-1029
 88. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002;324:71-86
 89. Manke MC, Ahrends R, Borst O. Platelet lipid metabolism in vascular thrombo-inflammation. *Pharmacol Ther.* 2022;237:108258
 90. Peng B, Geue S, Coman C, Münzer P, Kopczynski D, Has C, Hoffmann N, Manke MC, Lang F, Sickmann A, Gawaz M, Borst O, Ahrends R. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome. *Blood.* 2018;132:e1-e12
 91. Manke MC, Geue S, Coman C, et al. Anxa7 regulates platelet lipid metabolism and $ca^{(2+)}$ release in arterial thrombosis. *Circ Res.* 2021;129:494-507
 92. O'Donnell VB, Murphy RC, Watson SP. Platelet lipidomics: Modern day perspective on lipid discovery and characterization in platelets. *Circ Res.* 2014;114:1185-1203
 93. Slatter DA, Aldrovandi M, O'Connor A, Allen SM, Brasher CJ, Murphy RC, Mecklemann S, Ravi S, Darley-Usmar V, O'Donnell VB. Mapping the human platelet lipidome reveals cytosolic phospholipase a2 as a regulator of mitochondrial bioenergetics during activation. *Cell Metab.* 2016;23:930-944
 94. Cheung HYF, Coman C, Westhoff P, Manke M, Sickmann A, Borst O, Gawaz M, Watson SP, Heemskerk JWM, Ahrends R. Targeted phosphoinositides analysis using high-performance ion chromatography-

- coupled selected reaction monitoring mass spectrometry. *J Proteome Res.* 2021;20:3114-3123
95. Li P, Lämmerhofer M. Isomer selective comprehensive lipidomics analysis of phosphoinositides in biological samples by liquid chromatography with data independent acquisition tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2021;93:9583-9592
 96. Cebo M, Dittrich K, Fu X, et al. Platelet ackr3/cxcr7 favors antiplatelet lipids over an atherothrombotic lipidome and regulates thromboinflammation. *Blood.* 2022;139:1722-1742
 97. Herr C, Smyth N, Ullrich S, Yun F, Sasse P, Hescheler J, Fleischmann B, Lasek K, Brixius K, Schwinger RH, Fassler R, Schroder R, Noegel AA. Loss of annexin a7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Mol Cell Biol.* 2001;21:4119-4128
 98. Elrick MJ, Pacheco CD, Yu T, Dadgar N, Shakkottai VG, Ware C, Paulson HL, Lieberman AP. Conditional niemann-pick c mice demonstrate cell autonomous purkinje cell neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* 2010;19:837-847
 99. Rebholz H, Zhou M, Nairn AC, Greengard P, Flajolet M. Selective knockout of the casein kinase 2 in d1 medium spiny neurons controls dopaminergic function. *Biol Psychiatry.* 2013;74:113-121
 100. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood.* 2007;109:1503-1506
 101. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440-3450
 102. Westrick RJ, Winn ME, Eitzman DT. Murine models of vascular thrombosis (eitzman series). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2079-2093
 103. Gerke V, Moss SE. Annexins: From structure to function. *Physiol Rev.* 2002;82:331-371
 104. Srivastava M, Atwater I, Glasman M, Leighton X, Goping G, Caohuy H, Miller G, Pichel J, Westphal H, Mears D, Rojas E, Pollard HB. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, ca⁽²⁺⁾ signaling, and insulin secretion in the anx7(+/-) knockout mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:13783-13788
 105. Herr C, Clemen CS, Lehnert G, Kutschkow R, Picker SM, Gathof BS, Zamparelli C, Schleicher M, Noegel AA. Function, expression and localization of annexin a7 in platelets and red blood cells: Insights derived from an annexin a7 mutant mouse. *BMC Biochem.* 2003;4:8
 106. Lang E, Lang PA, Shumilina E, et al. Enhanced eryptosis of erythrocytes from gene-targeted mice lacking annexin a7. *Pflugers Archiv : European journal of physiology.* 2010;460:667-676
 107. Clemen CS, Herr C, Hövelmeyer N, Noegel AA. The lack of annexin a7 affects functions of primary astrocytes. *Exp Cell Res.* 2003;291:406-414
 108. Jiao PF, Zhao BX, Wang WW, He QX, Wan MS, Shin DS, Miao JY. Design, synthesis, and preliminary biological evaluation of 2,3-dihydro-3-hydroxymethyl-1,4-benzoxazine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:2862-2867

