

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

**Bedeutung von Hämin auf die differentielle
Thrombozyten Granula Degranulation**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Pelzer, Andreas

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz
2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Philipp

Tag der Disputation: 16.12.2025

Widmung:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1. <i>Thrombozyten und ihre Funktion bei der Hämostase</i>	4
1.1.1. <i>Thrombozytengranula im Überblick</i>	6
1.1.1.1. <i>Alpha-Granula</i>	6
1.1.1.2. <i>Delta-Granula</i>	6
1.1.1.3. <i>Lysosomen</i>	7
1.2. <i>Pathophysiologie von Hämin bei kardiovaskulären Erkrankungen</i>	7
1.3. <i>P-Selektin fungiert in der Thrombusformation</i>	8
1.4. <i>CD63 als Marker der lysosomalen Granula Degranulation</i>	8
1.5. <i>Furins vielfältige Physiologie im Thrombozyten</i>	9
2. Material und Methoden	11
2.1. <i>Verwendete Reagenzien und Geräte</i>	11
2.2. <i>Auswahl der Spender</i>	14
2.3. <i>Thrombozytenisolation</i>	14
2.4. <i>Verwendete Lösungsmittel und Solvensbehandlung</i>	15
2.5. <i>Durchflusszytometrie</i>	16
2.6. <i>Aggregometrie</i>	17
2.7. <i>Fluoreszenzmikroskopie</i>	18
2.8. <i>Statistik und grafische Darstellung</i>	20
3. Ergebnis	21
3.1. <i>Stimulatorwirkungen auf die Thrombozytendegranulation</i>	21
3.1.1. <i>Vergleich der Wirkung auf die Alpha-Granula Degranulation</i>	21
3.1.2. <i>Vergleich der Wirkung auf die lysosomale Degranulation</i>	24
3.1.3. <i>Quantifizierung des LysoTracker mittels Durchflusszytometrie</i>	30

3.2. Vergleich der Aggregationswirkung	31
3.3. Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition	32
3.3.1. Phospholipase A2 Einfluss auf die Alpha-Granula Degranulation	32
3.3.2. Einfluss der Phospholipase A2 auf die Aggregationsfähigkeit	33
3.3.3. Einfluss der Phospholipase A2 auf die lysosomale Granula Degranulation	37
3.4. Einfluss der Furininhibition	38
3.4.1. Einfluss der Furininhibition auf die Alpha-Granula Degranulierung	38
3.4.2. Furinwirkung auf Thrombozytenaggregation	43
3.4.3. Lysosomale Granula Degranulation unter Furininhibition	48
3.4.4. Visuelle Darstellung des Furineinflusses auf die Lysosomenzahl	53
3.4.5. Furinexpression unter Stimulation	58
4. Diskussion	59
4.1. Allgemeine Diskussion der verwendeten Methodik	59
4.2. Furineinfluss auf die Alpha-Granula Degranulation ist häminspezifisch	62
4.3. Einfluss von Furin auf die Plättchenfunktionalität	64
4.4. Furin aktiviert die Phospholipase A2 und beeinflusst die Plättchenfunktionalität	65
4.5. Hämininduzierte lysosomale Granula Degranulation ist furinabhängig	66
4.6. Klinischer Bezug der Ergebnisse	69
4.6.1. Beispiel der Hämolyse	69
4.6.2. Beispiel des Storage-Pool-Disease	70
4.7. Conclusio und Schlussfolgerung der Dissertation	71
5. Zusammenfassung	72
6. Anhang und Literaturangaben	74
6.1. Pufferzusammensetzungen	74
6.2. Abbildungsverzeichnis	76
6.3. Eigenanteil des Promovierenden	78
6.4. Veröffentlichung im Zusammenhang mit der Dissertation	79
6.5. Danksagung	80
6.6. Bibliografie	81

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACD	Acid Citrate Dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Albumin Fraction V
CD62P	Cluster of Differentiation 62 (P Selektin)
CD63	Cluster of Differentiation 63
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2
COX	Cyclooxygenase
CRP	Collagen Related Peptide
DIC	Differenzial Interferenz Kontrast
D6R	Hexa D Arginin / Furin Inhibitor 2
FACS	Fluoreszenz Activated Cell Sorting
GP	Glykoprotein
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenz
LAMP-3	Lysosome Associated Membrane Protein 3 (CD63)
MFI	Mean Fluoreszenz Intensity
ml	Milliliter
ns	Nicht signifikant
PAR-1	Proteaseaktivierter Rezeptor 1

Abkürzung	Bedeutung
PBS	Phosphat Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PPP	Platelet Poor Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL1	P Selektin Glykoprotein Ligand
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SYK	Spleen Tyrosine Kinase
TLR4	Toll Like Rezeptor 4
TRAP	Thrombin Receptor Activating Peptide
vWF	Von-Willebrand-Faktor
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
µm	Mikrometer

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis	2
Tabelle 2: Marker und Inhibitoren	11
Tabelle 3: Verwendete Hardware und Software	11
Tabelle 4: Analysesoftware	12
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien	13
Tabelle 6: Substanz und Solvenz	15
Tabelle 7: Beispiel des Pipettierschema zur FACS - Probenbehandlung	16
Tabelle 8: Beispiel des Pipettierschema der Aggregometrie	18
Tabelle 9: Pipettierschema Fluoreszenzmikroskopie.....	19

Tabelle 10: ACD Puffer	74
Tabelle 11: TYRODES Inhalt	75
Tabelle 12: TYRODES 10x	75

1. Einleitung

1.1. Thrombozyten und ihre Funktion bei der Hämostase

Deutschland als Industrienation verzeichnet seit langem einen kontinuierlichen Anstieg der Lebenserwartung [1]. Die häufigste Todesursache einer demographisch alternden Bevölkerung in Deutschland im Jahr 2020 waren Herz-Kreislauf-Erkrankungen, darunter insbesondere ischämische Herzerkrankungen, die für rund ein Drittel der Todesfälle in Deutschland verantwortlich waren [2]. Pathophysiologisch ist diese Gruppe von Erkrankungen meist auf die akute Bildung eines Thrombus in zum Beispiel atherosklerotisch veränderten, herzversorgenden Gefäßen zurückzuführen. Diese Thrombusformation ist letztlich auf eine defekte Endothelbarriere zwischen den Thrombozyten in der Blutbahn und der extrazellulären Matrix zurückzuführen [3]. Die sowohl direkte als auch auto- und parakrine Interaktion [4] zwischen Thrombozyten untereinander, aber auch mit Leukozyten und Endothelzellen, ist für diese Pathophysiologie maßgeblich [4-6].

Thrombozyten sind kleine, kernlose Zellen, die als Zytosolabschnürungen eines Megakaryozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn gelangen [3]. Um ihre Funktionen ausführen zu können, interagieren Thrombozyten über Oberflächenrezeptoren untereinander und mit anderen Zellen. Wichtige Vertreter sind der Kollagenrezeptor GPVI [7], der von Willebrand Faktor Rezeptor GPIIb/IX/V [3], CD62P als wichtiges Adhäsionsmolekül [8] und CD63 als genereller Marker für die Aktivierung des Thrombozyten und Marker der lysosomalen Granula Degranulation [9, 10].

Diese Interaktionen sind initial verantwortlich für die physiologische Thrombusformation [4] und steuern letztlich die zentralen Funktionen der

Thrombozyten wie Hämostase, [4] Induktion einer Entzündung [4, 11] und Immunität [12].

Um Thrombozyten zu aktivieren, stehen verschiedene rezeptorvermittelte Optionen zur Verfügung, die physiologisch die Hämostase initiieren. Dazu gehören unter anderem Kollagene, Hämin, Thrombin und ADP. Im experimentellen Rahmen werden daher folgende Stimulatoren verwendet: CRP (*Collagen - Related - Peptide*) [13-15], ein dem Kollagen nachempfundenes Peptid, welches an den Rezeptor GPVI bindet [16], ADP (*Adenosindiphosphat*) [17], welches an P2Y₁ und P2Y₁₂ bindet [18, 19], Thrombin und TRAP (*Thrombinreceptor-Activation-Peptide*), welches an PAR-1 und PAR-2 bindet [19-22]. Die funktionelle Betrachtung erfolgt in dieser Dissertation differenziell zum Thrombozytenaktivator Hämin [23] als Agonist für GPVI, TLR4 [24] und CLEC-2 [25].

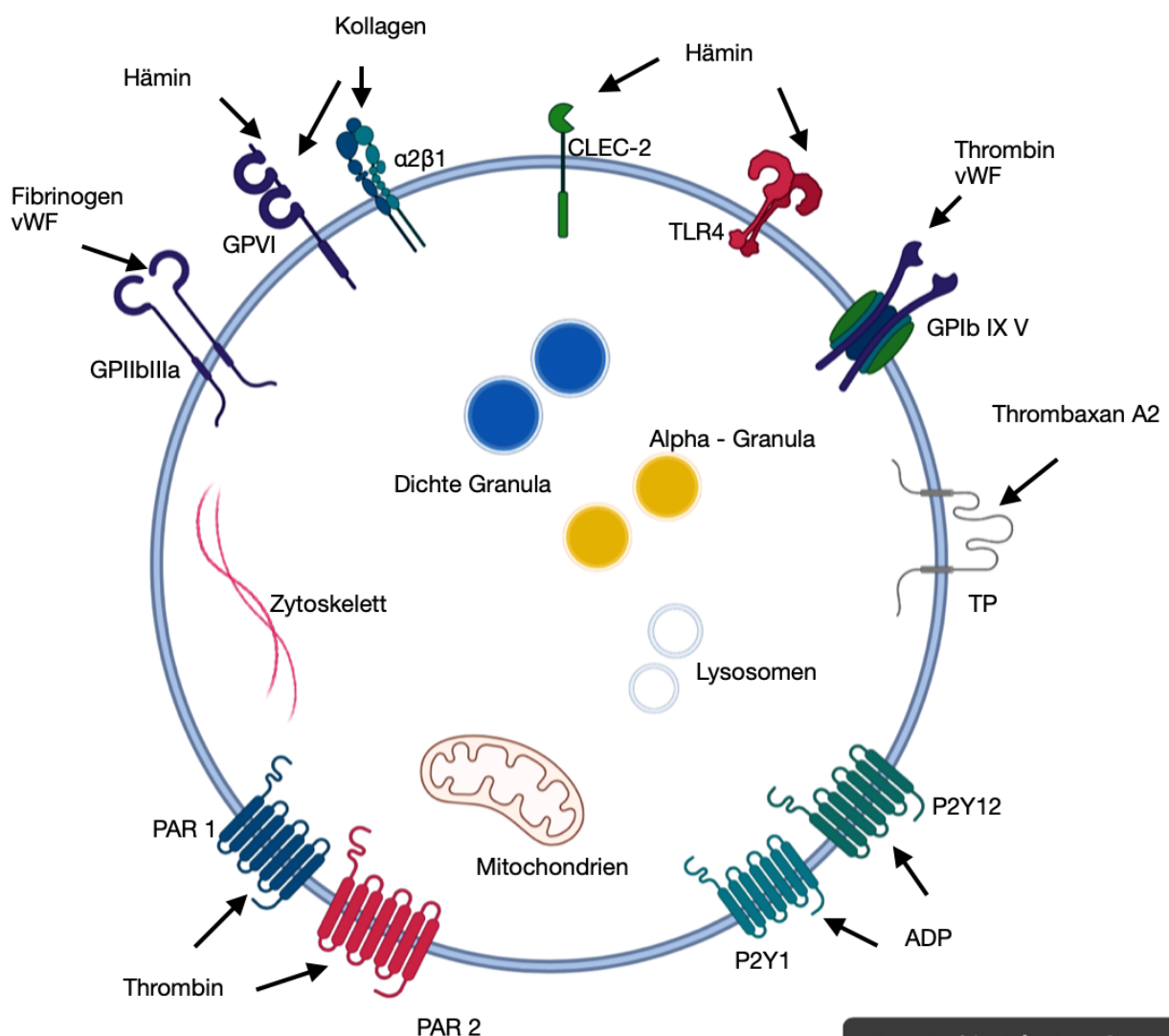


Abbildung 1: Thrombozytenrezeptoren und Stimulatoren

Schematische, idealisierte Darstellung des Thrombozyten mit relevanten Rezeptoren, den wichtigsten assoziierten Stimulatoren und Organellen. Grafik erstellt mit BioRender. Grafik modifiziert nach [19] [26].

1.1.1. Thrombozytengranula im Überblick

Thrombozyten setzen im Rahmen der Aktivierung diverse Moleküle frei, die die Funktionen der Blutstillung, Inflammation und Immunantwort sichern [12, 27]. Diese Moleküle werden in der Thrombozytengranula gespeichert [28]. Die Granula Degranulation ist über intrazelluläre Signalwege rezeptorvermittelt stark reguliert [28]. Hierbei ist die Delta-Granula am sensitivsten für Stimulation, gefolgt von der Alpha-Granula und der lysosomalen Granula [29]. Störungen der Granula Degranulation führen zur gestörten Thrombozytenfunktion und gesteigerter Blutungsneigung [30-32].

1.1.1.1. Alpha-Granula

Die Alpha Granula ist ein sekretorisches Organell, das zahlreiche Moleküle mit verschiedenen Funktionen enthält, darunter Membranrezeptoren wie CD62P, GPIIb/IIIa, prokoagulatorische Faktoren wie Faktor V und der von Willebrand Faktor [27, 33]. Ein Thrombozyt enthält bis zu 80 Einheiten dieser zirka 500 nm großen Organellen [34, 35]. Die Granula wird größtenteils im Rahmen der Biosynthese im Megakaryozyten erzeugt und rudimentär durch Eigensynthese im zirkulierenden Thrombozyten [33].

1.1.1.2. Delta-Granula

Die Thrombozyten Delta-Granula, auch Dense-Granula genannt [36], enthält primär kleine Moleküle wie ADP, ATP, Serotonin und Kalzium [28, 32, 35]. Ein Thrombozyt hat maximal 8 Einheiten dieser zirka 300 nm großen Organellen [35]. Sie spielen eine wichtige Rolle im Rahmen eines positiven Rückkopplungsmechanismus. Durch die Degranulation von zum Beispiel ADP steigert der Thrombozyt seine eigene Aktivität [28]. Neben den genannten Molekülen ist die Delta-Granula auch eine Quelle für das lysosomale Membranprotein CD63 [28, 37].

1.1.1.3. Lysosomen

Je Thrombozyten kommen zirka 3 Lysosomen vor [29]. Thrombozytäre Lysosomen enthalten degradierende Moleküle wie saure Phosphatase, Galaktosidasen und Hexosaminidasen [28, 29]. Neben den genannten Enzymen exprimieren thrombozytäre Lysosomen CD63 [28]. Der genaue Vorgang der lysosomalen Degranulation ist nicht vollständig geklärt und Gegenstand der Forschung [28].

1.2. Pathophysiologie von Hämin bei kardiovaskulären Erkrankungen

In der Pathophysiologie vieler kardiovaskulärer Erkrankungen spielt der Zerfall roter Blutkörperchen oder der Zerfall von Muskelzellen eine wichtige Rolle. Bei diesem Krankheitsbild der Hämolyse beziehungsweise Rhabdomyolyse wird Hämin, ein Abbauprodukt von Hämoglobin [23], aus den zerfallenden Erythrozyten beziehungsweise Myozyten freigesetzt [38]. Plasmaproteine wie Haptoglobin, Hämoexin und Albumin können freies Hämin im gesunden Organismus zu einem gewissen Grad abfangen und so vor Zellschaden schützen [39]. Bei schweren Hämolyseereignissen kann dieses System jedoch überlastet werden [40]. Klinisch beobachtet man eine erhebliche Neigung der betroffenen Patienten zu Thrombosen respektive thromboembolischen, mikrozirkulatorischen Komplikationen und thrombinflammatorischen Ereignissen bis hin zu vollständigem Organversagen [41, 42]. Freies Hämin kann hierbei über diverse Mechanismen thrombogen und gerinnungsfördernd wirken, zum Beispiel über endotheliales NF- κ B oder aber über eine Induktion des Tissue Faktors [39, 43]. Zellulär spielen die Thrombozytenoberflächenrezeptoren GPVI und CLEC-2 eine zentrale Rolle [25]. Unter anderem an diese Rezeptoren bindet Hämin und induziert einen ITAM rezeptorgesteuerten intrazellulären Signalweg [44]. Dieser Signalweg verläuft über die kaskadenartige Aktivierung von Syk, LAT und PLC γ 2 und sorgt auf diese Weise für die Aggregation und Degranulation der Thrombozyten, also für deren Aktivierung [25, 44-46]. Neben dem beschriebenen Mechanismus ist freies Hämin in der Literatur auch für weitere thromboseinduzierende Signalwege verantwortlich. So führt Hämin über die cGMP modulierte ROS vermittelte Induktion von intrazellulärem oxidativem

Stress im Endothel zu weiteren, proinflammatorischen, ferroptischen und thrombotischen Wirkungen [42, 45, 47].

1.3. P-Selektin fungiert in der Thrombusformation

P-Selektin ist unter anderem ein Bestandteil der Thrombozyten Alpha-Granula [33] und der Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen [48] und lässt sich als Aktivitätsmarker der Thrombozyten interpretieren, insofern als dass er ein Indikator für Degranulation und Sekretion der Alpha-Granula ist [49]. CD62P ist ein bekannter Rezeptor, der auf verschiedenen Leukozyten, Endothelien und Thrombozyten exprimiert wird. Ein, auch in der Pathophysiologie der kardiovaskulären Erkrankungen, wichtiger Ligand von CD62P ist P-Selektin-Glykoprotein Ligand 1. Dieser wird unter anderem auf Thrombozyten, Gefäßendothelien und manchen Leukozyten (beispielsweise Monozyten) exprimiert [4, 6, 50].

P-Selektin dient bei Thrombozyten insbesondere als Adhäsionsmolekül und interagiert sowohl mit anderen Thrombozyten und Leukozyten als auch mit Endothelien der Gefäßwand. Die Interaktion zwischen P-Selektin und seinem Liganden, dem PSGL1 resultiert jedoch in einer schnell reversiblen Adhäsion. Um eine stabile Adhäsion zu erreichen, müssen weitere Rezeptor/Ligand - Interaktionen stattfinden. Wichtig dafür sind die Integrine [4].

Auf diese Weise trägt P-Selektin einerseits zur Thrombusformation und somit zur Blutstillung im engeren Sinne, als auch zur Inflammation und der Induktion der Fibrose bei [8].

1.4. CD63 als Marker der lysosomalen Granula Degranulation

Bei CD63 handelt es sich um *Lysosome - Associated Membrane Glykoprotein 3*, einem Oberflächenprotein des Thrombozyten [9], das anteilig bei Degranulation der Delta-Granula und bei Verschmelzung der Lysosomen mit der Thrombozytenmembran exprimiert wird [51-53]. Die Delta-Granula ist hierbei aber der lysosomalen Granula sehr ähnlich [29]. CD63 gehört zur Superfamilie der Tetraspanine und bildet große Komplexe mit dem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und CD9 auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten [37, 54]. Zusätzlich zu Funktionen

in der Plättchenadhäsion und Tyrosinphosphorylierung [51] ist CD63 als Inhibitor der Matrix Metalloproteinase I identifiziert worden [55]. Traditionell kann CD63 als Marker für die Aktivität der Thrombozyten [54], sowie die intrazelluläre Aktivität der Delta-Granula, die aktive Moleküle wie ATP, Adenin oder Serotonin enthält [56] und im überwiegendem Maße der Lysosomen, welche proteindegradierende Moleküle wie Carboanhydrasen oder Lipasen enthalten, angesehen werden [10, 52, 57]. Unter Stimulation der Thrombozyten, zum Beispiel mittels CRP oder Hämin verschmelzen diese Organellen mit der Plasmamembran und führen zu einem Anstieg der Expression von CD63 [52, 58].

1.5. Furins vielfältige Physiologie im Thrombozyten

Bei Furin handelt es sich um eine intrazelluläre, Kalzium abhängige Serinprotease der Subtilisin - Familie [59]. Intrazellulär ist sie im Trans - Golgi - Netzwerk lokalisiert [60] und interagiert eng mit der Zelloberfläche und frühen Endosomen [61]. Die Hauptaufgabe dieser Proteinkonvertase ist die Aktivierung funktionell relevanter Proteinvorläufer und ist somit funktionell für diverse biologische Signalwege nötig [62]. Zu den Substraten zählen unter anderem Protein-Tyrosin Phosphate, Matrix Metalloproteasen, diverse Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, sowie Oberflächenproteine [59, 62]. Furin ist somit in seiner Funktion und seinen Auswirkungen keineswegs spezifisch auf einzelne pathologische, physiologische oder intrazelluläre Vorgänge begrenzt und auch im Organismus nicht thrombozytenspezifisch [59]. Vielmehr spielt die furinabhängige Proproteinaktivierung, - Modulation oder - Inaktivierung eine Rolle in diversen, pathophysiologisch verschiedenen Erkrankungen, darunter zum Beispiel virale Erkrankungen und Atherosklerose [61]. Es sind verschiedene Furin beziehungsweise Proproteinaktivierungsinhibitoren bekannt, darunter Furin Inhibitor II (Hexa-D-Arginin) und SSM3, mit denen in dieser Dissertation gearbeitet wurde.

In dieser Dissertation ist der Einfluss der Subtilisin - like - Proproteinaktivierungsinhibitor Furin auf die Thrombozytenaktivierung und die Degranulierung der Alpha-, Delta- und lysosomalen Granula der Thrombozyten von zentralem Interesse.

Die folgenden Arbeitshypothesen und Kernfragen sollen behandelt werden:

- (I) Ist der Furineinfluss auf die Alpha-Granula Degranulation häminspezifisch?
- (II) Beeinflusst Furin die Plättchenfunktionalität?
- (III) Besteht eine Furinabhängigkeit in der hämininduzierten, lysosomalen Granula Degranulation?

Auf Basis der oben genannten Kernfragen soll mit dem folgenden Schema veranschaulicht werden, mit welcher Methodik sich den Hypothesen in dieser Dissertation angenähert werden kann und mit welchen Erwartungen die Hypothesen getestet werden.

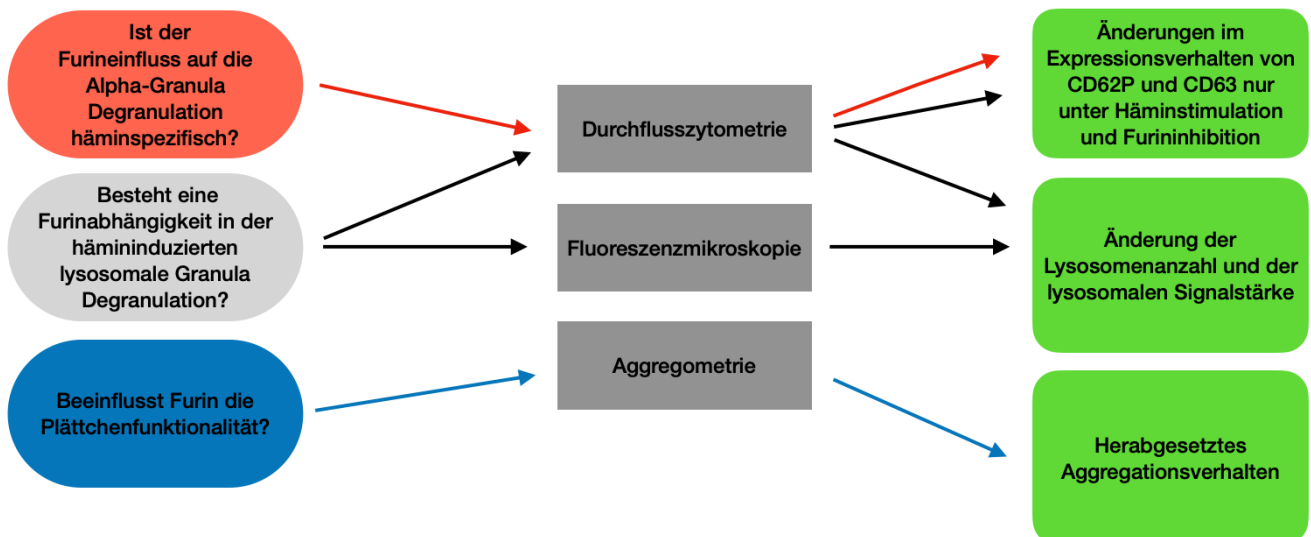


Abbildung 2: Schema zur Analyse der Kernhypothesen

Rot, Hellgrau, Blau: Kernfragen der Dissertation. Dunkelgrau: Mögliche Methodik. Grün: Vermutete Resultate. Grafik erstellt mit MacOs Pages.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Reagenzien und Geräte

Die Zusammensetzung der weiterhin verwendeten Puffer ist im Anhang an diese Dissertation aufgeführt.