109. Wang L, Dong Z, Huang B, Zhao B, Wang H, Zhao J, Kung H, Zhang S, Miao J. Distinct patterns of autophagy evoked by two benzoxazine derivatives in vascular endothelial cells. *Autophagy*. 2010;6:1115-1124
110. Li H, Liu N, Wang S, Wang L, Zhao J, Su L, Zhang Y, Zhang S, Xu Z, Zhao B, Miao J. Identification of a small molecule targeting annexin a7. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833:2092-2099
111. Li H, Huang S, Wang S, Zhao J, Su L, Zhao B, Zhang Y, Zhang S, Miao J. Targeting annexin a7 by a small molecule suppressed the activity of phosphatidylcholine-specific phospholipase c in vascular endothelial cells and inhibited atherosclerosis in apolipoprotein e^{-/-} mice. *Cell Death Dis*. 2013;4:e806
112. Bender M, Hagedorn I, Nieswandt B. Genetic and antibody-induced glycoprotein vi deficiency equally protects mice from mechanically and fecl(3) -induced thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011;9:1423-1426
113. Adili R, Tourdot BE, Mast K, Yeung J, Freedman JC, Green A, Luci DK, Jadhav A, Simeonov A, Maloney DJ, Holman TR, Holinstat M. First selective 12-lox inhibitor, ml355, impairs thrombus formation and vessel occlusion in vivo with minimal effects on hemostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:1828-1839
114. Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, Ruggeri ZM, Ware J. The contribution of glycoprotein vi to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood*. 2003;102:1701-1707
115. Liu X, Zhao J, Xu J, Zhao B, Zhang Y, Zhang S, Miao J. Protective effects of a benzoxazine derivative against oxidized ldl-induced apoptosis and the increases of integrin beta4, ros, nf-kappab and p53 in human umbilical vein endothelial cells. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009;19:2896-2900
116. Kwon HJ, Abi-Mosleh L, Wang ML, Deisenhofer J, Goldstein JL, Brown MS, Infante RE. Structure of n-terminal domain of npc1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell*. 2009;137:1213-1224
117. Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ, Dawidowicz EA. The np-c gene: A key to pathways of intracellular cholesterol transport. *Trends Cell Biol*. 1994;4:365-369
118. Davies JP, Ioannou YA. Topological analysis of niemann-pick c1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J Biol Chem*. 2000;275:24367-24374
119. Qian H, Wu X, Du X, Yao X, Zhao X, Lee J, Yang H, Yan N. Structural basis of low-ph-dependent lysosomal cholesterol egress by npc1 and npc2. *Cell*. 2020;182:98-111.e118
120. Vanier MT. Complex lipid trafficking in niemann-pick disease type c. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2015;38:187-199
121. Chen OCW, Colaco A, Davis LC, Kiskin FN, Farhat NY, Speak AO, Smith DA, Morris L, Eden E, Tynan P, Churchill GC, Galione A, Porter FD, Platt FM. Defective platelet function in niemann-pick disease type c1. *JIMD Rep*. 2020;56:46-57

122. Louwette S, Régál L, Wittevrongel C, Thys C, Vandeweeghde G, Decuyper E, Leemans P, De Vos R, Van Geet C, Jaeken J, Freson K. Npc1 defect results in abnormal platelet formation and function: Studies in niemann-pick disease type c1 patients and zebrafish. *Hum Mol Genet.* 2013;22:61-73
123. Newton J, Milstien S, Spiegel S. Niemann-pick type c disease: The atypical sphingolipidosis. *Adv Biol Regul.* 2018;70:82-88
124. Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A, Platt FM. Niemann-pick disease type c1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat Med.* 2008;14:1247-1255
125. Rodriguez-Gil JL, Watkins-Chow DE, Baxter LL, et al. Genetic background modifies phenotypic severity and longevity in a mouse model of niemann-pick disease type c1. *Dis Model Mech.* 2020;13
126. Lloyd-Evans E, Platt FM. Lipids on trial: The search for the offending metabolite in niemann-pick type c disease. *Traffic.* 2010;11:419-428
127. Manke MC, Roslan A, Walker B, et al. Niemann-pick c1 protein regulates platelet membrane-associated calcium ion signaling in thrombo-occlusive diseases in mice. *J Thromb Haemost.* 2023
128. Benaim G, Pimentel AA, Felibertt P, Mayora A, Colman L, Sojo F, Rojas H, De Sanctis JB. Sphingosine inhibits the sarco(endo)plasmic reticulum ca(2+)-atpase (serca) activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;473:572-577
129. Colina C, Cervino V, Benaim G. Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane ca2+-atpase from human erythrocytes. *Biochem J.* 2002;362:247-251
130. Pandol SJ, Schoeffield-Payne MS, Gukovskaya AS, Rutherford RE. Sphingosine regulates ca(2+)-atpase and reloading of intracellular ca2+ stores in the pancreatic acinar cell. *Biochimica et biophysica acta.* 1994;1195:45-50
131. Davidson SM, Foote K, Kunuthur S, Gosain R, Tan N, Tyser R, Zhao YJ, Graeff R, Ganesan A, Duchon MR, Patel S, Yellon DM. Inhibition of naadp signalling on reperfusion protects the heart by preventing lethal calcium oscillations via two-pore channel 1 and opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 2015;108:357-366
132. Harm T, Bild A, Dittrich K, Goldschmied A, Nestele J, Chatterjee M, Fu X, Kolb K, Castor T, Borst O, Geisler T, Rath D, Lämmerhofer M, Gawaz M. Acute coronary syndrome is associated with a substantial change in the platelet lipidome. *Cardiovasc Res.* 2022;118:1904-1916
133. Chatterjee M, Rath D, Schlotterbeck J, Rheinlaender J, Walker-Allgaier B, Alnaggar N, Zdanyte M, Müller I, Borst O, Geisler T, Schäffer TE, Lämmerhofer M, Gawaz M. Regulation of oxidized platelet lipidome: Implications for coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2017;38:1993-2005
134. Vanier MT. Niemann-pick disease type c. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:16
135. Litchfield DW. Protein kinase ck2: Structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem J.* 2003;369:1-15

136. Niefind K, Guerra B, Ermakowa I, Issinger OG. Crystal structure of human protein kinase ck2: Insights into basic properties of the ck2 holoenzyme. *Embo j.* 2001;20:5320-5331
137. Meggio F, Boldyreff B, Marin O, Pinna LA, Issinger OG. Role of the beta subunit of casein kinase-2 on the stability and specificity of the recombinant reconstituted holoenzyme. *Eur J Biochem.* 1992;204:293-297
138. Sarno S, Ghisellini P, Pinna LA. Unique activation mechanism of protein kinase ck2. The n-terminal segment is essential for constitutive activity of the catalytic subunit but not of the holoenzyme. *J Biol Chem.* 2002;277:22509-22514
139. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347:1260419
140. Lozeman FJ, Litchfield DW, Piening C, Takio K, Walsh KA, Krebs EG. Isolation and characterization of human cdna clones encoding the alpha and the alpha' subunits of casein kinase ii. *Biochemistry.* 1990;29:8436-8447
141. Meggio F, Pinna LA. One-thousand-and-one substrates of protein kinase ck2? *Faseb j.* 2003;17:349-368
142. Borgo C, D'Amore C, Sarno S, Salvi M, Ruzzene M. Protein kinase ck2: A potential therapeutic target for diverse human diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6:183
143. Yamada M, Katsuma S, Adachi T, et al. Inhibition of protein kinase ck2 prevents the progression of glomerulonephritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102:7736-7741
144. Canton DA, Litchfield DW. The shape of things to come: An emerging role for protein kinase ck2 in the regulation of cell morphology and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 2006;18:267-275
145. Pierre F, Chua PC, O'Brien SE, et al. Discovery and sar of 5-(3-chlorophenylamino)benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid (cx-4945), the first clinical stage inhibitor of protein kinase ck2 for the treatment of cancer. *J Med Chem.* 2011;54:635-654
146. Perea SE, Baladrón I, Valenzuela C, Perera Y. Cigb-300: A peptide-based drug that impairs the protein kinase ck2-mediated phosphorylation. *Semin Oncol.* 2018;45:58-67
147. Hoyt CH, Oh CJ, Beekman JB, Litchfield DW, Lerea KM. Identifying and characterizing casein kinase ii in human platelets. *Blood.* 1994;83:3517-3523
148. Ampofo E, Schmitt BM, Laschke MW, Menger MD. Function of protein kinase ck2 in thrombus formation. *Platelets.* 2019;30:421-427
149. Münzer P, Walker-Allgaier B, Geue S, et al. Ck2β regulates thrombopoiesis and ca(2+)-triggered platelet activation in arterial thrombosis. *Blood.* 2017;130:2774-2785
150. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun.* 2019;10:1523