Tabelle 2: Marker und Inhibitoren

Antikörper / Inhibitor / Farbstoffe	Firma
Anti-CD62P PE Art.Nr: IM1759U (Endkonzentration 1:10)	CLB-Thromb/6 Beckman Coulter, Brea, California, United
Anti CD62P FITC Art.Nr: Ao7790 (Endkonzentration 1:10)	CLB-Thromb/6 Beckman Coulter, Brea, California, United
Anti-human Furin 488 Art.Nr: IC1503G-100UG (Endkonzentration 1:10)	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota,
Anti CD63 PE/Dazzle Clone H5C6 (Endkonzentration 1:10) Art.Nr: 353022	BioLegend, San Diego, USA
Anti CD63 PE Clone H5C6 Art.Nr: 12-0639-42 (Endkonzentration 1:10)	Invitrogen life technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA.
Hexa-D-Arginin Katalog Nr. 4711	R&D Systems, Minneapolis, 4711 Minnesota, United States
LysoTracker (Green) Katalog Nr. L7526	ThermoFischer Life Technologies GmbH,
Phospholipase A2 Inhibitor AACOCF3 Katalog Nr. 1462	TOCRIS Bioscience, Avonmouth, Bristol, United Kingdom
SSM3 Trifluoroacetat Katalog Nr. 5253/10	TOCRIS Bioscience, Avonmouth, Bristol, United Kingdom

Tabelle 3: Verwendete Hardware und Software

Geräte	Software	Firma
BD LSRFortessa™ Cell Analyzer	BD FACSDiva™	BD Bioscience
BD FACSLyric™ Flow Cytometry	BD FACSuite™	BD Bioscience
BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD CellQuest Pro	BD Bioscience

Aggregometer	AggroLink Version 5.2.1	CHRONO-LOG CORP.
Nikon Eclipse Ti2	NIS Elements	Nikon
SYSMEX KX-21N Hematology Analyzer	KX-21N	Sysmex

Tabelle 4: Analysesoftware

Funktion	Software	Firma
Analyse	FlowJo V5.00000 Version 10.8.0	Becton Dickinson & Company
Analyse	GraphPad Prism Version 9.4.1	GraphPad Software, Inc.
Analyse/Literatur	EndNote Version 20	Claivate Analytics
Grafische Darstellung	BioRender	Science Suite Inc.

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Firma
ADP	Chrono - Log Corp. Havertown, Pennsylvania, US
BSA	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
CRP - XL	CambCol Laboratories Ely, UK
Dulbecco`s Phosphat buffered Saline	Sigma Aldrich Co. St.Louis, Missouri, US
Dulbecco`s Phosphat buffered Saline mit Ca ²⁺	Sigma Aldrich Co. St.Louis, Missouri, US
Fibrinogen (aus menschlichem Plasma) F3879-1g	Sigma Aldrich Co. St.Louis, Missouri, US
Glucose (D+)	Sigma Aldrich Co. St.Louis, Missouri, US
Hämin	Sigma Aldrich Co. St.Louis, Missouri, US
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natrium3 Zitrat	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃ -)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Formaldehydlösung 4%	Otto Fischar GmbH & Co. Kg, Saarbrücken, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	Roche AG Basel, Schweiz
TRAP	Roche AG Basel, Schweiz
Zitronensäure	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland

2.2. Auswahl der Spender

Je nach Versuch erfolgte die Isolation der Thrombozyten nach einem etablierten und bestehenden Schema aus Vollblut gesunder freiwilliger Spender. Für die Untersuchung an humanem Blut besteht eine Beurteilung forschungsethischer Aspekte durch die universitäre Ethikkommission unter der Projektnummer 238/2018 BO2. Die Einschlusskriterien waren die ausdrückliche Freiwilligkeit und Einwilligung zur venösen Blutentnahme und die Abstinenz jeglicher Medikamente, die die Thrombozytenaggregation beeinflussen, für mindestens 7-10 Tage. Im Rahmen der Spenderauswahl wurde das Geschlecht und das Alter der Spender nicht wesentlich berücksichtigt. Vielmehr handelte es sich um Angehörige der verschiedenen angegliederten Laborarbeitsgruppen, die im Rahmen der Untersuchung bei bestehender Freiwilligkeit, keiner bekannten pathologisch veränderten Blutgerinnung und anamnestisch nachgewiesener Medikamentenabstinenz herangezogen wurden.

In allen unten aufgeführten Experimenten werden die Messergebnisse eines Spenders jeweils als ein Punkt graphisch dargestellt. Die Anzahl an verschiedenen Spendern je Versuchsreihe ist als n-Zahl in der Grafikunterschrift angegeben.

2.3. Thrombozytenisolation

Die Blutabnahme erfolgte in 10 ml Spritzen, in denen 2 ml steriler *Acid Citrate Dextrose* (ACD) Puffer vorgelegt wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 209g ohne Bremse. Der dabei gebildete Überstand aus plättchenreichem Plasma (PRP) wurde schonend mittels einer Pipette abgenommen und in 25 ml vorbereiteten sterilen TYRODES Puffer pH 6,5 zugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation der TYRODES - PRP - Suspension für 10 Minuten bei 836g mit Bremse. Die entstehenden aufgereinigten Thrombozyten sammelten sich am Grund und der Überstand konnte verworfen werden. Es folgte eine Resuspension der Plättchen mittels TYRODES pH 7,4 und eine Messung der Thrombozytenzahl in einer TYRODES pH 7,4 Verdünnung von 1:10 am *SYSMEX*. Auf Basis der verdünnten Plättchenzahl ließ sich eine versuchsspezifische Thrombozytenzahl pro μl

einstellen. Auch diese Einstellung erfolgte, dem Standard folgend, mit dem TYRODES pH 7,4.

2.4. Verwendete Lösungsmittel und Solvensbehandlung

Die in dieser Dissertation verwendeten Substanzen werden in einer bestimmten Konzentration ab Werk geliefert. Zur Einstellung der Zielkonzentrationen beziehungsweise der Einstellung der Wirkkonzentrationen wurden verschiedene Lösungsmittel verwendet. Welches Lösungsmittel zur Verdünnung welcher Substanz verwendet wurde, ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 6: Substanz und Solvenz

Substanz	Solvenz
ADP	Kalziumfreies PBS
CRP	Kalziumfreies PBS
D6R	Destilliertes Wasser
Fibrinogen	Destilliertes Wasser
Hämin	Kalziumfreies PBS
Lysotracker	Kalziumfreies PBS
Phospholipase Inhibitor	Destilliertes Wasser
SSM3 Stammlösung	Destilliertes Wasser
SSM3 Verdünnung	TYRODES pH 7,4
Thrombin	Kalziumfreies PBS
TRAP	Kalziumfreies PBS

Die unten beschriebene Methodik folgt einem etablierten Standard der Arbeitsgruppe, um auf diese Weise die Vergleichbarkeit der Daten auch projektübergreifend herstellen zu können.

Die Antikörper wurden ohne Vorverdünnung verwendet, da in Titrierversuchen bei Vorverdünnung eine zu große Signalabnahme festgestellt wurde.

2.5. Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Oberflächenstruktur der Thrombozyten empfiehlt sich die Durchflusszytometrie. Hierzu werden isolierte und gegebenenfalls mit Inhibitoren versetzte Thrombozyten verwendet. Die isolierten Thrombozyten werden in 2 Aliquot mit identischer Thrombozytenzahl pro Mikroliter aufgeteilt. Der eine Anteil wird mit den Furininhibitoren SSM3 oder D6R für 10 Minuten präinkubiert. Anschließend werden die Thrombozyten mit kalziumhaltigem PBS, einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen ein Oberflächenantigen von Interesse und einem Stimulator versetzt. Die Fixierung und damit die Beendigung der Reaktion der Thrombozyten auf die Zugabe der Substanzen erfolgte nach halbstündiger Inkubation bei Raumtemperatur mittels 0.5% PFA - Lösung. Die Fixierung war in den folgend dargestellten durchflusszytometrischen Datenerhebungen Standard. Nicht fixiert, also die Untersuchung an vitalen Thrombozyten, erfolgte bei der Analyse der lysosomalen Signalstärke mittels *LysoTracker*. Die Inkubation der Proben erfolgte stets lichtgeschützt und bei Raumtemperatur. Als Kontrolle dienten unstimulierte Thrombozyten, die anstelle des Stimulators zum Erhalt der Konzentrationsgleichheit eine, dem Volumen der Stimulation entsprechende, zusätzliche Menge PBS mit Kalzium enthielt. Zur Verdeutlichung ist in der folgenden Tabelle ein Pipettierschema als Beispiel dargestellt:

Tabelle 7: Beispiel des Pipettierschema zur FACS - Probenbehandlung

FACS	Unstimuliert (Kontrolle)	Stimulator Konzentration 1	Stimulator Konzentration 2	Unstimuliert + Furininhibition (Kontrolle)	Stimulator Konzentration 1 + Furininhibition	Stimulator Konzentration 2 + Furininhibition
PBS + Ca	40 µl	35 µl	35 µl	40 µl	35 µl	35 µl
Thrombozyten (200x10³)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Antikörper	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Stimulator	Ohne Simulator	5 µl	5 µl	Ohne Simulator	5 µl	5 µl
Inkubationszeit 30 Minuten						
0,5% PFA	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt mittels Laserlicht. Auf dieses reagieren die fluoreszenzmarkierten Antikörper, die ein entsprechendes

Oberflächenantigenen gebunden haben. Je nach, wie in dieser Arbeit untersucht, Aktivierungsgrad ändert sich der Expressionsgrad des Antigens und damit die gebundene Antikörpermenge. Diese Änderung resultiert in einem verändertem und messbarem Fluoreszenzsignal. Diese Signaländerung kann, abhängig vom betrachteten Rezeptor, als Maß für eine Aktivierung analysiert werden. Die Stimulation erfolgt bei allen folgenden durchflusszytometrischen Daten für präzise 30 Minuten.

Für das Messen der Rohdaten wurde die Software *Cellquest pro* (Version 0.3.ef8b) verwendet, mit der die Rohdaten gesammelt werden können. Zur Analyse und Konvertierung der Rohdaten wird dann *FlowJo* (Version 10.8.0) und zur Darstellung und statistischen Analyse der Ergebnisse *GraphPad Prism* (Version 9.4.1) verwendet.

2.6. Aggregometrie

Bei der Aggregation wird eine Partikelsuspension abhängig der Partikelzahl analysiert. Das zugrunde liegende Prinzip ist der Tyndalleffekt. Durch einen magnetischen Rührstab kommt es zu einer Rührbewegung, die die Aggregation fördert. Die Untersuchung der Thrombozytenaggregation erfolgt photometrisch und wird in Kurvenform dargestellt. Das verwendete Aggregometer kann zwei Kanäle parallel analysieren.

Entsprechend der Fragestellung des zugrundeliegenden Versuchs erfolgt die Funktionsanalyse der Thrombozyten mittels PRP. Dem Standard der Arbeitsgruppe wird für die Aggregometrie zur Gewinnung von PRP Citratblut verwendet. Nach dem ersten Zentrifugationsschritt wird am entstandenen PRP die Thrombozytenzahl per *SYSMEX* erhoben. Die Probe wird mit einem als Standard definierten Nullwert verglichen. Dieser kann zum Beispiel mittels PPP (als Vergleichswert für PRP) oder auch mittels TYRODES pH 7,4 (als Vergleichswert für isolierte Thrombozyten) ermittelt werden. Die Probe wird zur Untersuchung mit verschiedenen Stimulanzien und gegebenenfalls Inhibitoren, wie in dieser Dissertation gegen Proteinkonvertasen und Phospholipasen, versetzt und in Relation zu diesem Nullwert gesetzt. Die Thrombozyten, die für die Analyse der Inhibitorwirkung verwendet wurden, wurden vor Zugabe des

Stimulators über eine prä-Inkubationszeit von 10 Minuten mit dem Inhibitor präinkubiert. Um Effekte durch die Inhibition zu verifizieren, wurden als Kontrolle stimulierte Thrombozyten ohne Inhibitor verwendet. Zur Volumen- und Konzentrationsgleichheit wurde bei den Kontrollproben das Volumenäquivalent der Stimulation durch destilliertes Wasser aufgefüllt. In der folgenden *Tabelle 7* ist ein Pipettierschema beispielhaft zur Veranschaulichung aufgearbeitet:

Tabelle 8: Beispiel des Pipettierschema der Aggregometrie

	Stimulator Konzentration 1	Stimulator Konzentration 1 + Furininhibition	Stimulator Konzentration 2	Stimulator Konzentration 2 + Furininhibition
PRP	480 µl	480 µl	480 µl	480 µl
Stimulator	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Inhibitor	Kein Inhibitor	10 µl	Kein Inhibitor	10 µl
Destilliertes Wasser	10 µl	Kein destilliertes Wasser	10 µl	Kein destilliertes Wasser

Ein Effekt, das bedeutet die Wirkung des Stimulators unter den eingestellten Bedingungen, wird nach etabliertem Protokoll der Arbeitsgruppe für 4 bis 5,5 Minuten gemessen. Zur Darstellung wird die Änderung der Aggregation in Relation zum jeweils verwendeten Vergleichswert bezogen in Kurvenform dargestellt. Für die Auswertung wird *GraphPad Prism* verwendet.

2.7. Fluoreszenzmikroskopie

Als weitere Methodik insbesondere zur Visualisierung intrazellulärer Vorgänge, wie der hypothetisierten lysosomalen Granula Degranulation, wurde die (Fluoreszenz-) Mikroskopie eingesetzt. Hierbei wurde ein fluoreszenzmarkierter *LysoTracker* verwendet, der spezifisch an Organellen mit lysosomalen pH-Wert bindet.

Zur Vorbereitung wurden Cover Slips mit 150 µl einer 100 µg/ml Fibrinogenlösung beschichtet und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Slips mit PBS ohne Kalzium gewaschen (abpipettieren der 150 µl Fibrinogenlösung und aufpipettieren von 150 µl PBS ohne Kalzium). Anschließend werden Thrombozyten nach dem oben genannten Schema isoliert und auf 20.000 / µl mit TYRODES pH 7,4 eingestellt. Von diesen Plättchen

werden 84 µl auf die, kurz vor Versuchsbeginn vom PBS befreiten, Cover-Slip gegeben, es folgen 5µl des Stimulators, 1 µl Kalziumchlorid und 10 µl *LysoTracker* (80 nM). Nach einer Inkubation von 30 min erfolgt die mikroskopische Aufnahme an unfixierten, vitalen Thrombozyten. Als Kontrolle wurden in diesem Versuchsaufbau unstimulierte, vitale Thrombozyten verwendet. Zur Veranschaulichung ist in der folgenden Tabelle ein Pipettierschema dargestellt.

Tabelle 9: Pipettierschema Fluoreszenzmikroskopie

	Kontrolle	Stimulator	Stimulator + SSM3
Thrombozyten 20000/µl	84 µl	84 µl	84 µl
LysoTracker 80nM	10 µl	10 µl	10 µl
Stimulator	Keine Stimulation	5 µl	5 µl
TYRODES pH 7,4	6 µl	Kein Volumenausgleich	Kein Volumenausgleich
Kalziumchlorid	Kein Kalziumchlorid	1 µl	1µl

Beim verwendeten Mikroskop handelt es sich um ein *Nikon Eclipse Ti2*, mit der assoziierten Software *NIS-Elements*. Verwendet wurde ein 10er Okular und ein 100er Objektiv mit Immersionsöl und entsprechendem Fluoreszenzlicht bei Dunkelheit.

Die Auswertung erfolgt zunächst über manuelle, blinde Auszählung der Lysosomenanzahl auf invertierten Merge - (Differential Interferenz Kontrast (DIC) + Fluoreszenzsignal) Bildern. Hierzu wurden je Kondition 5 Bilder von verschiedenen Stellen der Cover Slips erstellt und diese jeweils in vier Quadranten aufgeteilt. Es wurden alle vitalen Thrombozyten in allen Quadranten in die Zählung aufgenommen. Anschließend wurde auf Basis der gezählten Thrombozyten- und Lysosomenanzahl der Mittelwert der Lysosomen je Thrombozyt und Kondition gebildet. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels *GraphPad Prism*.

2.8. Statistik und grafische Darstellung

Die statistische Auswertung, sowie die Darstellung aller in dieser Dissertation verwendeten Grafiken erfolgte über das Grafik- und Statistikprogramm *GraphPad Prism (Version 9.4.1)*. Das graphische Abstrakt und das einleitende Thrombozytenschema wurde mit der frei verfügbaren Version von BioRender entworfen.

Die Nullhypothese ging von einem Nulleffekt aus, also dem Fehlen eines Zusammenhangs zwischen der Dosis und der beobachteten Wirkung und somit keine signifikante Änderung der gemessenen Werte in Abhängigkeit von Stimulation oder Inhibition vergleichend zueinander beziehungsweise vergleichend zur Kontrolle. Die Nullhypothese wurde verworfen, wenn der p-Wert unter dem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ lag.

An statistischen Tests wurde der ANOVA – Test in Verbindung mit dem Šidák Mehrfachvergleichstest verwendet, um Gruppen von 2 oder mehr zu analysieren. Bei Analysen von weniger als 2 Gruppen fand der t-Test Anwendung.

3. Ergebnis

3.1. Stimulatorwirkungen auf die Thrombozytendegranulation

Die Wirkung verschiedener Stimulatoren der Thrombozyten, auf die Alpha - und die lysosomale Granula Degranulation kann über CD62P und CD63 differentiell betrachtet werden. Die Messung der Expressionsänderung durch die Stimulatorwirkungen auf die Thrombozyten wiederum über fluoreszenzmarkierte Antikörper per Durchflusszytometrie. Die Änderungen des Expressionsmusters von CD62P und CD63, im Verhältnis zur Stimulatorkonzentration, werden im Folgenden vorgestellt.

3.1.1. Vergleich der Wirkung auf die Alpha-Granula Degranulation

Als Marker für die vergleichende Untersuchung der Thrombozyten Alpha-Granula dient die Expression von P-Selektin (CD62P) auf der Thrombozytenoberfläche. In veröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe (*The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI* [25]) wurde die Wirkung von Hämin auf die GPVI Expression bereits untersucht. Die in *Abbildung 3* dargestellten Ergebnisse, bieten sich für CD62P in dieser Fragestellung als Positivkontrolle an.

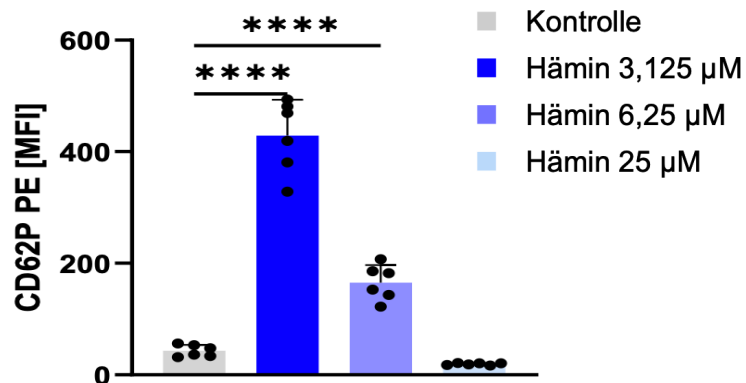


Abbildung 3 [25]: CD62P „Shedding“ [25] unter Häminstimulation

CD62P Expression nach Häminstimulation in 3 Konzentrationen. [MFI]: Mean Fluorescence Intensity, n = 6. Grafik modifiziert nach Figure 1 (Fink et.al. *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI*). Experiment in Kooperation bearbeitet von Dr. Rohlfing A. und Fink A.

Die Daten zeigen eine Zunahme der CD62P Expression humaner Thrombozyten bei niedriger Häminstimulation, die Expression nimmt bei steigenden Häminkonzentrationen wieder ab.

Auf Basis dieser Positivkontrolle in *Abbildung 3* zur Häminwirkung in humanen Thrombozyten sollen nun im ersten Teil dieser Dissertation weitere bekannte Thrombozytenstimulatoren differentiell betrachtet werden. Hierzu zählen ADP (*Adenosindiphosphat*), CRP (*Collagen Related Peptide*) und TRAP (*Thrombin Receptor Activating Peptide*).

Zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie wurde ein fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen CD62P verwendet, der im PE Kanal markiert ist, verwendet.

Die Durchflusszytometrische Analyse der CD62P Expression bei humanen Plättchen wird in den folgenden Abbildungen aufgearbeitet.

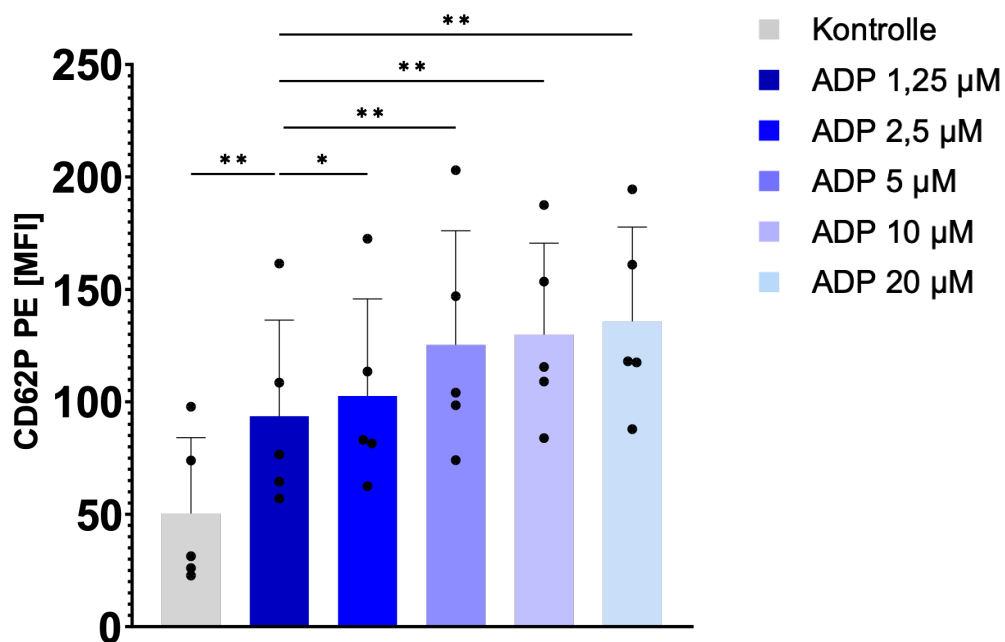


Abbildung 4: ADP steigert die thrombozytäre CD62P Expression

ADP Konzentrationsreihe mit 5 Konzentrationen. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Oberflächenexpression nach ADP Stimulation. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Holm-Šidák Mehrfachvergleichstest: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, $n = 5$.

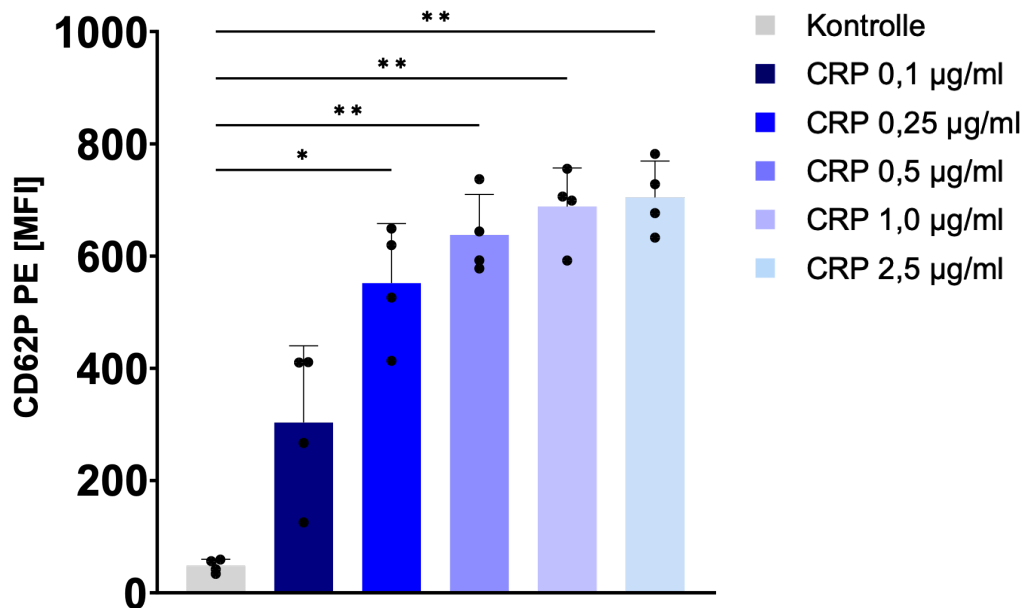


Abbildung 5: Expressionzunahme von CD62P unter CRP-Stimulation

CRP-Konzentrationsreihe mit 5 Konzentrationen. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Oberflächenexpression nach CRP Stimulation. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, $n = 4$.

Die *Abbildung 4* lässt sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Zunahme der CD62P Expression unter ADP-Stimulation erkennen. Gleiches gilt für die Stimulation mit CRP (*Abbildung 5*).

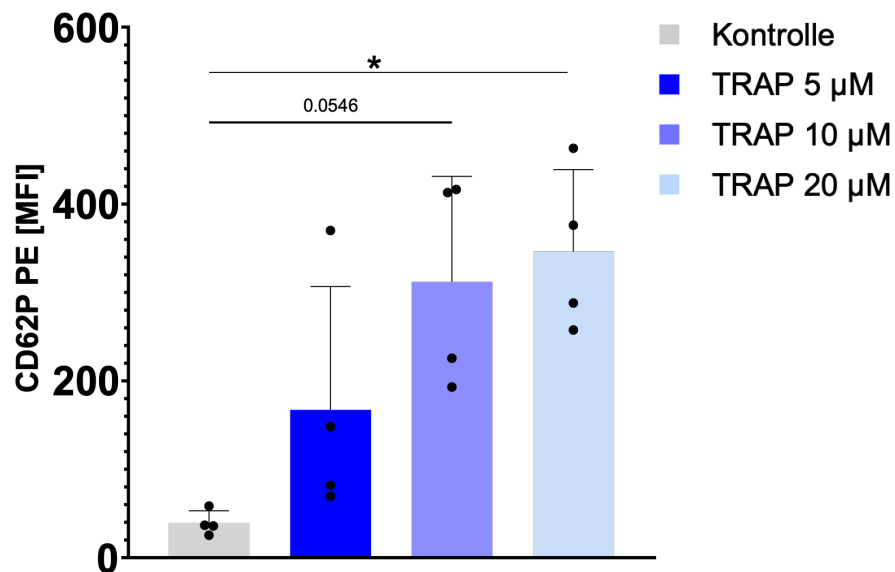


Abbildung 6: Durchflusszytometrisch erhobene CD62P Expressionszunahme unter TRAP-Stimulation

Konzentrationsreihe mit 3 Konzentrationen TRAP. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Oberflächenexpression nach TRAP Stimulation, $n = 4$. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: * $p \leq 0,05$.

Unter Stimulation mit TRAP reagieren die Thrombozyten mit einer gesteigerten CD62P Expression als Marker für die Degranulation der Alpha-Granula.

Vergleichend kann eine Zunahme der Alpha-Granula Degranulation unter Stimulation mit ADP, CRP und TRAP beschrieben werden, die jedoch einem anderen Expressionsmuster folgend ist als unter Häminstimulation. Bei letzterer ist eine Abnahme, nach vorheriger Zunahme der Expression mit steigenden Konzentrationen zu erkennen, dem von unserer Arbeitsgruppe sogenannten „Shedding“ [25].

3.1.2. Vergleich der Wirkung auf die lysosomale Degranulation

Als Marker für die lysosomale (λ -) Granula Degranulation humaner Thrombozyten dient die Messung von CD63, welches größtenteils auf der Oberfläche thrombozytärer Lysosomen exprimiert wird. Anteilig wird CD63 auch

in der Delta-Granula der Thrombozyten gelagert. Somit können orientierend auch Rückschlüsse auf die Degranulierung der Delta-Granula abgeleitet werden.

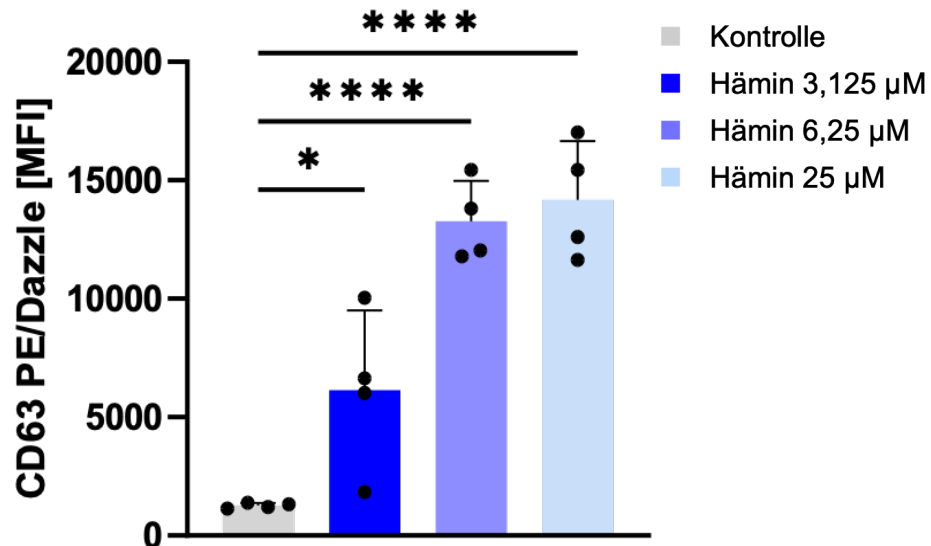


Abbildung 7 [52]: Hämmin stimuliert die Thrombozyten CD63 Expression

Konzentrationsreihe mit 3 Konzentrationen. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: $*p \leq 0,05$, $****p \leq 0,0001$, $n = 4$, FACS Fortessa Messung. Grafik modifiziert nach Figure 1A (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

CD63, welches sich unter anderem in der Lysosomenmembran befindet, wird unter Häminstimulation an die Thrombozytenoberfläche transportiert und verstärkt konzentrationsabhängig exprimiert. Zudem kann das „Shedding“ [25] - Verhalten von GPVI bei CD63 nicht beobachtet werden.

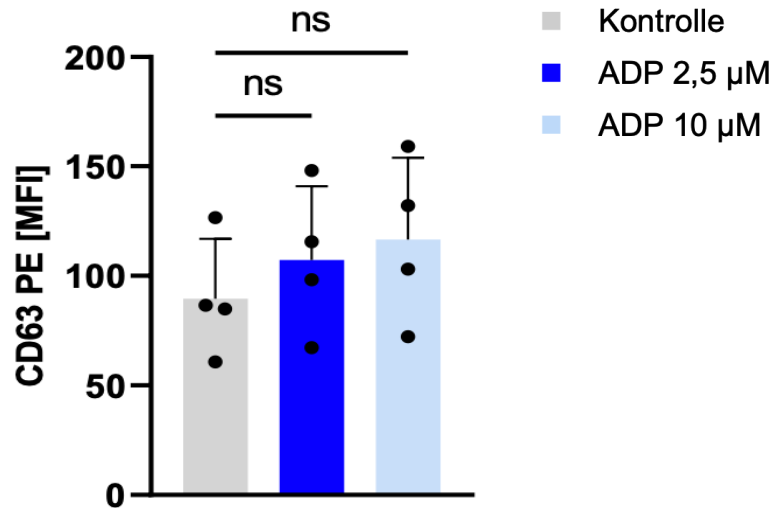


Abbildung 8 [52]: Keine CD63 Expressionsänderung unter ADP Stimulation.

ADP Konzentrationsreihe mit zwei Konzentrationen. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression nach ADP Stimulation. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht significant, n = 4. Grafik modifiziert nach Figure 1D (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

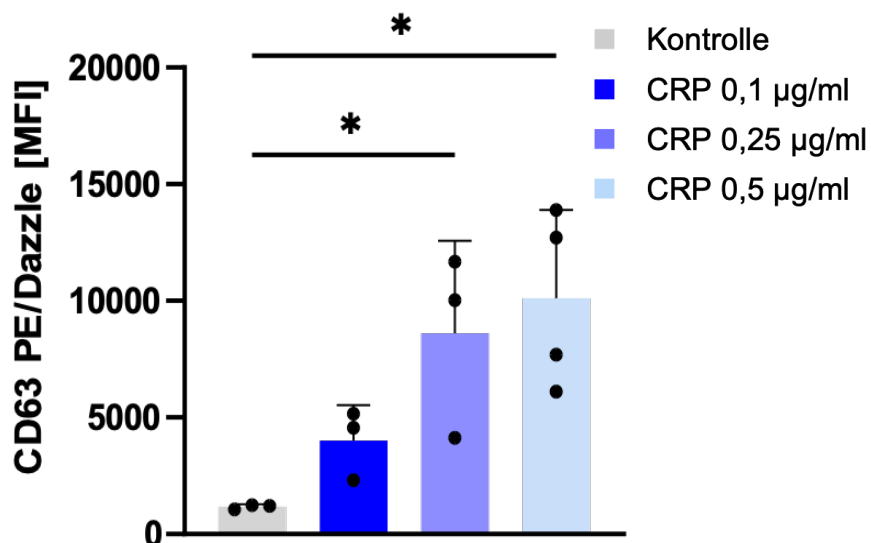


Abbildung 9 [52]: CRP steigert die thrombozytäre CD63 Oberflächenexpression

Konzentrationsreihe mit 3 Konzentrationen unter Verwendung eines PE/Dazzle gelabelten CD63 Antikörper. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: * $p \leq 0,05$, $n \geq 3$, FACS Fortessa Messung. Grafik modifiziert nach Figure 1B (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

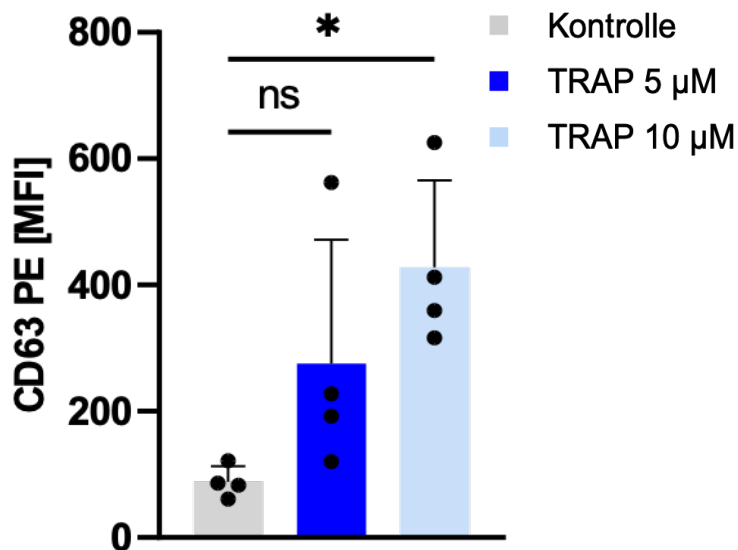


Abbildung 10 [52]: Zuwachs der thrombozytären CD63 Oberflächenexpression unter TRAP Stimulation

Konzentrationsreihe mit 2 Konzentrationen. Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression nach TRAP Stimulation. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, $*p \leq 0,05$, $n = 4$. Grafik modifiziert nach Figure 1C (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Differentiell zu Hämin lässt sich über CD63 eine konzentrationsabhängige Zunahme der lysosomalen Granula Degranulation unter Verwendung der Stimulatoren CRP und TRAP mit unterschiedlich starker Wirkung erheben. Lediglich bei ADP scheinen hierauf nur schwache, nicht signifikante Einflüsse beschreibbar.

Deskriptiv haben alle bei dieser Dissertation verwendeten, Stimulatoren insgesamt signifikanten Einfluss auf die CD62P Expression (Alpha-Granula Degranulation) und, mit Ausnahme von ADP, auch signifikante Effekte auf die CD63 Expression (lysosomale und Delta-Granula Degranulation).

3.1.2.1. Änderung des lysosomalen Fluoreszenzsignals

Die gesammelten Daten zur Änderung der CD63 Expression legen den Schluss nahe, dass unter Anderem Hämin Einfluss auf die lysosomale Degranulation nehmen kann. Da CD63 auch in der Delta-Granula enthalten ist, soll durch eine weitere Methodik die Lysosomen explizit betrachtet werden. Mit Hilfe eines *LysoTrackers*, also eines fluoreszenzmarkierten Farbstoffes, der den spezifischen lysosomalen pH-Wert bindet, soll der Effekt der lysosomalen Granula Degranulation visuell dargestellt werden. Die Auszählung der Lysosomen erfolgte verblindet und manuell. Die Anzahl der Lysosomen sind in der folgenden Abbildung im Verhältnis je Thrombozyten graphisch aufgearbeitet.

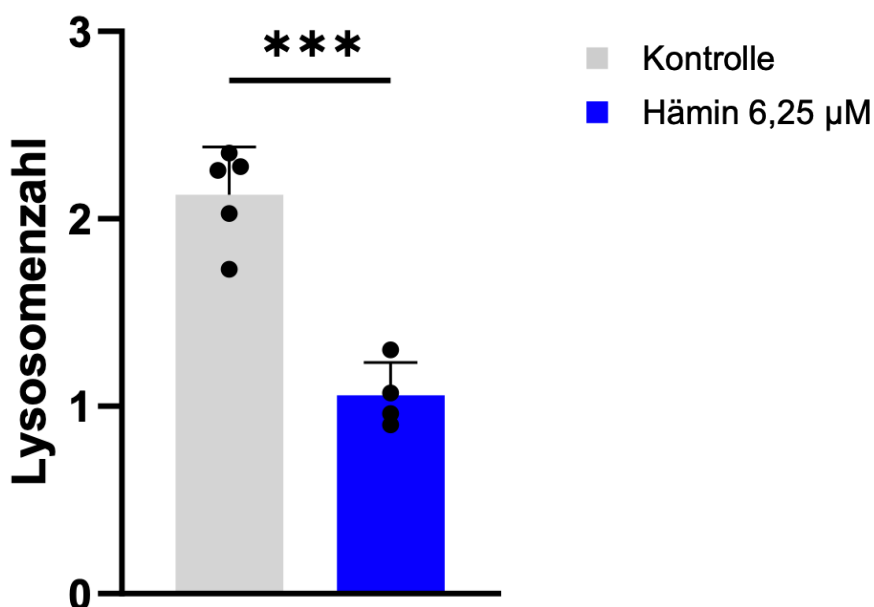


Abbildung 11 [52]: Quantitative Reduktion der Lysosomenzahl je Thrombozyt nach 6,25 µM Häminstimulation

Manuelle, verblindete Auszählung der Lysosomenzahl je Thrombozyt vergleichend der Ruhebedingung zur Häminstimulation. Statistik: gepaarter *t* Test: *** $p \leq 0,001$, $n \geq 4$. Grafik modifiziert nach Figure 3A (Dicenta, Pelzer et al: *The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets*).

Zu interpretieren ist ein signifikanter Abfall der Lysosomenzahl bei Stimulation mittels Hämin im Vergleich zur Ruhebedingung.

Dieser Effekt soll durch Einführung einer weiteren Methodik visuell analysiert werden. Hierzu wird durch Fluoreszenzmarkierung der Lysosomen die genaue Anzahl der Lysosomen direkt untersucht. Die direkte Färbung der Lysosomen ist über einen Beispielspender in der folgenden *Abbildung 12* dargestellt.

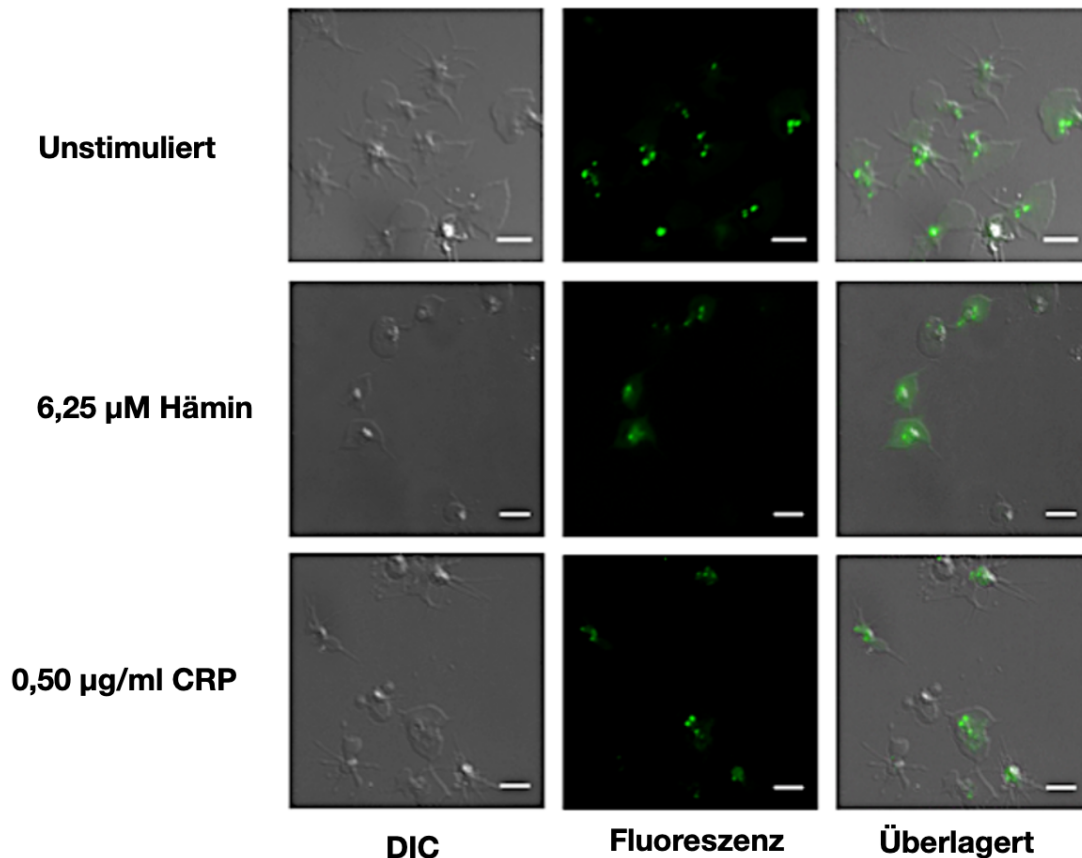


Abbildung 12 [52]: Visualisierung der Lysosomen je Thrombozyt vergleichend unter Hämin und CRP Stimulation

Repräsentative Darstellung der thrombozytären Lysosomen, gefärbt mit LysoTracker Green, unter Stimulation mit Hämin und CRP, vergleichend zur Ruhebedingung. Fluoreszenz (reine Fluoreszenzaufnahme des LysoTrackers). Balken: 5 µm, Aufnahme mit 100er Objektiv + Immersionsöl und 10er Okular. Grafik modifiziert nach Figure 3A (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Die *Abbildung 12* erlaubt eine erkennbare Reduktion der Lysosomenzahl unter Häminstimulation im Vergleich zur Ruhebedingung, während dieser Effekt unter

CRP Stimulation schwächer ausfällt. Die Lysosomenzahl je Thrombozyt nimmt bei Stimulation also ab.

3.1.3. Quantifizierung des *LysoTracker* mittels Durchflusszytometrie

Um die manuelle Auszählung durch eine weitere etablierte Methodik zu ergänzen, wurde der *LysoTracker* mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Ergebnisse sind in der *Abbildung 13* aufgearbeitet.

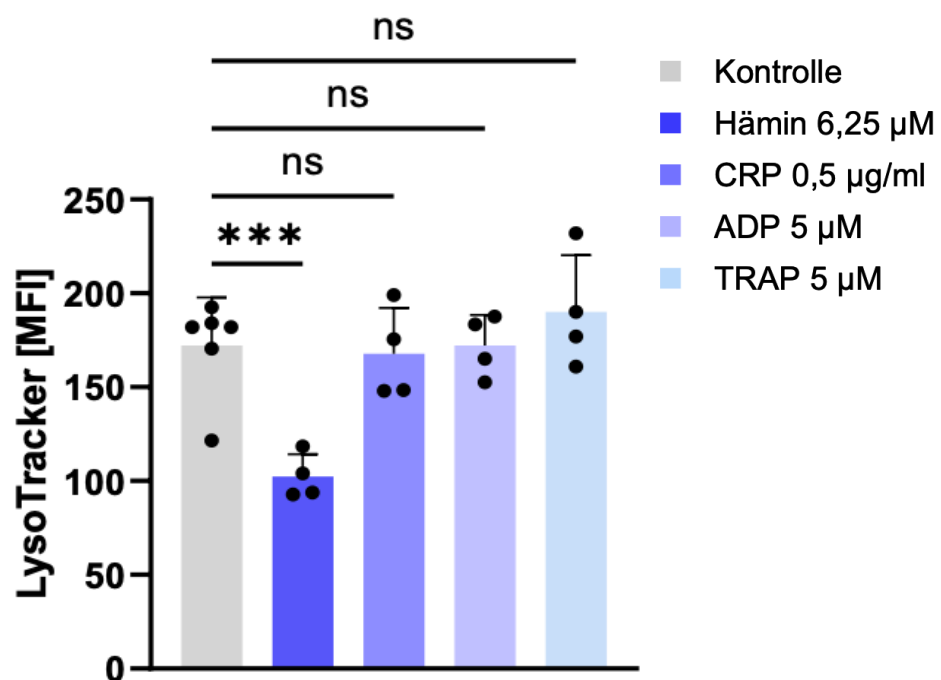


Abbildung 13 [52]: Differentielle Quantifikationsänderung des *LysoTracker* Signals

Statistische Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Signalintensität des *LysoTracker* Green unter Stimulation mit Hämin, CRP, ADP, TRAP im Vergleich zur Ruhebedingung. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, *** $p \leq 0,001$; $n \geq 4$. Grafik Modifiziert nach Figure 3 (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Die Quantifizierung des *LysoTrackers* in *Abbildung 13* zeigt einen signifikanten Abfall des *LysoTracker*-Signals unter Häminstimulation, während auch die im

Mikroskop angedeutete leichte Abnahme unter CRP Stimulation, durch die Quantifizierung nicht bestätigt werden konnte. Vergleichend zu den übrigen Stimulatoren deutet sich keine signifikante Änderung der Signalintensität des *LysoTracker* an.

3.2. Vergleich der Aggregationswirkung

Um die Funktionalität der Thrombozyten zu untersuchen, soll in diesem Abschnitt der Dissertation die Wirkung der zuvor verwendeten Agonisten Hämin, CRP, ADP und TRAP auf die Fähigkeit der Thrombozyten zu aggregieren analysiert werden. Die folgende *Abbildung 14* stellt die maximale Aggregation der genannten Substanzen nach einer zeitlich fest definierten Messdauer (5,5 Minuten) graphisch im Vergleich dar.

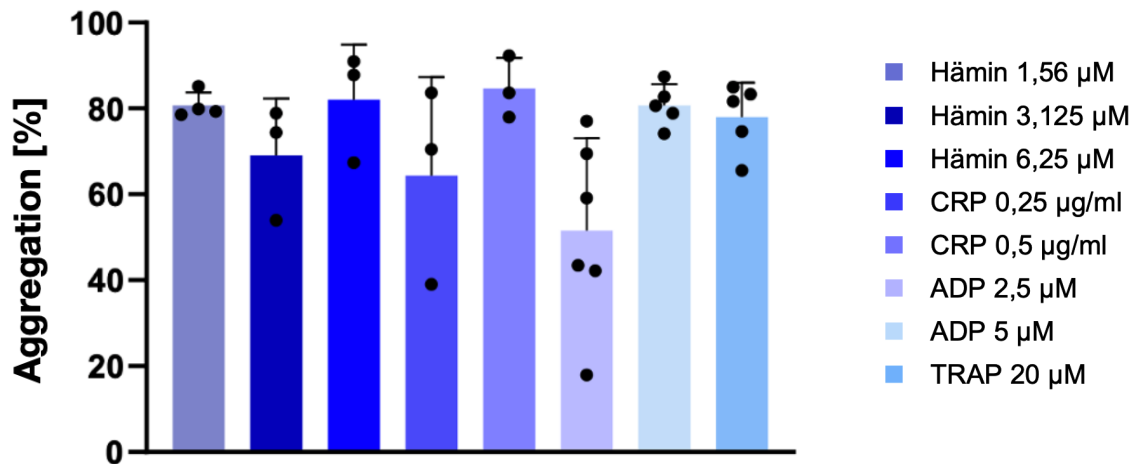


Abbildung 14: Differentielle Betrachtung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit

Maximale Aggregation vergleichend zum Nullwert unter Stimulation der Thrombozyten mit den Agonisten: Hämin (1,56 µM, 3,125 µM, 6,25 µM), CRP (0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml), ADP (2,5 µM, 5,0 µM) und TRAP (20 µM), $n \geq 3$.

Die Daten der *Abbildung 14* zeigen eine unterschiedlich starke Fähigkeit die Thrombozyten zur Aggregation und Thrombusbildung anzuregen. Insbesondere bei CRP und ADP ist eine größere interspendenvariabilität zu erkennen.

3.3. Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition

Ziel dieser Dissertation war zunächst ein Versuch zur Erklärung des bei GPVI beobachteten „Sheddings“ [25] unter Häminstimulation zu finden. Dieses „Shedding“ [25] wurde von uns als furinabhängig erkannt. Aus der Literatur konnte die Phospholipase A2 als Enzym erkannt werden, das nach Aktivierung durch Furin Einfluss auf die Thrombozytenfunktionalität nimmt. Es lag daher nahe, die Inhibition dieser Lipase und dessen Einfluss zu untersuchen.

3.3.1. Phospholipase A2 Einfluss auf die Alpha-Granula Degranulation

In der folgenden Grafik sollen die Effekte der Phospholipase A2 Inhibition auf die Alpha-Granula Degranulation untersucht werden. Als Marker für die Degranulation dient CD62P.