151. Salvi M, Cesaro L, Pinna LA. Variable contribution of protein kinases to the generation of the human phosphoproteome: A global weblogo analysis. *2010*;1:185-195
152. Ruzzene M, Tosoni K, Zanin S, Cesaro L, Pinna LA. Protein kinase ck2 accumulation in "oncophilic" cells: Causes and effects. *Mol Cell Biochem.* 2011;356:5-10
153. Lou DY, Dominguez I, Toselli P, Landesman-Bollag E, O'Brien C, Seldin DC. The alpha catalytic subunit of protein kinase ck2 is required for mouse embryonic development. *Mol Cell Biol.* 2008;28:131-139
154. Buchou T, Vernet M, Blond O, Jensen HH, Pointu H, Olsen BB, Cochet C, Issinger OG, Boldyreff B. Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase ck2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality. *Mol Cell Biol.* 2003;23:908-915
155. Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC. Globozoospermia in mice lacking the casein kinase ii alpha' catalytic subunit. *Nat Genet.* 1999;23:118-121
156. Zhang C, Vilc G, Canton DA, Litchfield DW. Phosphorylation regulates the stability of the regulatory ck2beta subunit. *Oncogene.* 2002;21:3754-3764
157. Borad MJ, Bai L-Y, Chen M-H, et al. Silmitasertib (cx-4945) in combination with gemcitabine and cisplatin as first-line treatment for patients with locally advanced or metastatic cholangiocarcinoma: A phase ib/ii study. *Journal of Clinical Oncology.* 2021;39:312-312
158. Gyenis L, Menyhart D, Cruise ES, et al. Chemical genetic validation of csnk2 substrates using an inhibitor-resistant mutant in combination with triple silac quantitative phosphoproteomics. *Frontiers in Molecular Biosciences.* 2022;9
159. Woll KA, Van Petegem F. Calcium-release channels: Structure and function of ip(3) receptors and ryanodine receptors. *Physiol Rev.* 2022;102:209-268
160. Ferris CD, Cameron AM, Bredt DS, Haganir RL, Snyder SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is phosphorylated by cyclic amp-dependent protein kinase at serines 1755 and 1589. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175:192-198
161. St-Denis N, Gabriel M, Turowec JP, Gloor GB, Li SS, Gingras AC, Litchfield DW. Systematic investigation of hierarchical phosphorylation by protein kinase ck2. *J Proteomics.* 2015;118:49-62
162. Nakanishi K, Toyoda H, Tanaka S, Yamamoto H, Komada Y, Gabazza EC, Hayashi T, Suzuki K, Ido M. Phosphoinositide 3-kinase induced activation and cytoskeletal translocation of protein kinase ck2 in protease activated receptor 1-stimulated platelets. *Thrombosis research.* 2010;126:511-516
163. Ryu SY, Kim S. Evaluation of ck2 inhibitor (e)-3-(2,3,4,5-tetrabromophenyl)acrylic acid (tbca) in regulation of platelet function. *Eur J Pharmacol.* 2013;720:391-400
164. Ampofo E, Müller I, Dahmke IN, Eichler H, Montenarh M, Menger MD, Laschke MW. Role of protein kinase ck2 in the dynamic interaction of platelets, leukocytes and endothelial cells during thrombus formation. *Thrombosis research.* 2015;136:996-1006