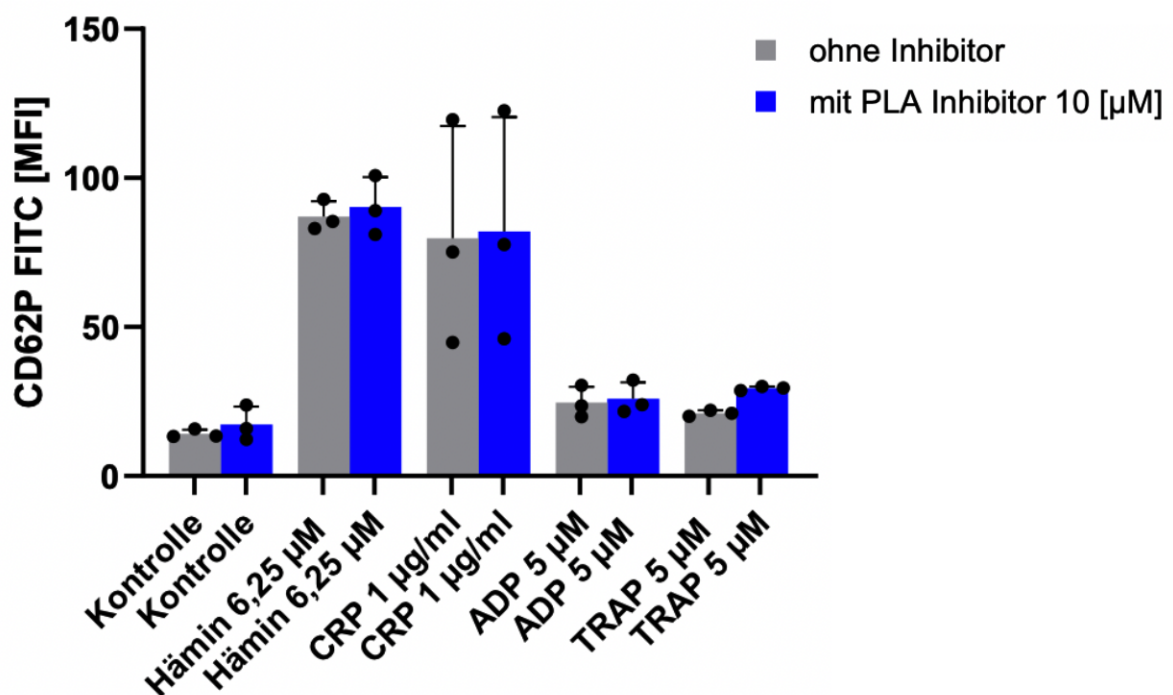


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Effekte der Phospholipase A2 Inhibition auf die CD62P Expression auf Thrombozyten

Differentielle Analyse der Wirkung des PLA2 Inhibitors auf die durchflusszytometrisch erhobene CD62P Expression unter Stimulation im Vergleich mit (dunkelblau) und ohne (grau) Inhibitor, n = 3.

3.3.2. Einfluss der Phospholipase A2 auf die Aggregationsfähigkeit

Thrombozytenfunktion nimmt und durch die Proteinkonvertase Furin aktiviert wird. Um den Einfluss der Phospholipase A2 auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu überprüfen, wurde dieses Enzym in diesem Abschnitt analysiert.

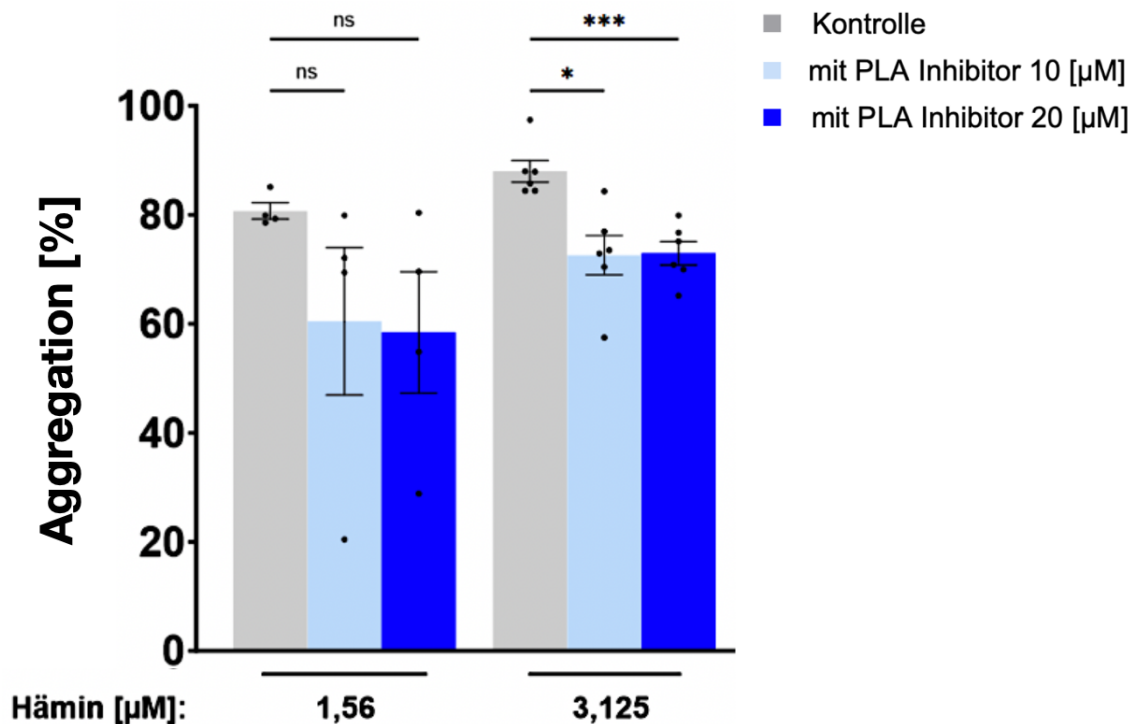


Abbildung 16: Die Phospholipase A2 Inhibitoren ändert die Thrombozytenaggregationsfähigkeit unter Häminstimulation

Statistische Auswertung der maximalen Aggregationsfähigkeit humaner Thrombozyten unter Stimulation mit Hämin in 2 Konzentrationen. Statistik: Ordinary One Way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$, $n \geq 4$.

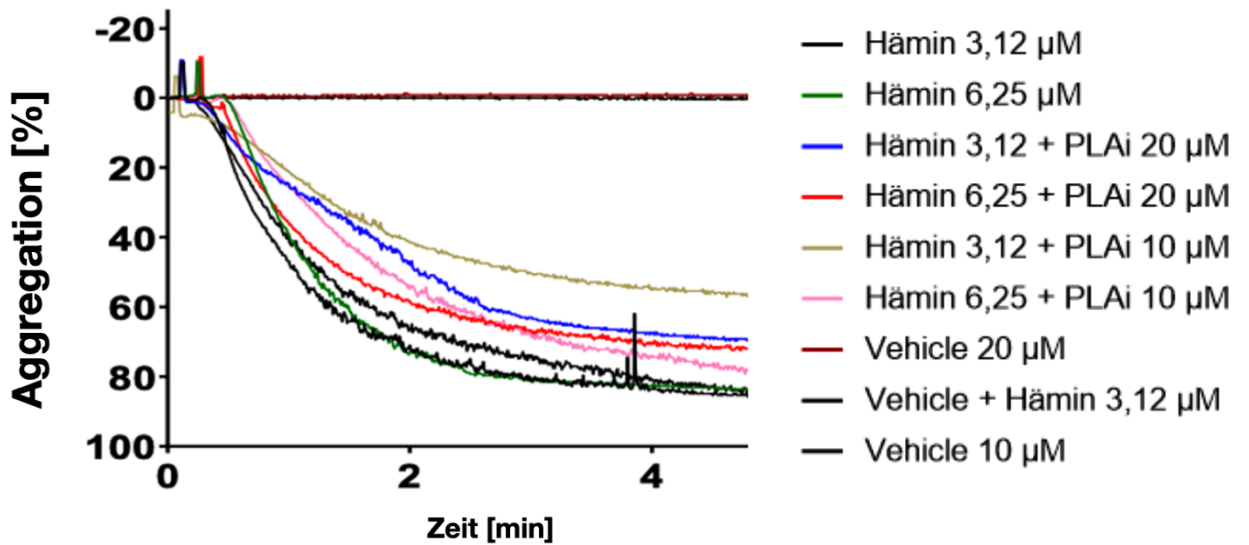


Abbildung 17: Zeitliche Änderung der Aggregation unter Häminstimulation bei Verwendung einer Phospholipaseinhibition

Um Effekte durch den neuen Inhibitor auszuschließen, wurde eine Vehiclekontrolle mit analysiert. Messung für 5 Minuten. Darstellung eines Beispielspenders.

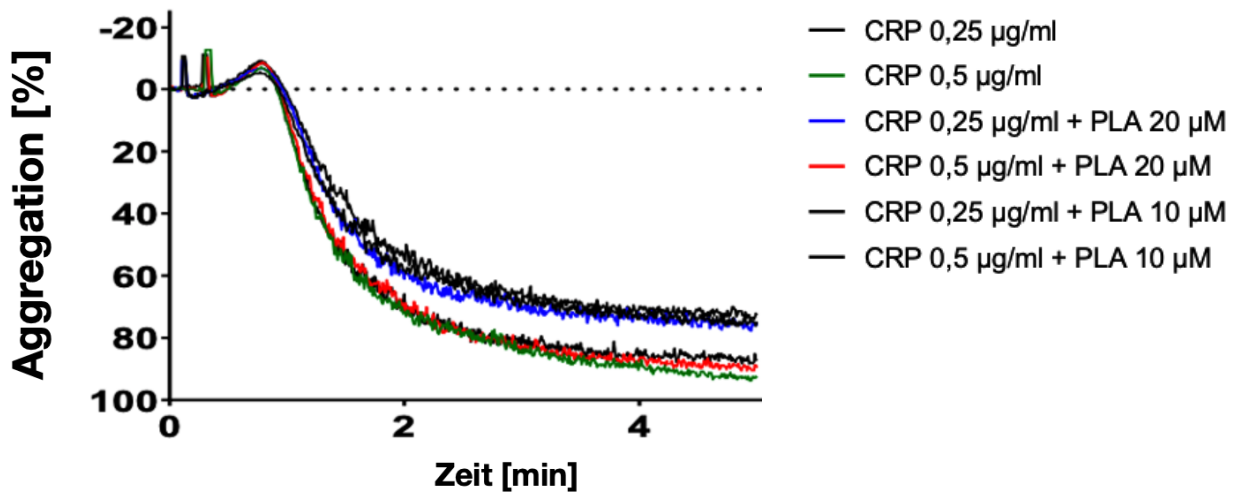


Abbildung 18: Zeitliche Änderung der Aggregation unter CRP Stimulation und Verwendung des Phospholipase - A2 - Inhibitors

Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs unter CRP Stimulation vergleichend mit und ohne PLA Inhibition, Messdauer 5 Minuten.

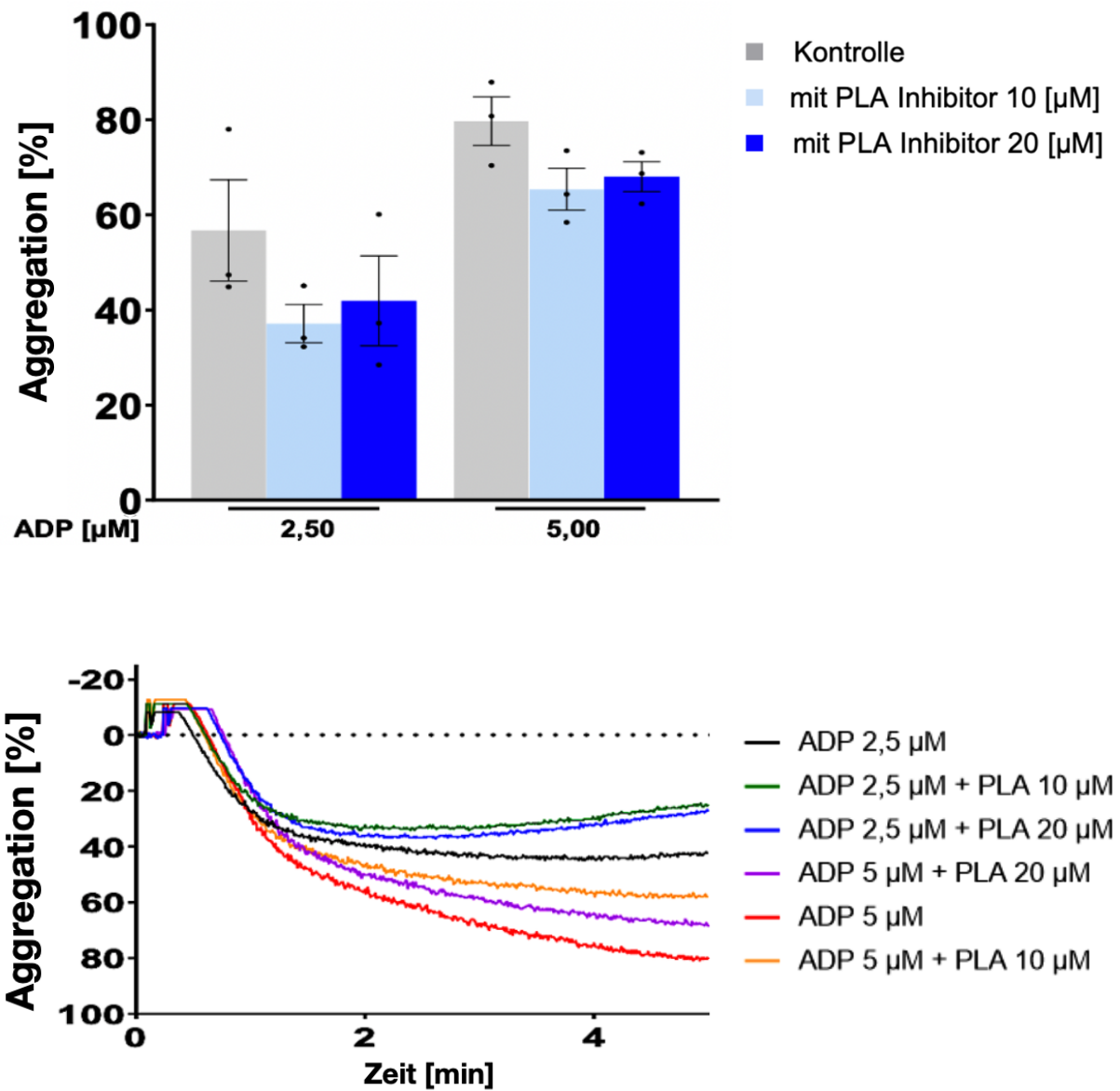


Abbildung 19: Darstellung der Wirkung der PLA Inhibition unter ADP Stimulation

Obere Grafik: Vergleich der maximalen Aggregation unter ADP Stimulation vergleichend mit und ohne PLA Inhibition. N = 3.

Untere Grafik: Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs unter ADP Stimulation vergleichend zur PLA Inhibition. Messdauer: 5 Minuten.

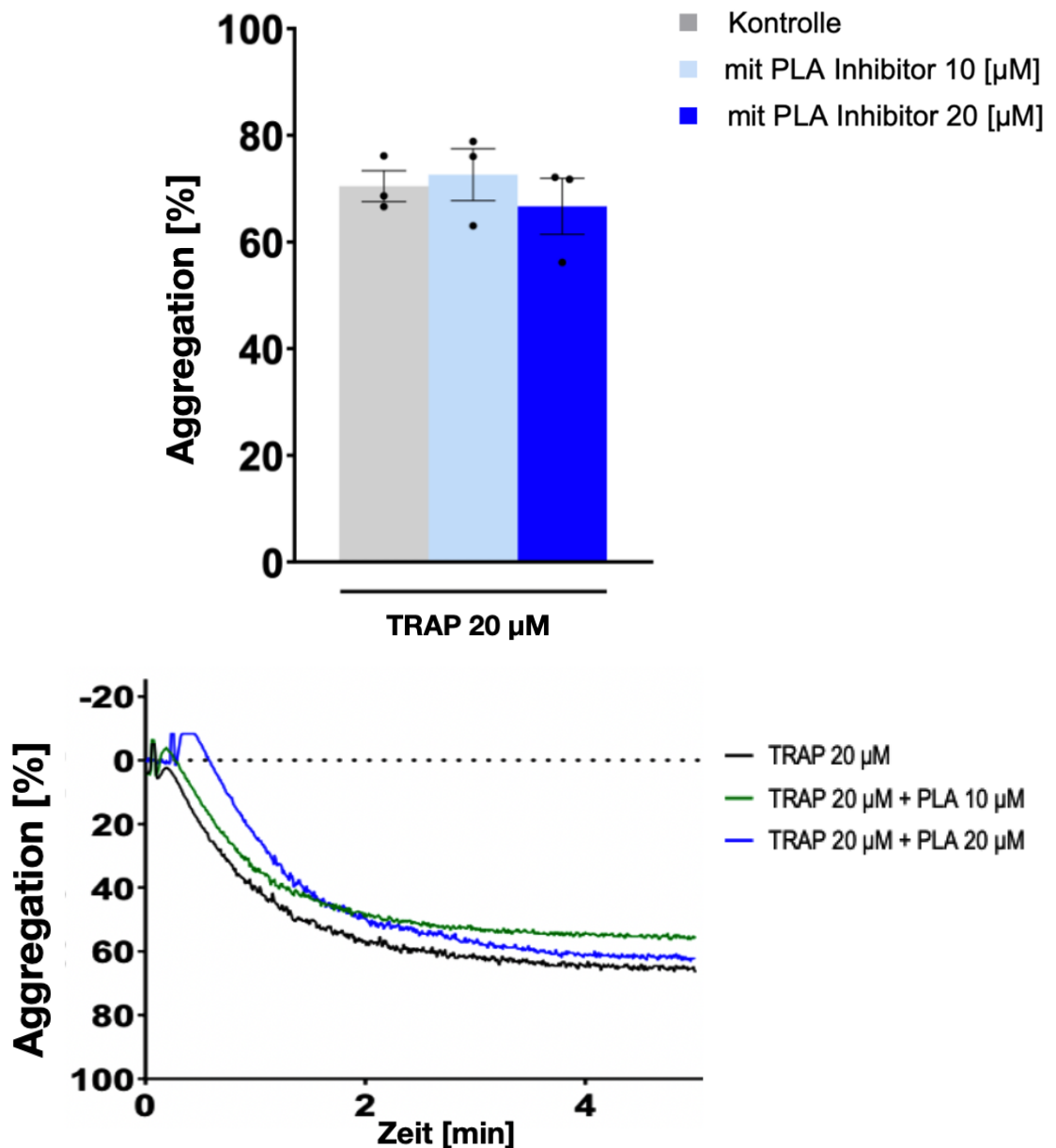


Abbildung 20: Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition auf die Thrombozytenaggregation unter TRAP-Stimulation

Obere Grafik: Messung der maximalen Aggregation unter TRAP Stimulation vergleichend mit und ohne PLA Inhibition. N = 3.

Untere Grafik: Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs unter TRAP Stimulation, vergleichend zur PLA Inhibition. Messdauer: 5 Minuten.

Bei der Stimulation durch CRP und TRAP ließen sich keine wesentlichen Effekte der Phospholipase A2 Inhibition auf die Aggregationsfähigkeiten der Thrombozyten darstellen. Unter ADP Stimulation hingegen kam es zu einer leichten Reduktion.

3.3.3. Einfluss der Phospholipase A2 auf die lysosomale Granula Degranulation

In der folgenden Grafik wird der Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition auf die lysosomale Granula Degranulation beschrieben. Die Erhebung der Daten erfolgt durch Stimulation mit Hämin, CRP, ADP und TRAP in jeweils einer Konzentration.

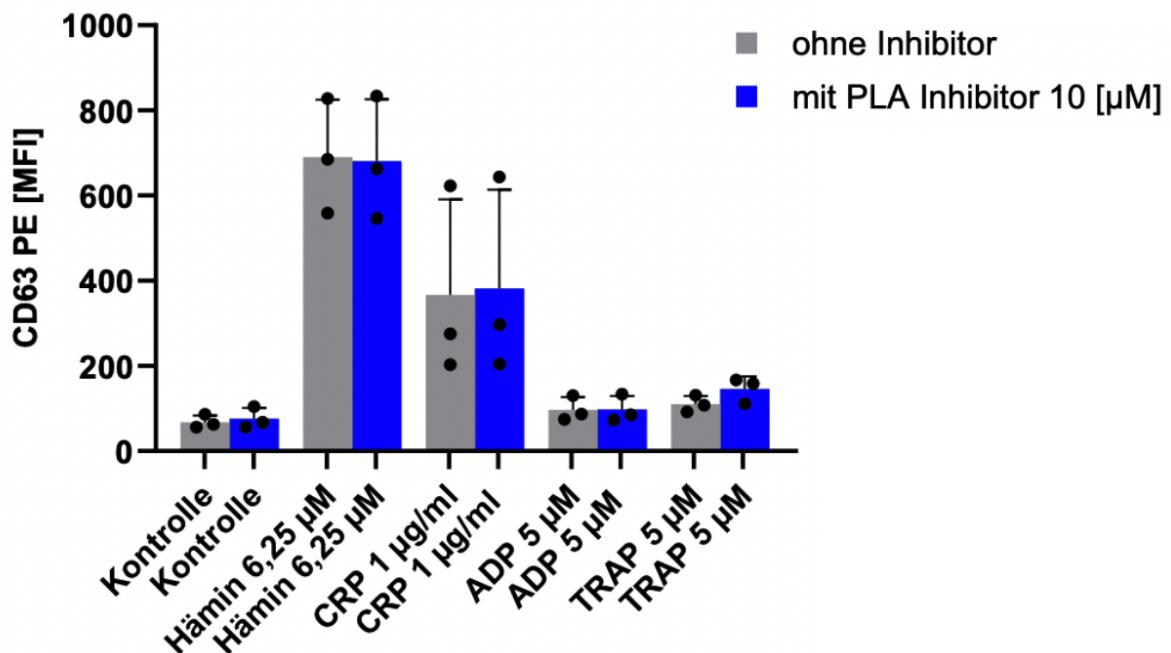


Abbildung 21: Vergleichender Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition auf die Expression von CD63

Betrachtung der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression unter differentieller Stimulation der Thrombozyten im Vergleich mit - (dunkelblau) und ohne Inhibitor (grau). PLA2 Inhibitorkonzentration 10 µM, n = 3.

Die Grafik zeigt keinen Effekt in der Expression von CD63 auf der Oberfläche humaner Thrombozyten bei Verwendung einer Phospholipase A2 Inhibition und der Stimulation der Thrombozyten mittels Hämin, CRP, ADP oder TRAP.

3.4. Einfluss der Furininhibition

Um den hypothetisch vermuteten Effekt der Proproteinkonvertase Furin auf die Thrombozytengranuladegranulation zu bestätigen, erfolgte eine Inhibierung dieser durch etablierte Furininhibitoren.

3.4.1. Einfluss der Furininhibition auf die Alpha-Granula Degranulierung

Zunächst wird die Alpha-Granula Degranulierung humaner Thrombozyten untersucht. Als Marker für die genannte Degranulierung dient P-Selektin, welches durchflusszytometrisch auf der Thrombozytenoberfläche quantifiziert werden kann.

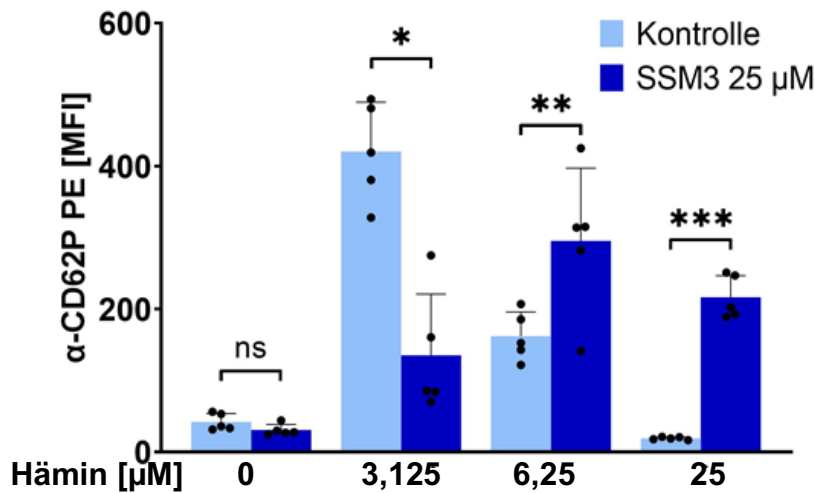


Abbildung 22 [25]: Furininhibition reduziert das CD62P „Shedding“ [25] unter Häminstimulation

Konzentrationsreihe mit 3 Konzentrationen (hellblau) und eingesetzter Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau). Statistik: Ordinary one-way ANOVA: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, $n = 5$. Grafik modifiziert nach Figure 4A (Fink et.al. *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI*) Experiment in Kooperation bearbeitet von Dr. Rohlfing A. und Fink A.

In *Abbildung 22* ist zu erkennen, dass die Expression von CD62P unter Häminstimulation zunächst ansteigt und bei weiter steigenden Häminkonzentrationen letztlich absinkt. Dieses „Shedding“ [25] lässt sich durch die Inhibition von Furin signifikant, im Sinne eines „Rescue“ [25], reduzieren.

In den folgenden Abbildungen werden die bereits verwendeten Stimulatoren CRP, ADP und TRAP und die Wirkung der Furininhibitoren SSM3 und Hexa D Arginin differentiell aufgearbeitet. Anhand der folgenden Daten soll überprüft werden, ob der Expressionsanstieg, der in Abschnitt 3.1 analysiert wurde, durch die Inhibition von Furin beeinflusst werden kann.