165. Zhou H, Zhu P, Wang J, Zhu H, Ren J, Chen Y. Pathogenesis of cardiac ischemia reperfusion injury is associated with ck2 α -disturbed mitochondrial homeostasis via suppression of fundc1-related mitophagy. *Cell Death Differ.* 2018;25:1080-1093
166. Bastian C, Quinn J, Tripathi A, Aquila D, McCray A, Dutta R, Baltan S, Brunet S. Ck2 inhibition confers functional protection to young and aging axons against ischemia by differentially regulating the cdk5 and akt signaling pathways. *Neurobiol Dis.* 2019;126:47-61
167. Ka SO, Hwang HP, Jang JH, Hyuk Bang I, Bae UJ, Yu HC, Cho BH, Park BH. The protein kinase 2 inhibitor tetrabromobenzotriazole protects against renal ischemia reperfusion injury. *Sci Rep.* 2015;5:14816

9 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Neue Mechanismen zur Regulation des thrombozytären Lipidmetabolismus und der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion im Rahmen arterieller Thrombosen“ selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Zitate als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe.

Die Arbeit wurde von Juli 2017 bis Mai 2023 in der Medizinischen Klinik (Innere Medizin III, Kardiologie und Angiologie) des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Oliver Borst und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Peter Ruth durchgeführt.

Der Großteil an Daten wurde von mir erhoben und deren statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich. Das Spreading und die in vitro Thrombusbildung wurden von Herrn Dr. rer. nat. Patrick Münzer, Herrn Dr. rer. nat. Sascha Geue oder Herrn Ferdinand Kollotzek untersucht und zur Verfügung gestellt. Die in vivo Thrombusbildung im Rahmen des NPC1-Projektes wurde von Frau Dr. rer. nat. Britta Walker untersucht. Western Blots und RT-PCRs wurden mit Unterstützung durch Frau Daniela Eißler durchgeführt. Thrombozytäre Lipide wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. rer. nat. Robert Ahrends und dessen Arbeitsgruppe quantitativ analysiert.