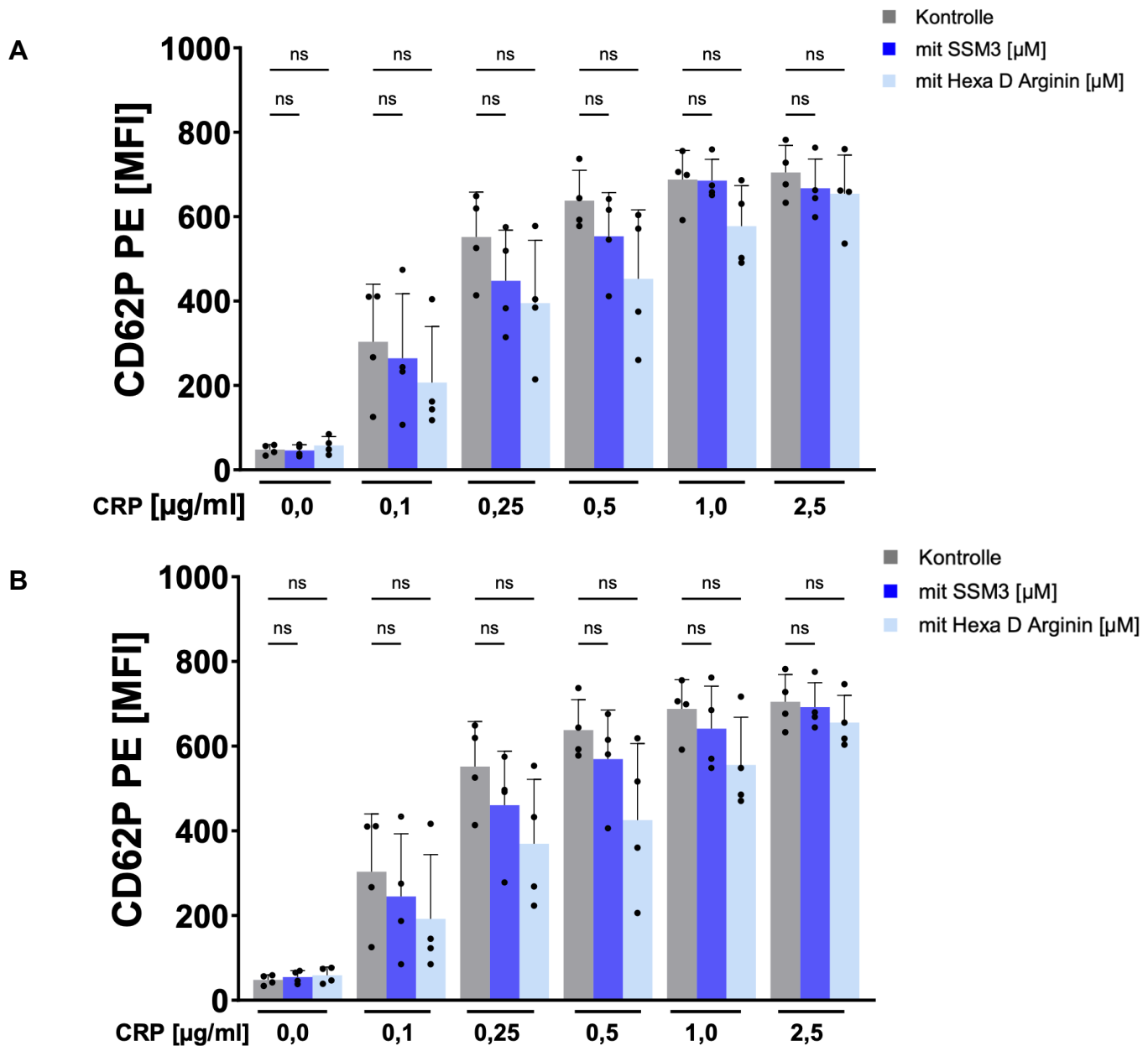


Abbildung 23: Einfluss der Furininhibition auf die CD62P Expression unter CRP Stimulation

Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Expression unter Stimulation mit CRP, vergleichen mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit je 5 Konzentrationen CRP im Vergleich mit je 2 Konzentrationen Inhibitor. **A:** CRP + SSM3 25 µM / D6R 25 µM. **B:** CRP + SSM3 / D6Rinin 12.5 µM; Grau: Kontrolle, ohne Inhibitor; Dunkelblau: Mit SSM3; Hellblau: mit D6R. n = 4. Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest; ns: nicht signifikant.

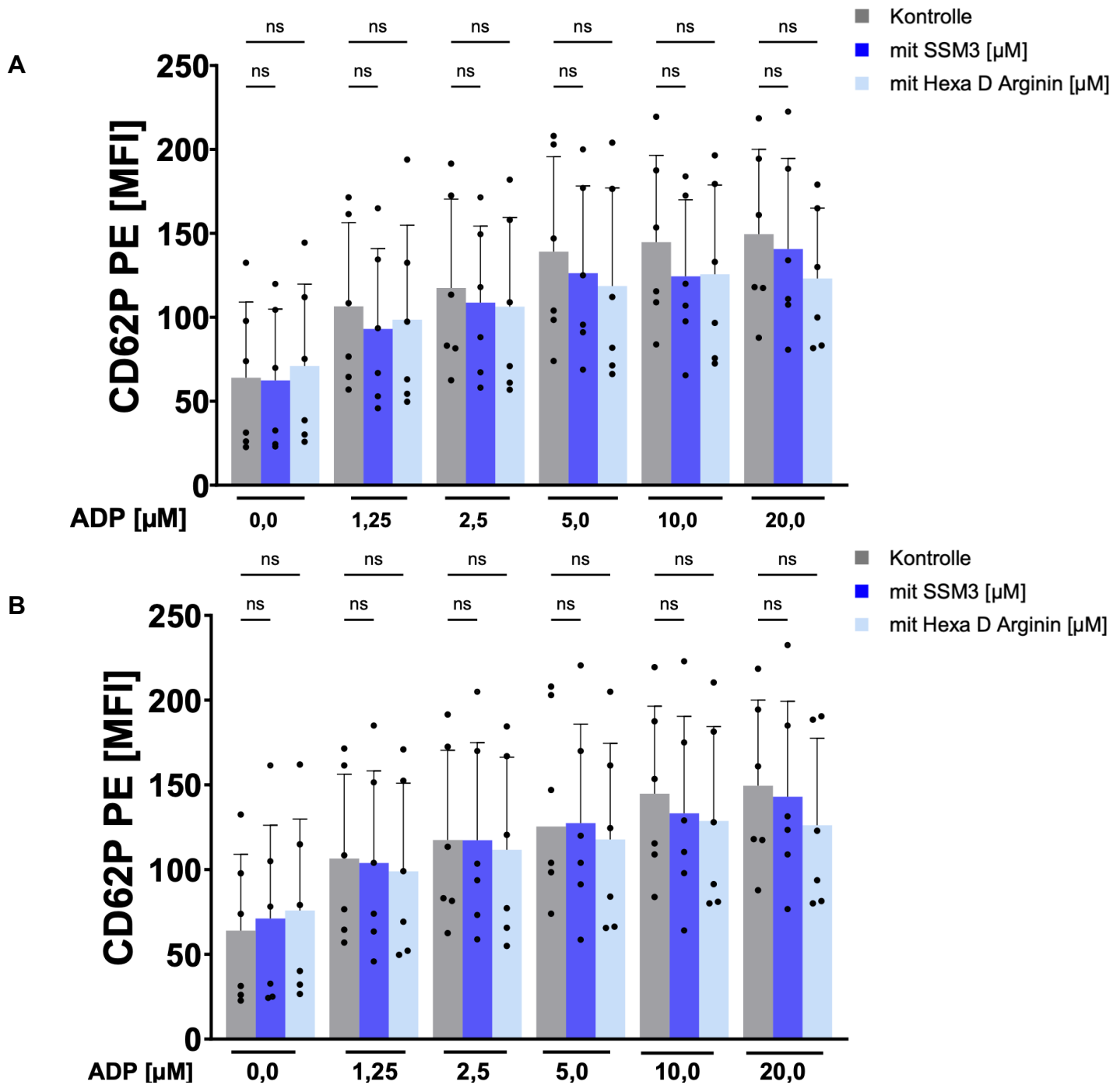


Abbildung 24: Furineinfluss auf die CD62P Expression unter ADP-Stimulation

Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Expression unter Stimulation mit ADP, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit 5 Konzentrationen ADP im Vergleich zu 2 Konzentrationen Inhibitor. **A:** ADP + SSM3 25 µM / D6R 25 µM. **B:** ADP + SSM3 12.5 µM / D6R 12.5 µM. Grau: Kontrolle, ohne Inhibitor, Dunkelblau: Mit SSM3, Hellblau: D6R. Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, n = 6.

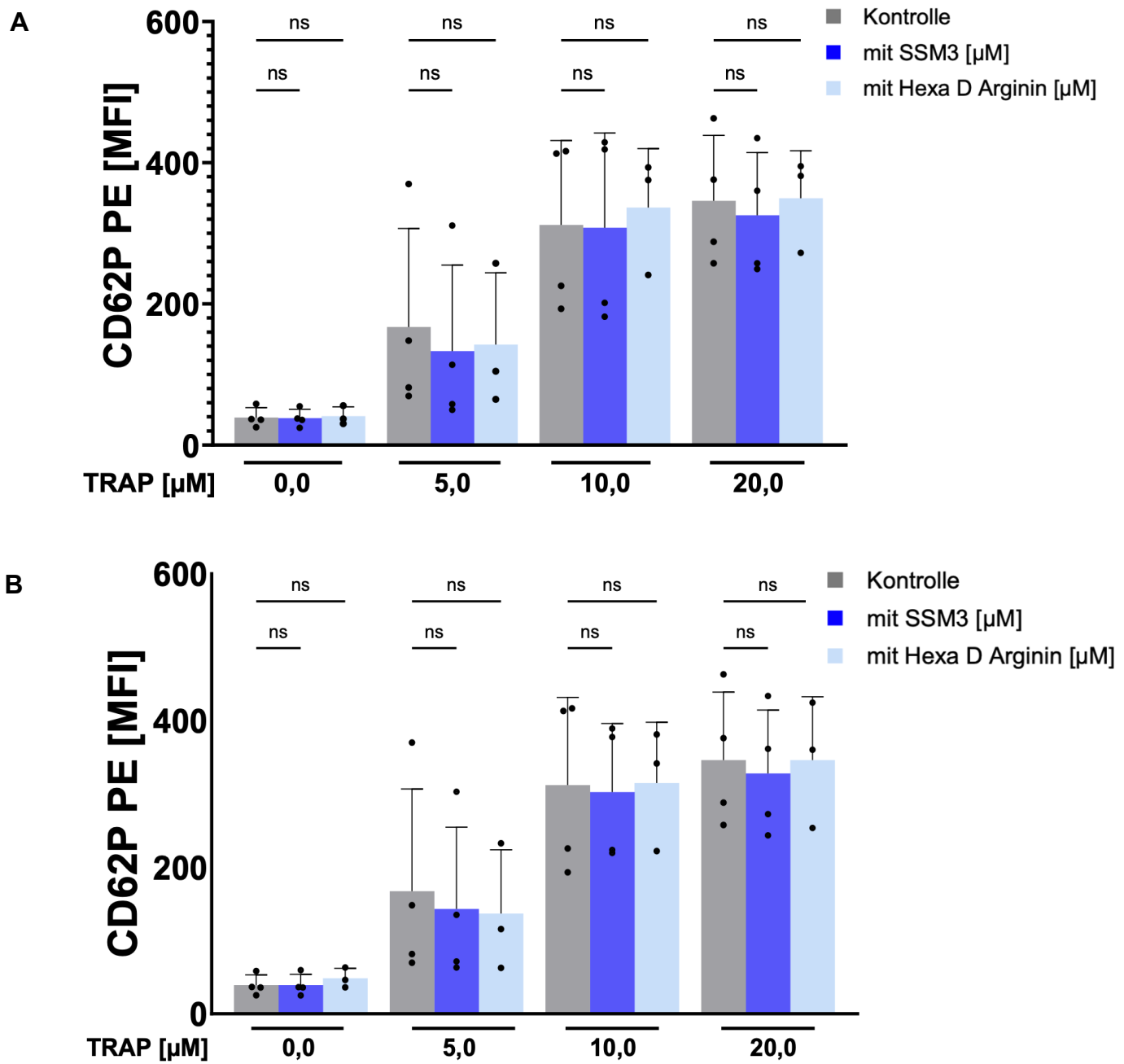


Abbildung 25: Einfluss der Furininhibition auf die CD62P Expression unter TRAP-Stimulation

Statistische Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD62P Expression unter Stimulation mit TRAP, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit je 3 Konzentrationen TRAP und je 2 Konzentrationen Inhibitor. **A:** TRAP + SSM3 25 µM D6R 25 µM, **B:** TRAP + SSM3 / D6R 12.5 µM. Grau: Kontrolle, ohne Inhibitor, Dunkelblau: Mit SSM3, Hellblau: mit D6R. Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, n = 4.

In der *Abbildung 23 – 25* ist zu entnehmen, dass die Stimulatoren einen Anstieg der CD62P Expression und somit der Alpha-Granula Degranulierung zur Folge haben. Dieser Anstieg ist durch Furininhibition bei CRP, ADP und TRAP-Stimulation nicht signifikant beeinflussbar. Deskriptiv spielt Furin somit im Prozess der Degranulierung nur bei Häminstimulation (*Abbildung 22*) eine signifikante Rolle.

3.4.2. Furinwirkung auf Thrombozytenaggregation

Im nächsten Teil dieser Dissertation soll überprüft werden, ob Furin Einfluss auf die Thrombozytenfunktionalität nimmt. Die Funktionalität wird mittels Aggregometrie untersucht. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe zeigte sich ein signifikanter Abfall der Aggregationsfähigkeit humaner Thrombozyten bei Häminstimulation im Vergleich zu anderen Proteasehemmern (siehe *Abbildung 28*). Im Folgenden die vergleichende Analyse des Aggregationsverhaltens humaner Thrombozyten bei Verwendung der Stimulatoren Hämin, CRP, ADP und TRAP und Inhibition von Furin mittels SSM3.

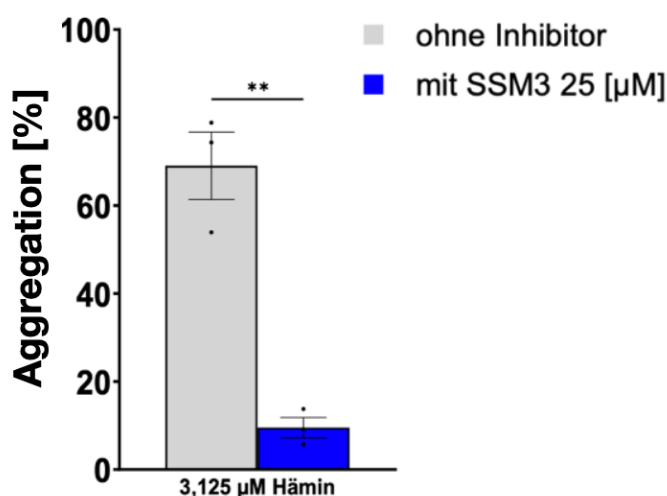


Abbildung 26: Vergleich der maximalen Aggregation häminstimulierter humaner Thrombozyten mit und ohne Furininhibition

Statistische Analyse der maximalen Aggregationswirkung unter Häminstimulation (grau), vergleichend zur Furininhibition mit SSM3 (dunkelblau). Statistik: Gepaarter *t* Test: ** $p \leq 0.01$, $n = 3$.

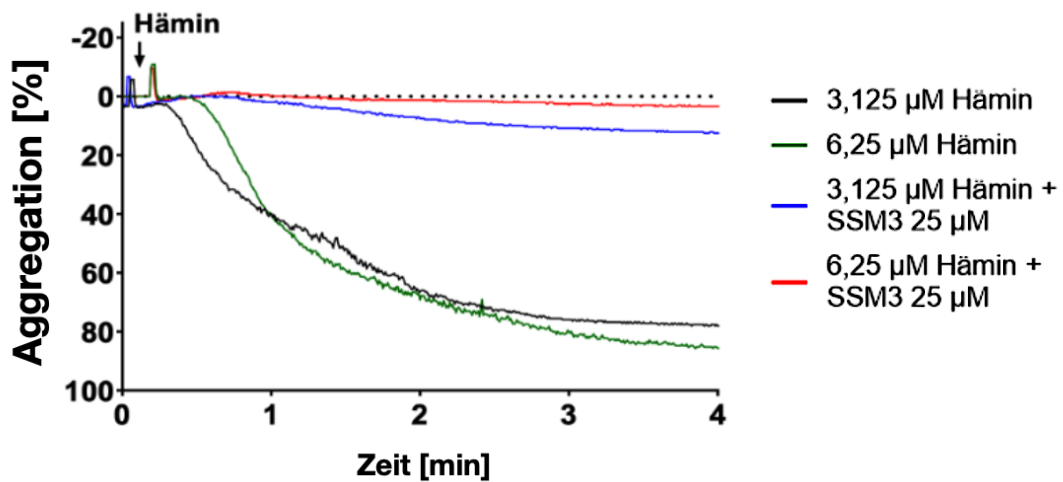


Abbildung 27: Zeitliche Änderung der Aggregation unter Häminstimulation und Furininhibition

Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs unter Häminstimulation, vergleichend zur Furininhibition durch D6R und SSM3. Messintervall: 4 Min.

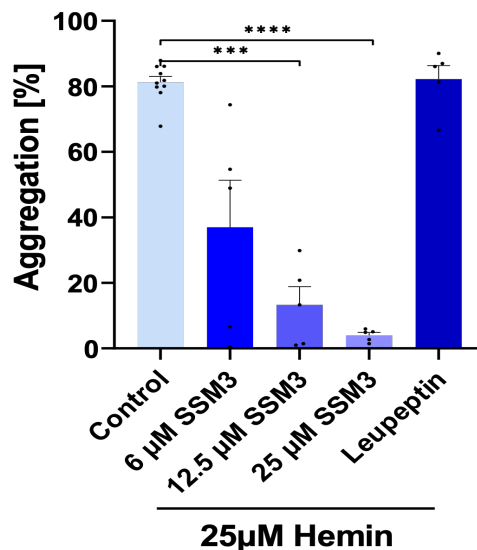


Abbildung 28 [25]: Vergleich der Einflussnahme verschiedener Proteaseinhibitoren auf die hämininduzierte Aggregationsfähigkeit

Verwendung des Furininhibitors SSM3 in 3 Konzentrationen, vergleichend dazu der Proteaseinhibitor Leupeptin. Statistik: Mixed-effects Analyse mit Tukey's Mehrfachvergleichstest: *** $p \leq 0.001$. **** $p \leq 0.0001$. $n \geq 4$. Experiment in Kooperation bearbeitet von Dr. Rohlfing A. und Fink A. Grafik modifiziert nach Figure 3D. (Fink et.al. The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI).

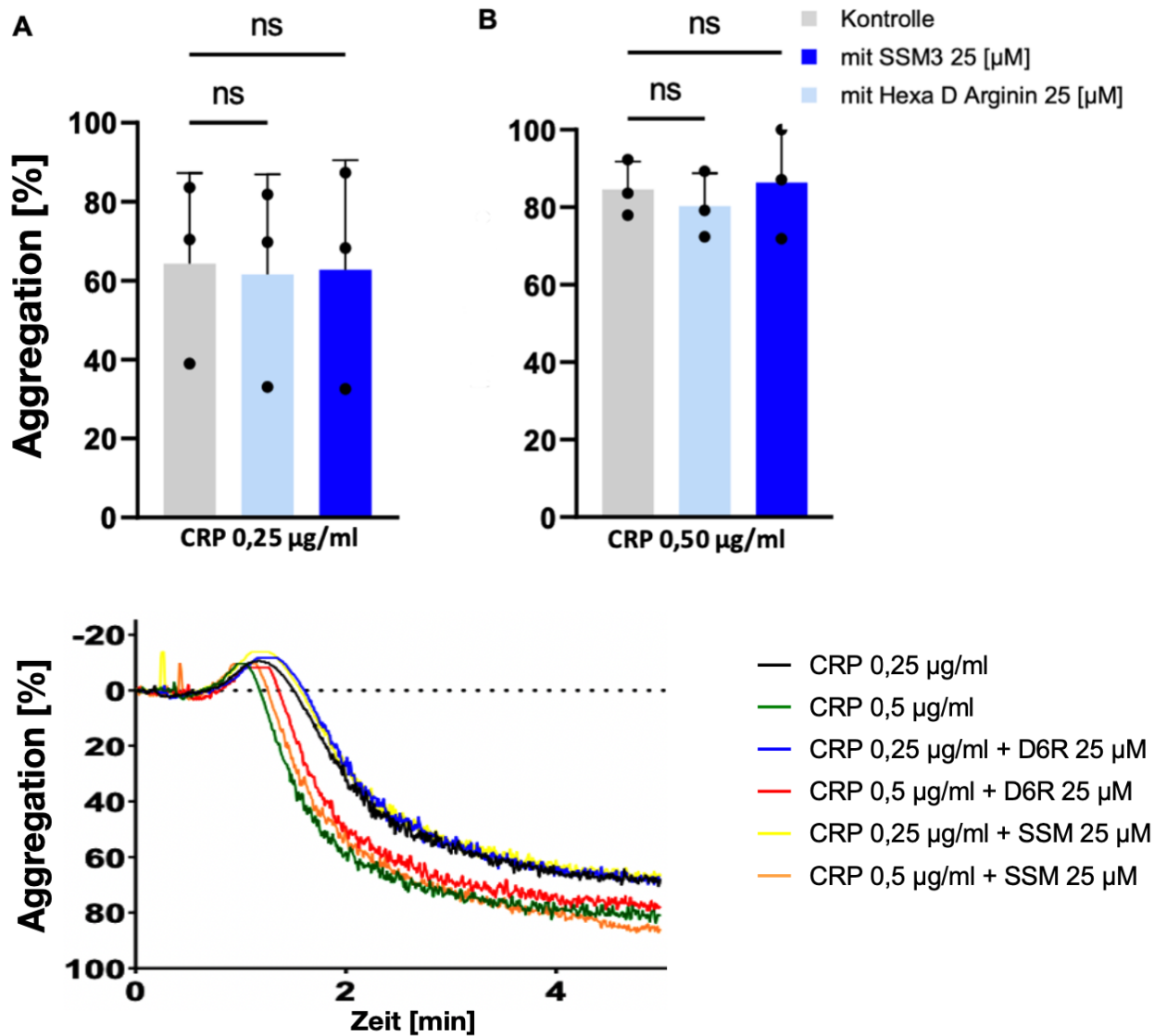


Abbildung 29: Aggregationsverhalten unter Furininhibition und CRP Stimulation

Obere Reihe: Maximale Aggregation unter Stimulation mit CRP 0.25 µg/ml (A) und 0.50 µg/ml (B), vergleichend mit und ohne Furininhibition. Grau: ohne Inhibitor, Hellblau: mit D6R 25 µM, Dunkelblau: mit SSM3 25 µM. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, n = 3.

Untere Reihe: Repräsentative Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Aggregation unter CRP Stimulation und Furininhibition durch SSM3 und D6R je 25 µM. Messintervall 5 Minuten.

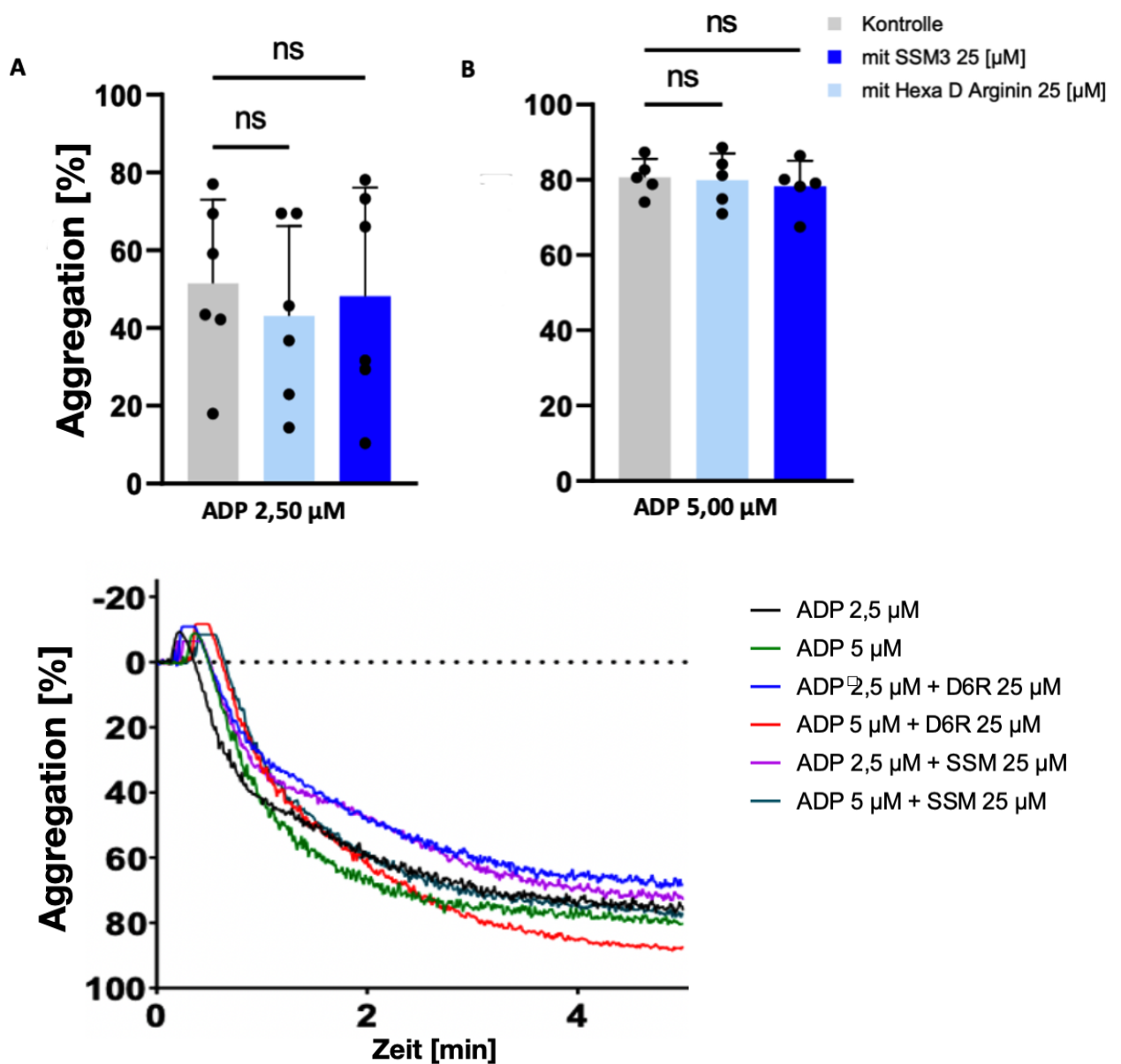


Abbildung 30: Aggregationsverhalten unter Furininhibition und ADP Stimulation

Obere Reihe: Maximalke Aggregation unter ADP Stimulation, ADP 2.50 µM (A) und 5.00 µM (B), vergleichend mit und ohne Furininhibition. Grau: Kontrolle. Hellblau: mit D6R 25 µM. Dunkelblau: mit SSM3 25 µM. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, $n \geq 5$.

Untere Reihe: Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs unter ADP Stimulation und Furininhibition durch SSM3 und D6R je 25 µM. Messintervall: 5 Minuten.

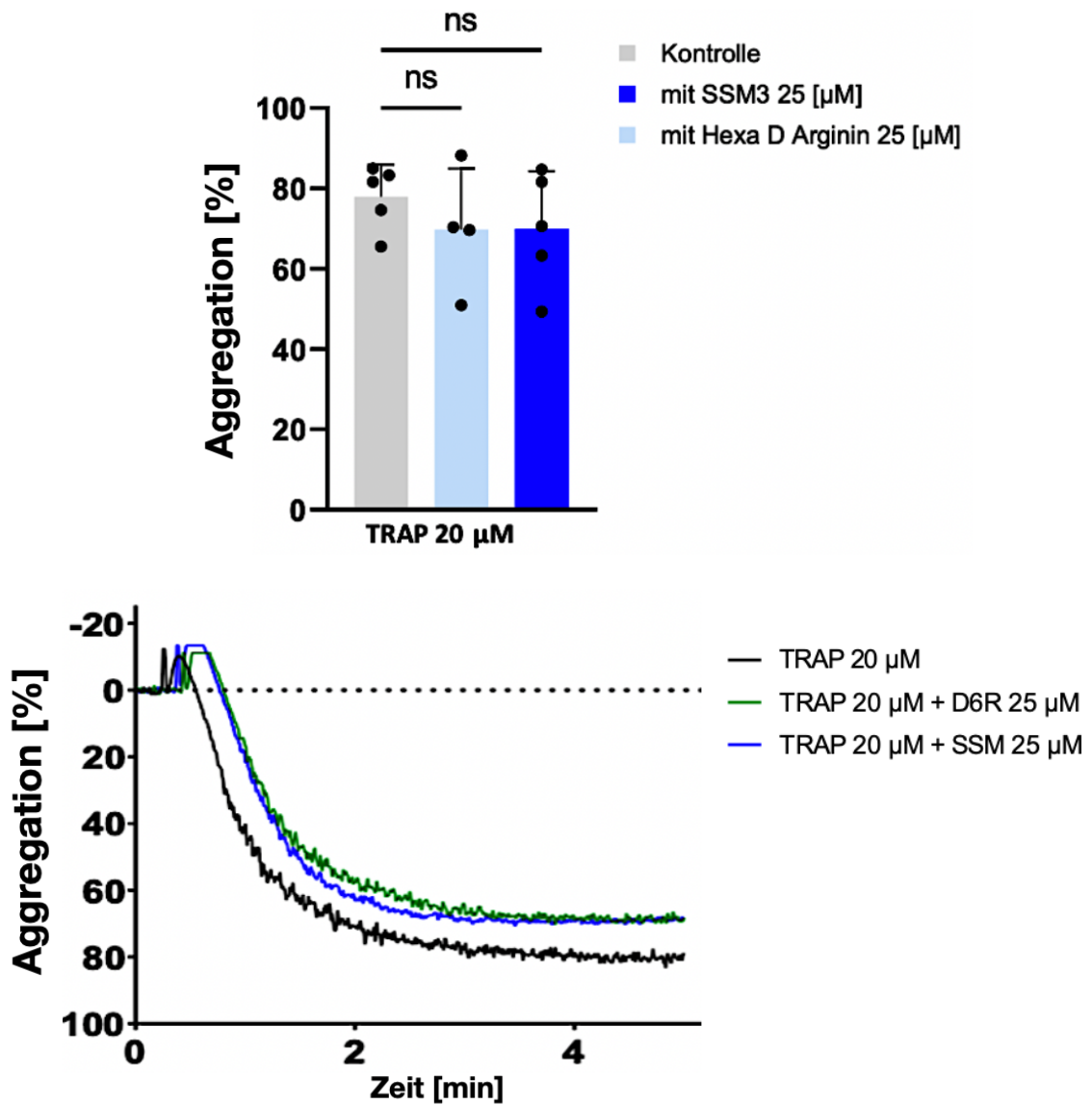


Abbildung 31: Aggregationsverhalten unter Furininhibition und TRAP-Stimulation

Obere Reihe: Statistische Auswertung der maximalen Aggregation unter TRAP Stimulation, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Grau: TRAP 20 µM, Hellblau: TRAP 20 µM + D6R 25 µM, Dunkelblau: TRAP 20 µM + SSM3 25 µM. Statistik: Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest : ns: nicht signifikant, n = 5.

Untere Reihe: Repräsentative Darstellung des Aggregationsverlaufs mit und ohne Furininhibition durch SSM3 und D6R je 25 µM unter TRAP Stimulation. Messintervall 5 Minuten.

Die gemessenen Daten beschreiben eine Zunahme der Aggregation humaner Thrombozyten unter Häminstimulation. Diese Aggregation lässt sich durch Furininhibition signifikant reduzieren. Differentiell dazu lassen sich für CRP, ADP und TRAP keine signifikanten Effekte auf die Aggregationsfähigkeiten der Thrombozyten durch Furininhibition beschreiben.

Aus den Daten der *Abbildung 26* bis *Abbildung 31* lässt sich somit ableiten, dass Furin nur im hämininduziertem Aktivierungsweg der Aggregation und somit der wesentlichen Funktion der humanen Thrombozyten eine signifikante Rolle spielt.

3.4.3. Lysosomale Granula Degranulation unter Furininhibition

Im weiteren Verlauf soll nun die lysosomale Granula Degranulation und der Einfluss von Furin hierauf betrachtet werden. Hierzu wurden humane Thrombozyten mit Hämin, und im Vergleich mit CRP, ADP und TRAP stimuliert und zunächst die CD63 Expression, beziehungsweise dessen Änderung unter Furininhibition, betrachtet. Als erster Simulator wird Hämin untersucht. Die Ergebnisse sind, erneut aufgetrennt für die Furininhibitoren SSM3 und D6R in den folgenden beiden Abbildungen dargestellt.

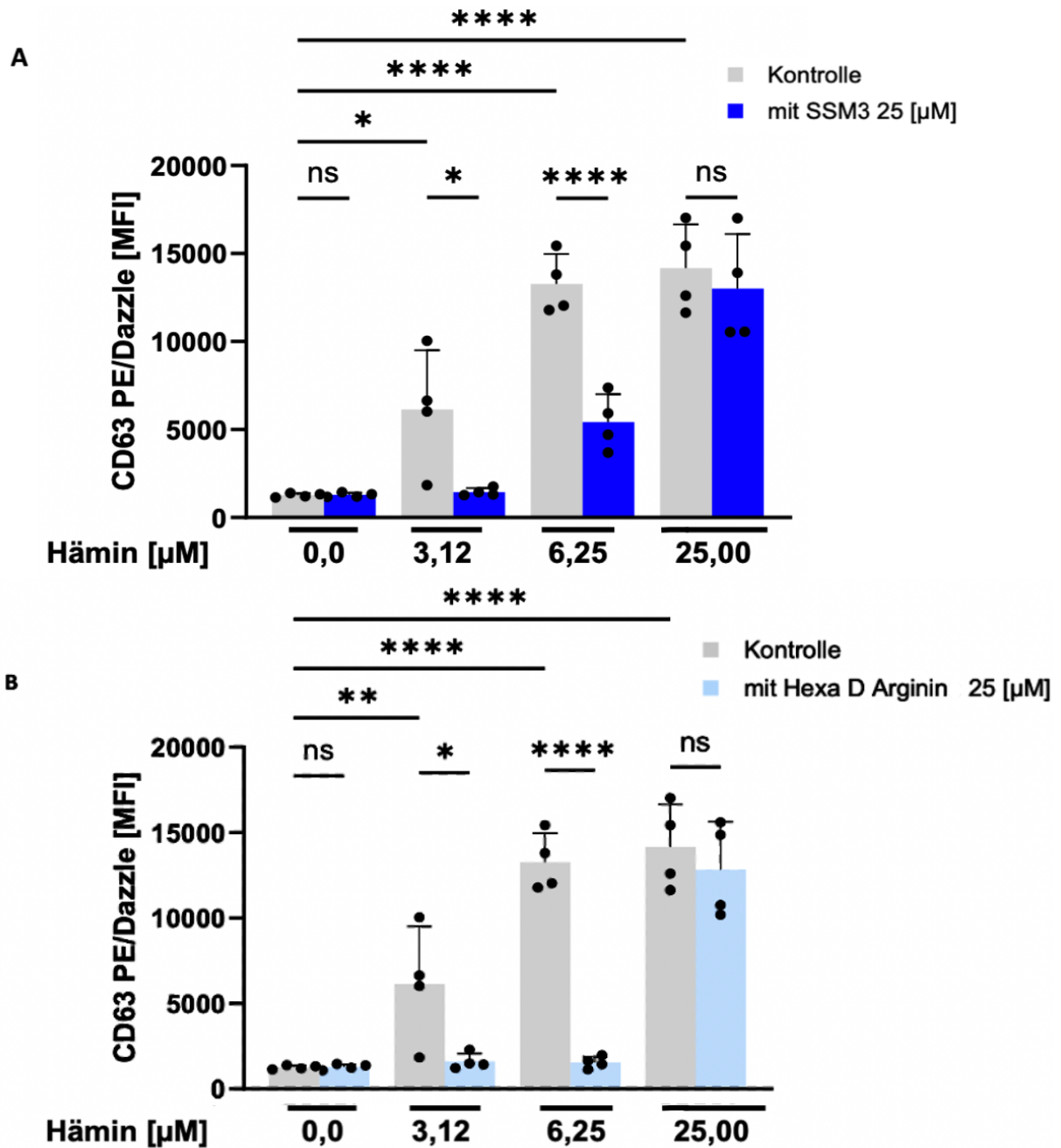


Abbildung 32 [52]: Furin beeinflusst die CD63 Expression unter Häminstimulation

Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression unter Häminstimulation, differentiell zur Furininhibition. Konzentrationsreihe mit drei Konzentrationen und Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau, **A**) und D6R 25 µM (hellblau, **B**). FACS Fortessa Messung. Statistik: Ordinary one - way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$, $n = 4$. Grafik modifiziert nach Figure 1 und 2 A (Dicenta, Pelzer et al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Der *Abbildung 32*, zusammen mit der *Abbildung 7*, ist zu entnehmen, dass die Expression von CD63 als lysosomenmembranassoziierter Marker bei zunehmender Häminstimulation ansteigt, diese Expressionszunahme jedoch durch die Furininhibition bei niedriger und mittlerer Häminkonzentration signifikant reduziert werden, beziehungsweise nahezu auf Ruheniveau, gehalten werden kann.

In den folgenden Abbildungen sollen diese Effekte für die Stimulatoren CRP, ADP und TRAP überprüft und deskriptiv beschrieben werden.

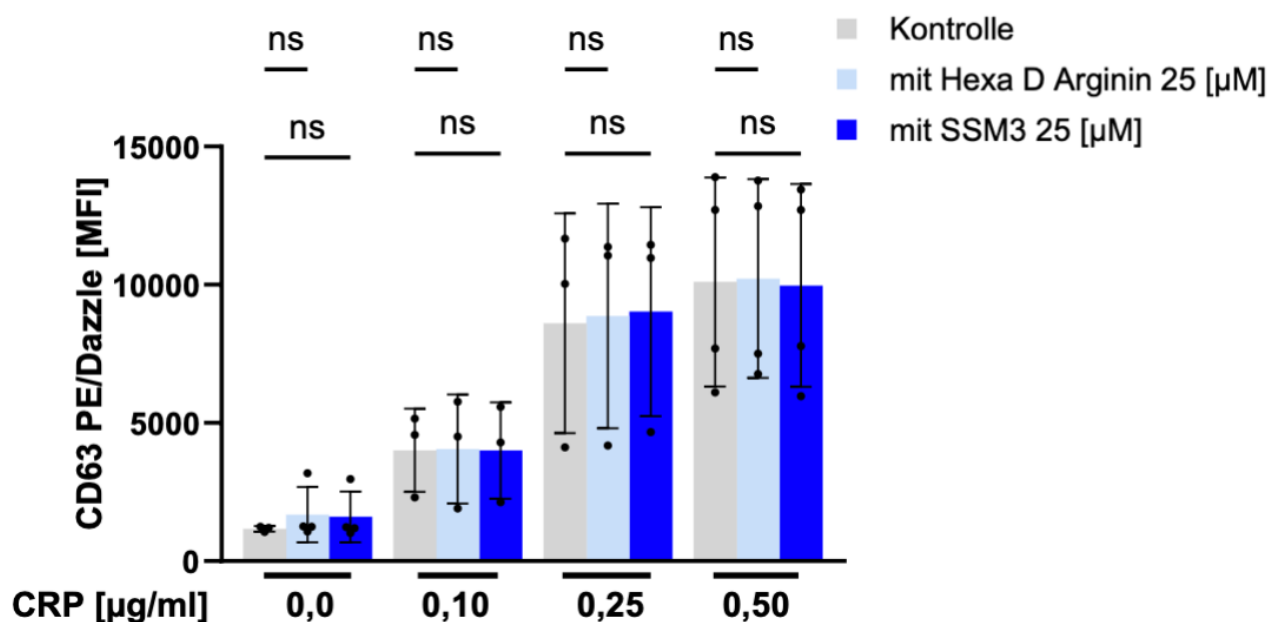


Abbildung 33 [52]: Furininhibition beeinflusst nicht die CD63 Expression unter CRP Stimulation

Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression unter CRP Stimulation, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit 3 Konzentration als Stimulans und Verwendung einer Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau) und D6R 25 µM (hellblau). FACS Fortessa Messung. PE/Dazzle gelabelter Antikörper. Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, $n \geq 3$. Grafik modifiziert nach Figure 1 B und 2 C, (Dicenta, Pelzer et. al.: *The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets*).

Die *Abbildung 33* zusammen mit *Abbildung 9* stellt einen signifikanten Anstieg der CD63 Expression dar, jedoch keinen Einfluss hierauf durch die Furininhibition.

Als nächster Simulator wird die Expression von CD63 unter ADP-Stimulation analysiert. Der Einfluss der Furininhibition wird in der folgenden *Abbildung 34* betrachtet.

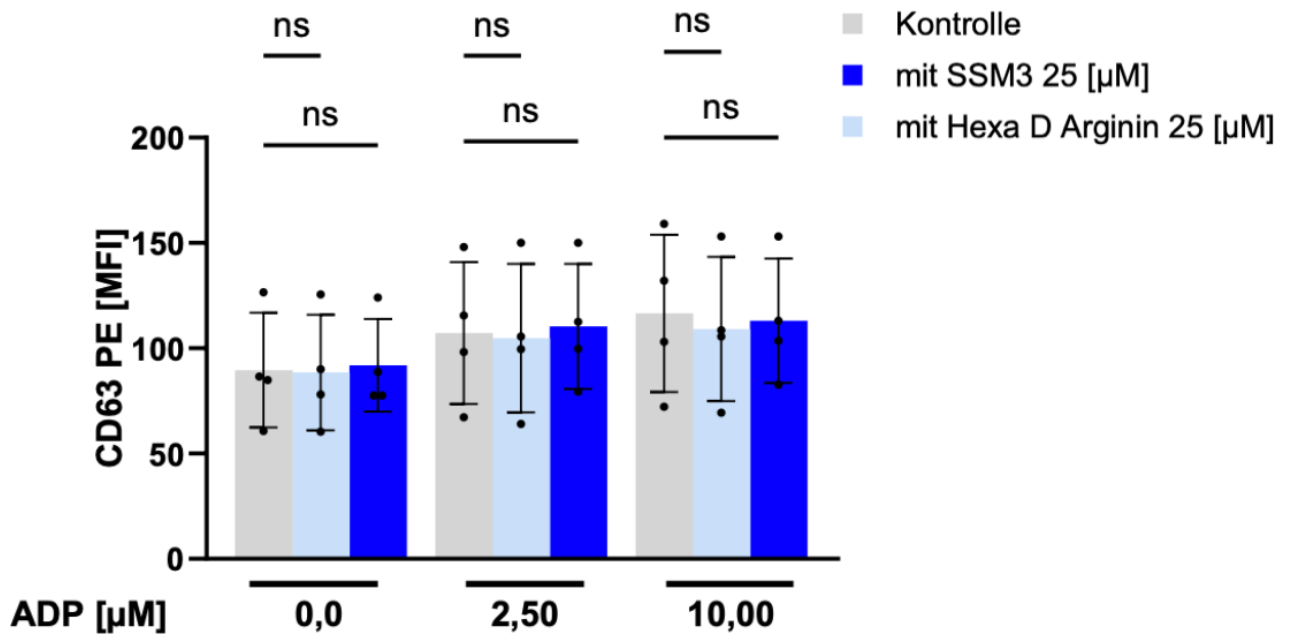


Abbildung 34 [52]: Furininhibition hat keinen Einfluss auf die CD63 Expression unter ADP Stimulation

Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression unter ADP Stimulation, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit 2 Konzentrationen bei Verwendung der Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau) und D6R 25 µM (hellblau). Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, n = 4. Grafik modifiziert nach Figure 1 D und 2 B, (Dicenta, Pelzer et al: *The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets*).

Der *Abbildung 34*, in Verbindung mit *Abbildung 8*, ist zu entnehmen, dass es unter ADP-Stimulation zu keinem signifikanten Anstieg der CD63 Expression als Marker für lysosomale Granula Degranulation beobachtet werden kann. Auch die Furininhibition nimmt keinen signifikanten Einfluss hierauf.

Der letzte Simulator, der im Kontext der lysosomalen Degranulation humaner Thrombozyten betrachtet werden soll, ist TRAP.

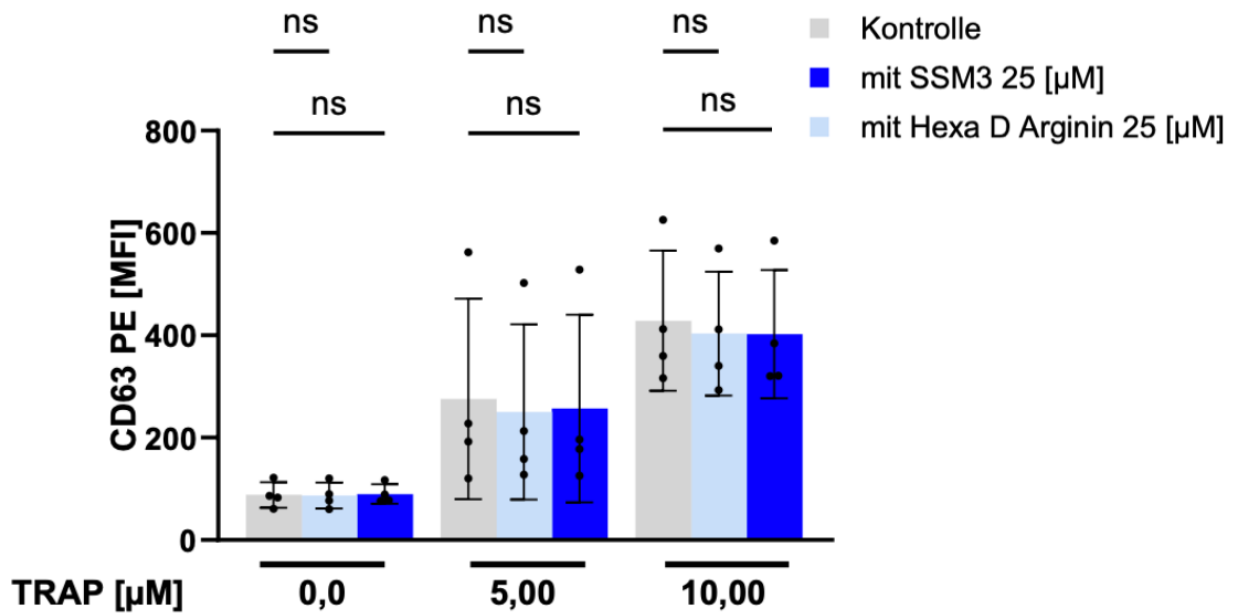


Abbildung 35 [52]: Furininhibition ändert nicht die CD63 Expression unter TRAP-Stimulation

Analyse der durchflusszytometrisch erhobenen CD63 Expression unter TRAP Stimulation, vergleichend mit und ohne Furininhibition. Konzentrationsreihe mit 2 Konzentrationen und Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau) beziehungsweise D6R 25 µM (hellblau). Ordinary one way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, $n = 4$. Grafik modifiziert nach Figure 1C und 2D, (Dicenta, Pelzer et al: *The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets*).

Die Daten der *Abbildung 35*, in Zusammenhang mit *Abbildung 10*, zeigen einen signifikanten Anstieg der CD63 Expression in höheren TRAP Konzentrationen. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant durch die Inhibition von Furin zu beeinflussen.

3.4.4. Visuelle Darstellung des Furineinflusses auf die Lysosomenzahl

Zur Analyse der Anzahl der thrombozytären Lysosomen erfolgte die gezielte *LysoTracker* - Markierung und Auszählung an vitalen Thrombozyten am Fluoreszenzmikroskop. Zur Analyse werden die Mittelwerte der Lysosomenzahl je Thrombozyt ausgewertet. Die Zählung erfolgt manuell und verblindet an 5 Bildern je Kondition. Auf der folgenden Seite 54 sind repräsentative Ausschnitte dieser Bilder dargestellt.