Tübingen, den 15. Mai 2023

Mailin-Christin Manke

10 Veröffentlichungen

1. de Jonckheere B, Kollotzek F, Münzer P, Göb V, Fischer M, Mott K, Coman C, Troppmair NN, Manke MC, Zdanyte M, Harm T, Sigle M, Kopczynski D, Bileck A, Gerner C, Hoffmann N, Heinzmann D, Assinger A, Gawaz M, Stegner D, Schulze H, Borst O, Ahrends R. Critical shifts in lipid metabolism promote megakaryocyte differentiation and proplatelet formation. **Nat Cardiovasc Res.** 2023 Sep;2:835-852.
2. Manke MC, Roslan A, Walker B, Münzer P, Kollotzek F, Peng B, Mencl S, Coman C, Szepanowski RD, Schulze H, Lieberman AP, Lang F, Gawaz M, Kleinschnitz C, Lukowski R, Ahrends R, Bobe R, Borst O. Niemann-Pick C1 protein regulates platelet membrane-associated calcium ion signaling in thrombo-occlusive diseases in mice. **J Thromb Haemost.** 2023 Apr 11:S1538-7836(23)00272-6.
3. Schütte JP, Manke MC, Hemmen K, Münzer P, Schörg BF, Ramos GC, Pogoda M, Dicenta V, Hoffmann SHL, Pinnecker J, Kollotzek F, Zdanyte M, Mueller KAL, Singh Y, Mack AF, Pichler B, Lang F, Nieswandt B, Gawaz M, Heinze KG, Casadei N, Borst O. Platelet-Derived MicroRNAs Regulate Cardiac Remodeling After Myocardial Ischemia. **Circ Res.** 2023 Mar 31;132(7):e96-e113.
4. Manke MC, Ahrends R, Borst O. Platelet lipid metabolism in vascular thrombo-inflammation. **Pharmacol Ther.** 2022 Sep;237:108258.
5. Rohlfing AK, Kolb K, Sigle M, Ziegler M, Bild A, Münzer P, Sudmann J, Dicenta V, Harm T, Manke MC, Geue S, Kremser M, Chatterjee M, Liang C, von Eysmond H, Dandekar T, Heinzmann D, Günter M, von Ungern-Sternberg S, Büttcher M, Castor T, Mencl S, Langhauser F, Sies K, Ashour D, Beker MC, Lämmerhofer M, Autenrieth SE, Schäffer TE, Laufer S, Szklanna P, Maguire P, Heikenwalder M, Müller KAL, Hermann DM, Kilic E, Stumm R, Ramos G, Kleinschnitz C, Borst O, Langer HF, Rath D, Gawaz M. ACKR3 regulates platelet activation and ischemia-reperfusion tissue injury. **Nat Commun.** 2022 Apr 5;13(1):1823.
6. Cebo M, Dittrich K, Fu X, Manke MC, Emschermann F, Rheinlaender J, von Eysmond H, Ferreirós N, Sudman J, Witte A, Pelzl L, Borst O, Geisler T, Rath D, Bakchoul T, Gawaz M, Schäffer TE, Lämmerhofer M, Chatterjee M. Platelet ACKR3/CXCR7 favors antiplatelet lipids over an atherothrombotic lipidome and regulates thromboinflammation. **Blood.** 2022 Mar 17;139(11):1722-1742.
7. Manke MC*, Geue S*, Coman C, Peng B, Kollotzek F, Münzer P, Walker B, Huber SM, Rath D, Sickmann A, Stegner D, Duerschmied D, Lang F, Nieswandt B, Gawaz M, Ahrends R, Borst O. ANXA7 Regulates Platelet Lipid Metabolism and Ca²⁺ Release in Arterial Thrombosis. **Circ Res.** 2021 Aug 6;129(4):494-507.
8. Cheung HYF, Coman C, Westhoff P, Manke M, Sickmann A, Borst O, Gawaz M, Watson SP, Heemskerk JWM, Ahrends R. Targeted Phosphoinositides Analysis Using High-Performance Ion Chromatography-Coupled Selected Reaction Monitoring Mass Spectrometry. **J Proteome Res.** 2021 Jun 4;20(6):3114-3123.
9. Peng B, Kopczynski D, Pratt BS, Ejsing CS, Burla B, Hermansson M, Benke PI, Tan SH, Chan MY, Torta F, Schwudke D, Meckelmann SW, Coman C,

- Schmitz OJ, MacLean B, Manke MC, Borst O, Wenk MR, Hoffmann N, Ahrends R. LipidCreator workbench to probe the lipidomic landscape. **Nat Commun.** 2020 Apr 28;11(1):2057.
10. Geue S, Aurbach K, Manke MC, Manukjan G, Münzer P, Stegner D, Brähler C, Walker-Allgaier B, Märklin M, Borst CE, Quintanilla-Fend L, Rath D, Geisler T, Salih HR, Seizer P, Lang F, Nieswandt B, Gawaz M, Schulze H, Pleines I, Borst O. Pivotal role of PDK1 in megakaryocyte cytoskeletal dynamics and polarization during platelet biogenesis. **Blood.** 2019 Nov 21;134(21):1847-1858.
 11. Peng B, Geue S, Coman C, Münzer P, Kopczynski D, Has C, Hoffmann N, Manke MC, Lang F, Sickmann A, Gawaz M, Borst O, Ahrends R. Identification of key lipids critical for platelet activation by comprehensive analysis of the platelet lipidome. **Blood.** 2018 Aug 2;132(5):e1-e12.
 12. Münzer P, Mittelstädt S, Geue S, Manke MC, Walker-Allgaier B, Lang F, Gawaz M, Borst O. Ceramidase critically affects GPVI-dependent platelet activation and thrombus formation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2018 Feb 12;496(3):792-798.

* *shared first-authorship*