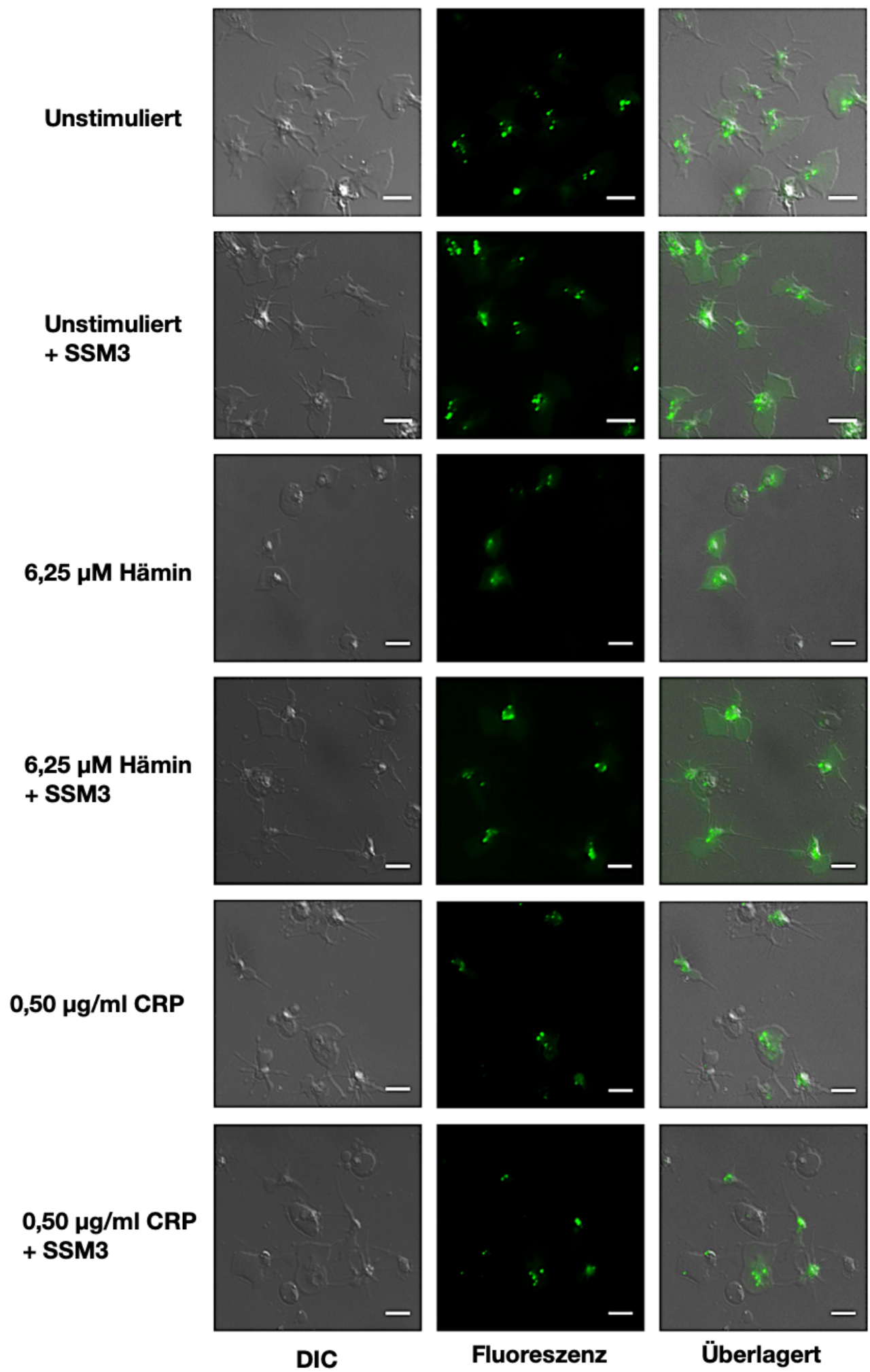


Abbildung 36 [52]: Visualisierung des Furineinfluss auf die absolute Anzahl an Lysosomen je Thrombozyt

Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von verteilten Thrombozyten bei Verwendung eines fluoreszenzfarbstoffes (LysoTracker), der spezifisch nur an Organellen mit dem pH Wert der Lysosomen (intrazellulär, grün) bindet. Die Aufnahmen zeigen das Bild als Differentialinterferenzkontrast (DIC), den gleichen Ausschnitt in der Fluoreszenzaufnahme und beide Bilder überlagert (Merged). Der Balken markiert 5 µm. Aufnahme mit einem 100er Objektiv + Immersionsöl und 10er Okular. Verwendet wurde Hämin und CRP als Stimulans und SSM3 25 µM als Furininhibitor. Grafik modifiziert nach Figure 3A, (Dicenta, Pelzer et.al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Die *Abbildung 36* zeigt die Abnahme des Fluoreszenzsignals bei Stimulation von Hämin im Vergleich zur Kontrollprobe als visuelle Darstellung der Anzahl der Lysosomen je Thrombozyt. Zu erkennen sind Thrombozyten in verschiedenen Aktivierungszuständen mit weniger Lysosomen.

Die CRP Probe dient als Vergleich. Deskriptiv wird eine leichte Abnahme des Lysosomensignals im Vergleich zur Ruhebedingung, erhoben. Es ist jedoch kein Unterschied durch die Verwendung eines Furininhibitors beschreibbar.

Um dies statistisch belegen zu können und auch, um diese manuell, blind ausgezählten Daten zusätzlich zu quantifizieren, sind in den folgenden Abbildungen die Ergebnisse der Auszählung, wie auch eine durchflusszytometrische Quantifizierung des *LysoTracker* durchgeführt und aufgearbeitet worden.

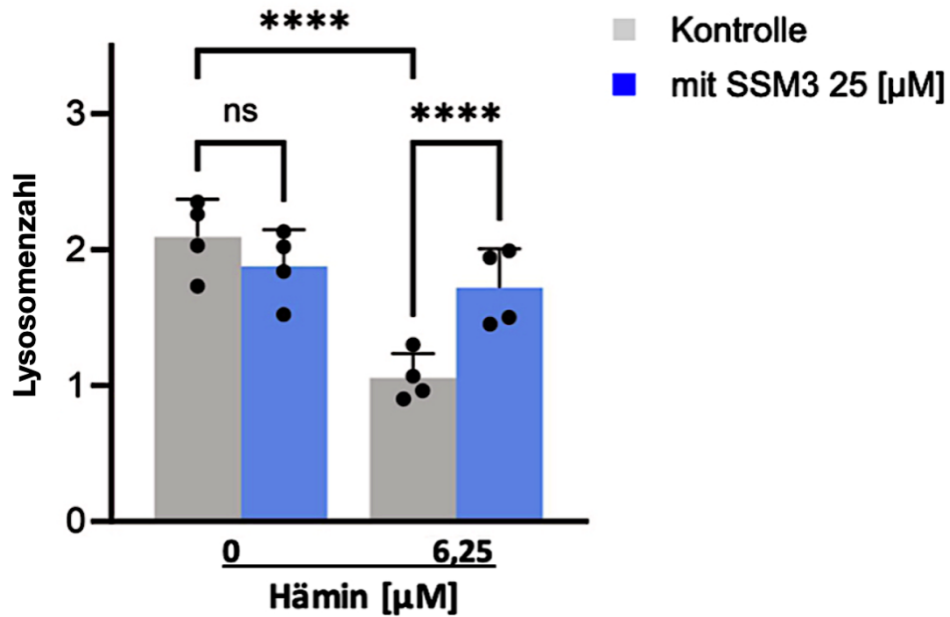


Abbildung 37 [52]: Furininhibition steigert die durchschnittliche Lysosomenzahl je Thrombozyt unter Häminstimulation

Statistische Analyse des Mittelwerts der Lysosomenzahl pro Thrombozyten bei Verwendung des Stimulators Hämin und des Furininhibitors SSM3 (dunkelblau). Ordinary one-way ANOVA mit Tukeys Mehrfachvergleichstest: ns: nicht signifikant, **** $p \leq 0.0001$, $n = 4$. Manuelle blinde Auszählung aus 5 Bildern je Kondition. Grafik aus Figure 3A, (Dicenta, Pelzer et.al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

Die *Abbildung 37* stellt die Ergebnisse der Auszählung graphisch dar, es ist zu erkennen, dass die Lysosomenzahl je Thrombozyten bei Stimulation im Vergleich zur Kontrolle signifikant abnimmt, diese Reduktion jedoch durch Furin signifikant beeinflusst werden kann.

In der folgenden *Abbildung 38* erfolgt die Kontrolle der ausgezählten Daten zur Lysosomenzahl und den Einfluss der Furininhibition auf diese. Die Kontrolle erfolgte durchflusszytometrisch zur Quantifizierung der Signalstärke des *LysoTracker* je Kondition als Hinweis für die Menge an Lysosomen im Thrombozyten. Entgegen dem normalerweise verwendeten Schema wurden die Thrombozyten nach Ablauf der Inkubationszeit nicht fixiert. Die Messung erfolgte unverzüglich an vitalen unfixierten Proben.

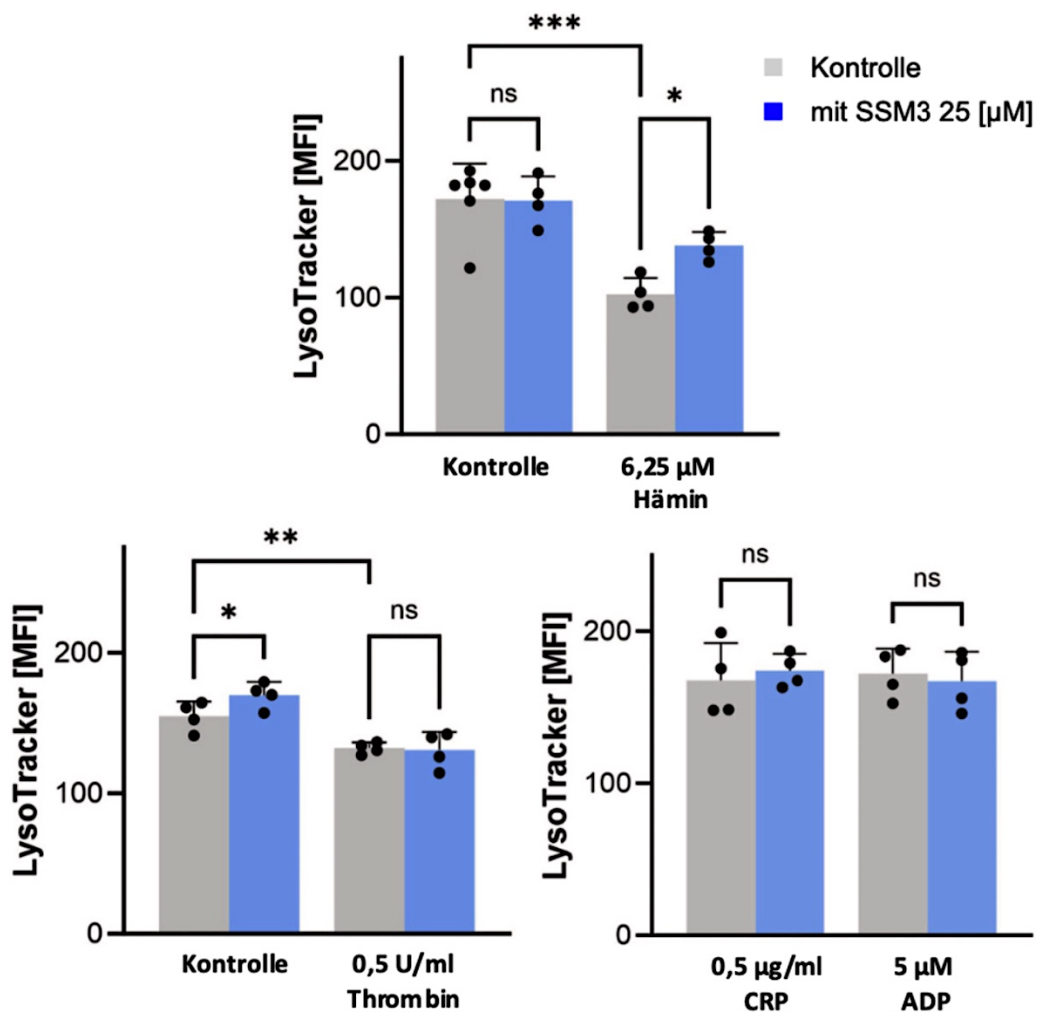


Abbildung 38 [52]: Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen des LysoTracker unter differentieller Thrombozytenstimulation und Furininhibition

Differentielle, durchflusszytometrische Analyse der LysoTracker Signalstärke unter Verwendung von vitalen Thrombozyten. Stimulatoren: Hämin, Thrombin, CRP und ADP, jeweils in einer Konzentration (graue Balken) im Vergleich zueinander und im Vergleich der Effektstärke der Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau). Ordinary one-way ANOVA: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, $n = 4$. Grafik aus Figure 3 B-D, (Dicenta, Pelzer et.al: The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets).

3.4.5. Furinexpression unter Stimulation

Mit dem folgenden Versuchsaufbau sollte die Furinbeteiligung an der hämininduzierten Degranulation der alpha-, delta- und lysosomalen Granula humaner Thrombozyten nochmal gesondert analysiert werden. Hierzu wurde ein FITC gelabelter Fluoreszenzantikörper gegen humanes Furin verwendet.

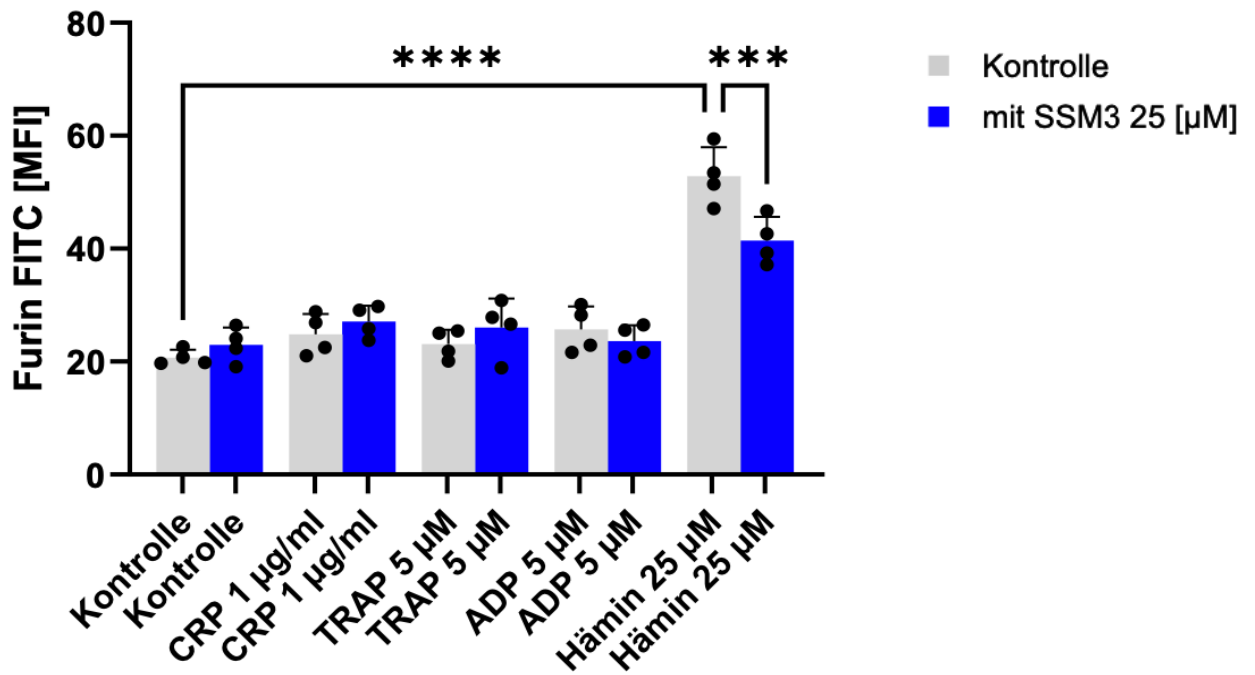


Abbildung 39: Häminabhängige Expressionssteigerung von Furin im Vergleich mit weiteren Stimulatoren und Furininhibition

Differentielle Analyse der Furinexpression unter Stimulation mit CRP, ADP, TRAP und Hämin (jeweils graue Balken), vergleichend zur Furininhibition mittels SSM3 25 µM (dunkelblau). Ordinary one-way ANOVA mit Šidák Mehrfachvergleichstest: *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$, $n = 4$.

Die Ergebnisse der Daten aus *Abbildung 39* zeigen, dass die Furinexpression unter Häminstimulation signifikant ansteigt, während die übrigen Stimulatoren keinen deutlichen Effekt aufweisen. Diese Expressionsänderung unter Häminstimulation lässt sich bei Inhibition von Furin signifikant reduzieren.

4. Diskussion

Die folgende Grafik veranschaulicht einige der wichtigsten Schlüsse aus dieser Dissertation bildlich. Hierzu soll ein erster, graphisch aufgearbeiteter klinischer Bezug hergestellt und die Diskussion der Ergebnisse eingeleitet werden.

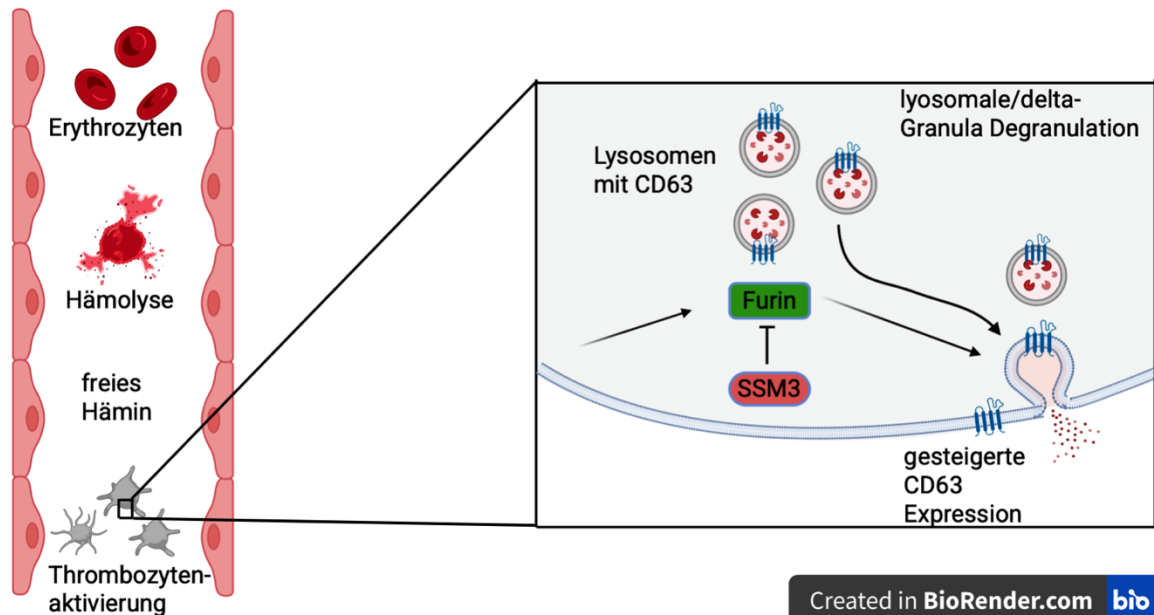


Abbildung 40: Furins Relevanz für die hämininduzierte lysosomale Granula Degranulierung

Die Degranulierung beziehungsweise das Verschmelzen der Lysosomen mit der Thrombozytenoberfläche lässt sich aus der gesteigerten CD63 Expression ableiten. Hämin kann pathophysiologisch zum Beispiel beim Zerfall roter Blutkörperchen intravasal freigesetzt werden. Grafik erstellt mit der freien Version von BioRender.

4.1. Allgemeine Diskussion der verwendeten Methodik

Die Grundlagenforschung dieser Dissertation behandelt die Reaktion humaner Thrombozyten auf differentielle Stimulation und Inhibition. Alle durchgeführten Experimente fanden unter kontrollierten Laborbedingungen *in vitro* statt. Eine *in vivo* Kontrolle der Ergebnisse im Rahmen klinischer Studien oder Tierversuchen fand nicht statt. Die Ergebnisse sind daher in der klinischen Einordnung (siehe 4.6) nicht unbedingt uneingeschränkt auf den (erkrankten) Menschen

übertragbar. Es leitet sich somit keine Handlungsempfehlung aus der Einordnung dieser Dissertationsschrift ab.

Im Rahmen der Datengewinnung wurden verschiedene Spender akquiriert und die Experimente mehrfach durchgeführt und wiederholt. Jeder Spender wurde in jeder Kondition der Versuchsreihe analysiert. Auf diese Weise sollten individuelle Varianzen, als auch Messungengenauigkeiten verringert werden.

Die Blutentnahme erfolgte mittels, allgemein klinisch gebräuchlichen, sterilen 21 Gage Safety-Multifly Kanülen mit Multiadapter. Die Punktion einer geeigneten Vene erfolgte gestaut, die eigentliche Blutentnahme erfolgte, nach Öffnung der Staubinde, ungestaut und unter langsamer, schonender Aspiration [63]. Auf diese Weise sollte die kinetische Belastung für die Thrombozyten so gering wie möglich gehalten werden. Zur Untersuchung wurden humane Thrombozyten gesunder, freiwilliger Spender untersucht, die jegliche Abstinenz von Medikamenten, die nachgewiesen die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, herangezogen. Zu diesen Medikamenten gehören unter Anderem: Aspirin (inhibiert die Thromboxan A₂ Synthese [64]), Clopidogrel (blockiert die ADP Bindung an P₂Y₁₂ [65]), Paracetamol (COX Inhibitor und somit verringerte Thromboxan A₂ Produktion [66]) und Ibuprofen [65-70]. Die Abstinenz musste mindestens 10 Tage anhalten, der durchschnittlichen Lebensdauer humaner Thrombozyten [71].

Es ist nicht auszuschließen, dass in einem klinischen Umfeld, zum Beispiel bei Patienten mit Hämolyse, Sichelzellanämie oder Thalassämie, die Thrombozyten nicht wie beim Gesunden reagieren. Diese Unterschiede werden im Rahmen der Grundlagenforschung dieser Dissertation nicht berücksichtigt. Ebenso wird nicht berücksichtigt, dass Plasmaproteine wie Haptoglobin, Albumin oder Hämopexin hämolytisch freierwirdendes Hämin zumindest in Teilen abfangen kann [39, 72]. Dieser Effekt geht durch die Isolation der Thrombozyten aus Vollblut und damit der Entfernung aller anderen Blut- und Plasmabestandteile verloren. Zudem muss berücksichtigt werden, dass im Organismus eine Temperatur von zirka 37°C als physiologisch gilt. Alle Experimente fanden bei Raumtemperatur (zirka

22°C) statt. Es besteht die Möglichkeit, dass die Thrombozyten außerhalb dieses physiologischen Temperaturumfelds in ihrer Funktion beeinträchtigt werden [73].

Zur Analyse der Expression von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten ist die Durchflusszytometrie eine etablierte Methodik [65, 74-77]. Teil dieser Durchflusszytometrie ist die Fluoreszenzfärbung der aufgereinigten Thrombozyten mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Diese erfolgte nach erprobten Protokollen und Schemata der Arbeitsgruppe, welche im Rahmen der Fragestellung lediglich in Bezug auf verwendete Stimulatoren und Inhibitoren modifiziert wurden. In Bezug auf die lysosomale Signalstärke wurde das Protokoll verstärkt modifiziert, da im Rahmen der *Lysotracker* - Signalstärke keine fluoreszenzmarkierten Antikörper zum Einsatz kamen, sondern ein intrazellulärer Fluoreszenzfarbstoff, der die Thrombozytenmembran durchdringt [78]. Ferner wurden vitale Thrombozyten verwendet, das bedeutet die Reaktion wurde nach der 30 minütigen Inkubation nicht mittels PFA 0,5% abgestoppt, sondern mit kalziumfreiem PBS in gleichem Volumen aufgefüllt, dadurch verlangsamt und sofort gemessen. Ausreichend sensible Durchflusszytometer, wie das verwendete *FACS Lyric™*, sind in der Lage, dieses intrazelluläre Signal zu messen [79]. Die Aggregometrie, genauer die Lichttransmissionsaggregometrie ist ein gängiges Verfahren zur Analyse der Thrombozytenfunktionalität [65, 76, 77], welche mit etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Zur Aggregometrie wurde PRP, isoliert aus Citratblut, verwendet, welches nach dem ersten Zentrifugationsschritt der Thrombozytenisolation entsteht. Dieses beinhaltet Anteile der im Blutstrom zirkulierenden Plasmaproteinen, die potentiell Ergebnisse, verglichen zu vollständig isolierten Thrombozyten, verfälschen könnten [80, 81]. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Möglichkeit, Zellorganellen wie Lysosomen in vitalen Zellen direkt darzustellen [82, 83]. Zur Darstellung der Lysosomen wurde der *Lysotracker Green* verwendet. Dieser Fluorophor hat den Vorteil, dass er in der Lage ist die Zellmembran zu durchdringen, ohne dass die Membran permeabilisiert werden muss und sich in Kompartimenten mit lysosomalem pH-Wert einlagert [78, 83]. Limitierend ist die Art, wie die Thrombozyten auf dem Objektträger örtlich fixiert werden müssen. Durch die Fibrinogenfixierung auf dem Objektträger werden die Thrombozyten zwar in

ihrem vitalen Zustand gehalten, können aber auch präaktiviert werden [84]. *Maslow et al.* beschreibt jedoch höhere Konzentrationen, die zur vollständigen Aktivierung nötig wären [85]. Durch gründliches Abpipettieren der Fibrinogenlösung vor Verwendung der Objektträger kann dieses Risiko verringert werden. Lysosomen entstehen aus Abschnürungen des Golgi-Apparates und durchlaufen eine intrazelluläre Entwicklung über frühe und späte Endosomen zum Lysosom [86-88]. Späte Endosomen sind hierbei dem pH-Wert der Lysosomen bereits sehr ähnlich, sodass der *LysoTracker* nicht mit absoluter Sicherheit nur an Lysosomen bindet, sondern teilweise auch an späte Endosomen [83, 86]. In Konzentrationen von mindestens 50 nM ist der Literatur nach die Spezifität am größten [78]. Wir entschieden uns daher zur Wirkkonzentration des *LysoTracker* von 80 nM um diesen limitierenden Effekt zu minimieren.

Die stimulatorabhängige Wirkung von Furin auf Thrombozyten spielt in dieser Dissertation eine zentrale Rolle, nicht untersucht wird jedoch, ob es unter Häminstimulation zu einer Änderung der Aktivität dieser Proteinkonvertase selbst kommt. Angedeutet wird dies durch die geänderte Expression im Vergleich zu anderen Stimulationen (siehe *Abbildung 39*). Eine weitere Methodik, die sich dieser Fragestellung somit annähern könnte, wäre eine Messung der Aktivität durch ein Funktionsassay, der in der Literatur durch *Langnau et al.* aufgezeigt wird [89]. Zur Verdünnung der verwendeten Stimulatoren und Inhibitoren wurden biologisch inaktive Substanzen verwendet, die in der Arbeitsgruppe und der Wissenschaft etabliert sind. Da in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe in dem Kontext keine Effekte auftraten, wurde auf eine zusätzliche Solvenzkontrolle weitestgehend verzichtet [42, 90-92].

4.2. Furineinfluss auf die Alpha-Granula Degranulation ist häminspezifisch

Zur Kontrolle der Furinwirkung kamen die Furininhibitoren SSM3 und D6R zum Einsatz. Vergleichend zueinander wurden diese zwei etablierten Furininhibitoren verwendet, die in ihrer Spezifität ähnlich, in ihrer Potenz jedoch unterschiedlich sind. Polyarginine wie D6R sind potente, kompetitive und spezifische Furininhibitoren, die sich in der Bindungstasche des Furins anlagern [93]. D6R ist mit einem K_i Wert von zirka 105nm bereits recht potent, wobei Nonaarginine

dem D6R in ihrer Potenz nochmals überlegen sind [93, 94]. SSM3 ist wiederum mit einem EC50 Wert von 54nm in der Potenz dem D6R überlegen. Die verwendeten SSM3 und D6R Konzentration von 25 µM wurde aus vergleichenden Testmessungen und ergänzender Recherche gezogen [95, 96].

Die Expression von CD62P, als Teil der Alpha-Granula im Thrombozyten [33, 97], wurde im Rahmen dieser Dissertation nun zunächst vergleichend zu Hämin für die Thrombozytenstimulatoren CRP, ADP und TRAP erhoben. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von CRP, bekanntermaßen ADP [98] und TRAP zu einem dosisabhängigen Expressionsanstieg von CD62P führt. Dieser Anstieg kann durch die gesteigerte Thrombozytenaktivierung und einhergehende Alpha-Granula Degranulierung erklärt werden [27, 33, 99]. Der Expressionsanstieg konnte unter Inhibition der Proproteinkonvertase Furin nicht signifikant beeinflusst werden. Einzig bei CRP konnten leichte, aber nicht statistisch signifikante Effekte, im Sinne einer Reduktion der CD62P Expression, gezeigt werden. Dies kann in Anbetracht, dass CRP genau wie Hämin an GPVI bindet und Furin, wie es von *Fink et al.* beschrieben wurde, mit GPVI interagiert, gut erklärt werden [25]. Fehlende Signifikanz könnte in diesem Zusammenhang mit der messbaren, in der Literatur beschriebenen Interspendervariabilität für die Wirkung von CRP in Zusammenhang stehen [16].

Unter Häminstimulation verhält sich diese Dosis-Wirkungs-Beziehung der Expression jedoch anders: Nach einem initialen Anstieg bei niedriger Häminkonzentration, kommt es zum, von *Fink et al.* beschriebenen, „Shedding“ [25] von CD62P, was sich in einer Reduktion der gemessenen Expression widerspiegelt [25]. *Rohlfing et al.* beschrieb, dass die Häminstimulation zur Bildung von ROS führt [42]. Der über den TLR4 hämingesteuerte Anstieg von ROS wurde von *Annarapu et al.* als Induktor der hämininduzierten Granula Degranulation der Thrombozyten identifiziert [100].

Die CD62P Expression beziehungsweise die Änderung dieser kann bei CRP, ADP und TRAP nicht signifikant durch die Proproteinkonvertase Furin beeinflusst werden. Dieser Aspekt stützt die erste Hypothese dieser Dissertation, dass Furin häminspezifisch auf die Alpha-Granula Degranulation wirkt. Bei

Häminstimulation wurde durch die Furininhibition jedoch ein weniger stark ausgeprägter Abfall der CD62P Expression beobachtet, es folgt somit ein „Rescue des Sheddings“ [25].

In *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI* wurde von unserer Arbeitsgruppe um Fink et al. erarbeitet, dass der Abfall der CD62P- und GPVI Expression unter Häminstimulation furinabhängig ist, beziehungsweise unter Inhibition von Furin teilweise aufgehoben werden kann [25]. Dieser Effekt lässt sich vergleichend für die übrigen Stimulatoren auf Basis der erhobenen Daten somit nicht nachweisen.

Folgend spielt Furin eine entscheidende Rolle im hämininduzierten Signalweg humaner Thrombozyten, der zur Alpha-Granula Degranulierung führt, jedoch keine signifikante Rolle im CRP, ADP oder TRAP induzierten Signalweg hierfür.

4.3. Einfluss von Furin auf die Plättchenfunktionalität

Der Einfluss der Proproteinkonvertase Furin auf die Alpha-Granula Degranulation konnte im ersten Teil dieser Dissertation gezeigt werden. Um einen vergleichenden Überblick über die Funktionalität der Thrombozyten zu gewinnen, sollte der Furineinfluss auf die Aggregationsfähigkeit als zentraler Aspekt der Hämostase betrachtet werden. Es zeigt sich, dass die Furininhibition nur bei Hämin signifikanten Einfluss auf die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nimmt, während die übrigen Stimulatoren CRP, ADP und TRAP nicht signifikant von der Furininhibition beeinflusst werden konnten. Interessanterweise haben andere Proteaseinhibitoren größeren Einfluss auf die Aggregationsfähigkeit [101, 102], beziehungsweise keinen Einfluss auf die hämininduzierte Aggregationsfähigkeit [25]. Es erhärtet sich also die Hypothese, dass der überwiegende Einfluss von Furin insgesamt auf häminspezifische Signalwege fokussiert ist und nicht durch andere Proteaseinhibitoren wie Leupeptin imitiert werden kann [25].

Dies veranlasste uns zur Planung des nächsten Schrittes dieser Dissertation: Die Suche nach dem Zielmolekül für Furin im Ablauf der intrazellulären Signalkaskade von Hämin, diese Signalkaskade ist in der Literatur beschrieben [103, 104].

4.4. Furin aktiviert die Phospholipase A2 und beeinflusst die Plättchenfunktionalität

Zu Beginn dieser Dissertation war es das Ziel, ein spezifisches Zielmolekül in der hämininduzierten Signalkaskade für Furin zu finden, um so das von unserer Arbeitsgruppe um *Fink et al.* beschriebene furinabhängige „Shedding“ [25] von GPVI und CD62P bei Häminstimulation [25] erklären zu können.

Da Furin als Proproteinkonvertase in diverse Stoffwechselwege eingegliedert ist [105, 106] und zahlreiche andere Proteine aktiviert oder inaktiviert [106], konnte nach einiger Recherche die für die Plättchenaktivierung relevante Phospholipase A2 als potentielles Zielprotein für Furin identifiziert werden [107].

Die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten konnte durch die Inhibition der Phospholipase A2 bei Hämin signifikant reduziert werden. Auch bei ADP konnten Effekte gezeigt werden. Dies ist, in Anbetracht der literaturbekannten Wirkung der Phospholipase A2 im Thrombozyten auch primär nicht unerwartet gewesen [108, 109]. Bei CRP und TRAP jedoch hatte die Inhibition keinen Einfluss auf die Aggregationsfähigkeit.

Eine nahezu vollständige Aufhebung der Aggregationsfähigkeit, wie es bei Furininhibition unter Hämin beobachtet wurde, konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ebenso konnte kein Effekt auf eine Änderung der Expression von CD62P erkannt werden.

Differentiell betrachtet konnte mit Fokus auf die Thrombozyten Granula Degranulation durch die Datenerhebung bei der Inhibition der Phospholipase A2 jedoch kein Effekt dargestellt werden, obwohl bekanntermaßen die Phospholipase A2 in die intrazelluläre Signalkaskade, die zumindest teilweise zur Aktivierung der Thrombozyten führt, eingegliedert ist [103, 108, 109]. Daher wurde im laufenden Projekt von der Suche eines direkten Zielproteins für Furin abgesehen. Die Vermutung ist, dass Furin als ubiquitär vorkommende Proteinkonvertase an so vielen bekannten Stoffwechselwegen im Thrombozyten beteiligt ist, dass es nicht „das Zielmolekül“ für Furin gibt, sondern viele parallel ablaufende Mechanismen letztlich in die vollständige Aktivierung eingreifen [105]

und mittels der PLA2 Inhibition nur einen unzureichenden Anteil des Furinsignalweges inhibiert wurde.

4.5. Hämininduzierte lysosomale Granula Degranulation ist furinabhängig

Auch die Expression von CD63, welches als Marker für die lysosomale Granula Degranulation fungiert, lässt sich durch die Inhibition der Phospholipase A2 nicht beeinflussen.

Die Expression von CD63 kann durch Hämin, CRP, TRAP gesteigert werden. Diese Ergebnisse sind in Anbetracht der Tatsache, dass CD63 in der Literatur, ähnlich wie P-Selektin, als allgemeiner Marker der Thrombozytenaggregation gilt, nicht überraschend [9, 58, 110].

Dicenta, Pelzer et al. zeigen, dass die Zunahme der Expression von CD63 unter Furininhibition lediglich bei Häminstimulation in signifikanten Maß beeinflusst werden kann. Bei CRP, ADP und TRAP zeigt sich kein Einfluss auf das Expressionsverhalten von CD63 [52]. Die Expression lässt sich insbesondere bei mittleren und niedrigen Häminkonzentrationen durch Furininhibition mittels SSM3 und D6R signifikant verringern [52].

Unerwarteterweise fiel ein Effekt durch Furininhibition auf die Expression von CD63 bei hohen Häminkonzentrationen von 25 µM jedoch weg. Vergleichend zur Literatur könnte der ausbleibende Effekt durch die vermehrte Zelltoxizität und der, mit diesen Häminkonzentrationen einhergehenden, Ferroptose erklärt werden [47, 92, 111]. So beschreibt *Schaale et al.* ein sehr häufiges Auftreten „ferroptotischer Residuen“ bei Stimulation mit 25 µM Hämin [92]. Eine so hohe Konzentration ergibt also methodisch wenig Sinn, wenn vitale Zellen untersucht werden sollen. Daher wurde im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie und Lysotrackerquantifizierung eine sehr viel niedrigere Häminkonzentration von 6,25 µM gewählt. *Schaale et al.* beschreibt aber auch bereits bei niedrigeren Häminstimulationen das gelegentliche Auftreten von „Ballooning – und Mikrovesikel“ - Phänotypen als Zeichen der beginnenden Ferroptose [92].

Differentiell bleibt bei CD63 das für CD62P oder GPVI von *Fink et al.* dokumentierte „Shedding“ [25] aus. CD63 ist einerseits in der Delta-Granula

gelagert, andererseits als lysosomales Oberflächenprotein im Thrombozyten bekannt [9, 10, 29]. Die Delta-Granula ist jedoch in der Literatur als lysosomaler Subtyp beschrieben und somit ähnlich zu betrachten, auch wenn sie in Bezug auf den pH Wert nicht identisch sind [29]. Die Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Stimulation legt nahe, dass hämininduziert die genannten Granula mit der Thrombozytenmembran verschmelzen. Eine Visualisierung dieser lysosomalen Granula Degranulation, die somit insbesondere bei Hämin interessant war, konnte mit Hilfe des *LysoTrackes* am Fluoreszenzmikroskop erreicht werden. Die hypothetisierte Reduktion der Lysosomenzahl konnte in der blinden, manuellen Auszählung erhoben werden [52].

Insbesondere für die betrachtete lysosomale Granula Degranulation als Quelle für CD63 spricht neben dem Anstieg der Expression die visuell ausgezählte Reduktion der Lysosomenzahl einerseits, wie auch die zusätzlich durchflusszytometrisch erhobene Reduktion des *LysoTracker* - Signals [52].

Dies schließt aber nicht aus, dass ein Teil der CD63 Expression durch die Degranulation der Delta-Granula beigesteuert wird [37, 53]. Dafür spricht unter anderem der Expressionsanstieg unter der übrigen Stimulation in Verbindung mit der fehlenden Reduktion der lysosomalen Fluoreszenzintensität in der *LysoTracker* Quantifizierung. Es konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass durch Furininhibition mittels SSM3 die ATP Freisetzung unterdrückt wird [25]. ATP ist in Delta-Granula gelagert [36], es ist also wahrscheinlich, dass Furin die hämininduzierte Delta-Granula Degranulation moduliert [25]. CRP gilt als Agonist an GPVI als starker Induktor der Thrombozyten Granula Degranulation, die Literatur beschreibt für CRP die primäre Degranulierung der Alpha- und Dense-Granula und führt zu einem Anstieg der CD62P und CD63 Expression, die lysosomale Granula Degranulation wird schwächer initiiert [112, 113].

Zur Verifikation der gemessenen hämininduzierten Reduktion des *LysoTracker* - Signals und somit auch zur Verifikation der Funktion der Methodik wurde daher ein, aus der Literatur bekannter starker Induktor der lysosomalen Granula Degranulation (Thrombin), vergleichend gemessen [52, 114, 115], um eine

erwartbare Reduktion der Lysosomensignals als Hinweis für die lysosomale Granula Degranulation zu bestätigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalstärke unter Thrombin tatsächlich abnimmt, [52] was für die adäquate Funktion der Methodik spricht. Der eigentliche Vorgang des SNAP-23 und Syntaxin abhängigen Verschmelzens der Lysosomen und die Abgabe lysosomaler Inhaltsstoffe wird in der Literatur beschrieben [30, 116-118]. Auf Basis dessen kann die Expressionsänderung von CD63 in Verbindung mit einer Reduktion der lysosomalen Signalstärke unter Häminstimulation als eine tatsächlich erfolgte lysosomale Degranulierung interpretiert werden.

Die bei der lysosomalen Granula Degranulation freigesetzten Proteasen und Glucosidasen könnten, als weiterführende Hypothese, das oben beschriebene „Shedding“ [25], also den Abfall der GPVI und CD62P Expression, durch Degradation dieser Oberflächenproteine somit zumindest anteilig erklären, insbesondere, da die lysosomalen sauren Hydrolasen bereits mit Rezeptordegredation assoziiert wurden [28, 52]. Das „Shedding“ [25] könnte also weniger auf, wie zunächst vermutet, einem spezifischem Signalweg oder Zielmolekül basieren, sondern viel mehr auf die kombinierten Wirkungen verschiedener furinabhängiger Vorgänge im Aktivierungszyklus der Thrombozyten. Beispielsweise der lysosomalen Granula Degranulation und der beobachteten Reduktion des GPVI und CD62P Expressionsabfalls unter Furininhibition [25, 52].

Dieser „Shedding-“ Effekt von CD62P und GPVI ließ sich durch Furininhibition in Experimenten unserer Arbeitsgruppe reduzieren [25]. Die Daten zeigen, dass sich die CD63 Expression, als Marker der Delta – und lysosomalen Granula Degranulation, durch Furininhibition signifikant verringert. Bezüglich der Lysosomen zeigte sich ein Anstieg der Lysosomenanzahl unter Furininhibition bei Häminstimulation, wie auch der durchflusszytometrisch ermittelten *LysoTracker* Signalstärke. Die Furinabhängigkeit der lysosomalen Granula Degranulation konnte somit mit mehreren unabhängigen Methodiken (Durchflusszytometrie, Mikroskopie) in dieser Dissertation gezeigt werden [52]. Mehrere Methodiken wurden ergänzend angewendet, da das blinde Auszählen

der Lysosomen durch die zeitlich und personell sehr aufwendige Methodik limitierender umsetzbar ist als eine apparative Messung.

Für die übrigen Stimulatoren konnten vergleichend keine Effekte der Furininhibition auf die Signalstärke des *LysoTrackes* gezeigt werden [52].

Furin muss also im Prozess der hämininduzierten lysosomalen Granula Degranulation beziehungsweise auch für die hämininduzierte Delta-Granula Degranulation eine wichtige, induzierende Rolle spielen.

Ergänzend wurde der Effekt der Furinexpression unter Stimulation vergleichend zur Expression unter Furininhibition gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Furinexpression unter Häminstimulation, der mit den übrigen Stimulatoren nicht erreicht werden konnte. Hinzu kam ein Abfall der Expression unter Inhibition von Furin bei Häminstimulation. Dies stützt zusätzlich die Hypothese der häminspezifischen Furinwirkung.

4.6. Klinischer Bezug der Ergebnisse

4.6.1. Beispiel der Hämolyse

Viele Erkrankungen können direkt oder indirekt den Zerfall der Erythrozyten zur Folge haben. Hierzu zählen zum Beispiel die Beta Thalassämie, die Autoimmunhämolyse oder die Sichelzellanämie [40]. Bei dieser sogenannten Hämolyse werden große Mengen Hämoglobin und Hämin B freigesetzt. Letzteres wird zum zelltoxischen Hämin oxidiert [52]. Klinisch werden eine Thromboseneigung und laborchemisch ein Abfall der Konzentration des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin, ein Anstieg des freien Kaliums aus intrazellulären Beständen der zerfallenden Erythrozyten, ein Anstieg des indirekten Bilirubins und ein Abfall des Haptoglobins als Hämoglobinbindungsmolekül beobachtet.

Ein Abbauprodukt des freiwerdenden Hämin B ist das genannte Hämin [40, 92], das im Rahmen dieser Dissertation intensiv *in vitro* betrachtet wurde. Es ist bereits bekannt, das Hämin zu einer Aktivierung der Thrombozyten führt und somit zur Thromboseneigung beiträgt [25, 52]. Dies wird auch durch die hier erhobenen Daten unter anderem über einen konzentrationsabhängigen Anstieg

der CD63 – Expression auf der Thrombozytenoberfläche und der gesteigerten Aggregationsfähigkeit bestätigt.

Neu ist hingegen das publizierte Ergebnis dieser Dissertation, dass der CD63 Expressionsanstieg und somit die hämininduzierte Aktivierung der Thrombozyten und der daraus resultierenden lysosomalen - und Delta-Granula Degranulierung in relevantem Maße von der Proproteinkonvertase Furin abhängig ist [52].

Die Fluoreszenzintensität des *LysoTrackers* wurde unter Hämin und Thrombinstimulation signifikant reduziert. Die Inhibition der Proproteinkonvertase Furin führte zu einer signifikanten Reduktion der CD63 Expression unter Häminstimulation und zu einer Steigerung der erhobenen Lysosomenanzahl, beziehungsweise der gemessenen Fluoreszenzintensität des *LysoTrackers* [52]. Die hämininduzierte lysosomale Granula Degranulierung konnte also begrenzt werden. Dies spricht für eine reduzierte Aktivierung und in Verbindung mit den erhobenen Daten aus der Aggregometrie für eine reduzierte Funktionalität der Thrombozyten trotz der Häminstimulation, wie sie bei Hämolyse auftreten kann.

Eine streng gezielte Inhibition der *thrombozytären* Proproteinkonvertase Furin könnte folglich hypothetisch dazu beitragen die Thromboseneigung von Hämolysepatienten zu reduzieren und somit das Risiko für gefährliche Komplikationen minimieren.

4.6.2. Beispiel des Storage-Pool-Disease

In dieser Dissertation ist die Degranulierung der Thrombozyten Granula weitergehend untersucht worden. Bei Störungen der Degranulation der Thrombozyten, den sogenannten *Storage-Pool-Disease* treten eine verstärkte Blutungsneigung und eine verlängerte Blutungszeit auf [36, 119-121]. Zu diesen Erkrankungen gehört das seltene, autosomal rezessive Hermansky-Pudlak Syndrom [121]. *Krisp et al.* beschrieb eine ursächliche Mutation im HPS1 Gen, welches in der Delta-Granula Degranulierung involviert ist [122]. *Vicary et al.* beschrieb zusätzlich eine Einflussnahme dieser Mutationen auf die thrombozytäre, lysosomale Degranulierung, wobei der genau Mechanismus unklar ist [123]. Das Verständnis über den Ablauf der Thrombozyten Granula

Degranulierung und die mögliche Einflussnahme darauf, kann in weitergehenden Untersuchungen zum Verständnis solcher Erkrankungen beitragen.

4.7. Conclusio und Schlussfolgerung der Dissertation

Die hämininduzierte Wirkung auf den Thrombozyten ist Gegenstand intensiver Forschung [23, 38, 42, 52, 100]. Die Daten dieser Dissertation beleuchten das Thema der hämininduzierten Thrombozyten Granula Degranulierung weiter und analysiert diese differentiell zu weiteren Stimulatoren.

Die erfolgte Datenauswertung legt nahe, dass es unter Häminstimulation zu einer lysosomalen Granula Degranulation humaner Thrombozyten kommt. Diese Degranulation ist in signifikantem Maße abhängig von der Proproteinkonvertase Furin [52]. Vergleichend ist dieser Effekt der Reduktion der lysosomalen Granula Degranulation unter Furininhibition nur bei Hämin zu beobachten, nicht jedoch bei CRP, ADP, Thrombin und TRAP [52]. Bezogen auf die Alpha-Granula konnte verifiziert werden, dass lediglich unter Häminstimulation signifikante Furineffekte auf die, von *Fink et al.* beschriebene, Expression von CD62P nachgewiesen werden konnten [25], nicht jedoch unter differentieller Betrachtung der übrigen Stimulatoren, die größtenteils zwar zu einer Alpha-Granula Degranulation führen, welche jedoch unabhängig von Furin ist. Die Ausnahme bildet CRP, welches über GPVI-Stimulation wirkt [16, 25]. Es zeigten sich dadurch erklärable Effekte, die jedoch keine Signifikanz hatten.

Die beobachteten Effekte wurden unter Eingriff in zwei Signalwege betrachtet, Furin und PLA2. Doch auch wenn die PLA2 bei der Plättchenaktivierung maßgeblich beteiligt ist [108], so nimmt die Inhibition, also das Deaktivieren der PLA2, überraschenderweise keinen, dem Furin vergleichbaren Einfluss auf die differentielle Granula Degranulation. Die PLA2 ist also wahrscheinlich nicht das alleinige Zielprotein von Furin im hämininduzierten Signalweg, auch wenn die PLA2 durch Furin aktiviert wird [107]. Eine gezielte Inhibition der PLA2 hat nicht die Effektstärke, wie eine gezielte Furininhibition.

5. Zusammenfassung

Hämin ist ein degradiertes Molekül, das zum Beispiel während einer Hämolyse, also dem Zerfall der Erythrozyten, aus dem freigesetzten Hämoglobin oxidiert wird. Es führt zur Aktivierung der Thrombozyten, was sich klinisch beispielsweise in einer Thromboseneigung bei Hämolysepatienten zeigen kann. Die hämininduzierte Aktivierung der Thrombozyten untersteht hierbei einem komplexen intrazellulärem Signalweg, ausgehend vom Häminrezeptor CLEC-2 und GPVI.

Ein aktivierter Thrombozyt ändert seine äußere Morphologie, degranuliert die intrazellulären Granula und verändert entsprechend seine Oberflächenrezeptorexpression. Anhand der Oberflächenexpression kann somit ein Rückschluss auf die Aktivierung der Thrombozyten und dem Ausmaß beziehungsweise der Art der Granula Degranulation getroffen werden. So spricht zum Beispiel CD62P für die Alpha-Granula Degranulation und CD63 für die Lysosomale - beziehungsweise Dense/Delta Granula.

Es ist durch unsere Arbeitsgruppe um *Fink et al.* vorbekannt, dass die Aktivierung der Thrombozyten nach einem initialen Anstieg zu einem Abfall der Expression von GPVI und CD62P führt. Diese Beziehung zur Dosis und Wirkung der Oberflächenrezeptorexpression konnte durch Inhibition der Proproteinkonvertase Furin signifikant verändert werden.

In dieser Dissertation wurde mittels Durchflusszytometrie methodisch nachgewiesen, dass die Änderung der Oberflächenexpression für CD62P, als Marker der Alpha-Granula Degranulation und der Einfluss der Proproteinkonvertase Furin im Thrombozyten hierauf spezifisch für Hämin ist und differentiell für weitere, aus der Literatur bekannte Thrombozytenstimulatoren wie CRP, ADP oder TRAP, nicht besteht.

Furin ist im intrazellulären Signalweg der Thrombozyten einerseits, aber auch an vielen anderen Signalwegen außerhalb der Thrombozyten andererseits, beteiligt. Eines der Proteine, das bekanntermaßen innerhalb des Thrombozyten durch Furin aktiviert wird, ist die Phospholipase A2. Diese spielt innerhalb der Thrombozytenaggregation eine relevante Rolle. Es schien also berechtigt, die

Phospholipase A2 als mögliches Furinzielprotein und somit als Schlüssel zur Frage danach, wo Furin genau in den Häminsignalweg eingreift, in dieser Dissertation auch zu betrachten.

Die Inhibition der Phospholipase A2 präsentierte unter Verwendung der Aggregometrie bei Häminstimulation eine signifikante Reduktion der Aggregationsfähigkeiten der Thrombozyten, hierbei jedoch keine vergleichbare Effektstärke zur direkten Furininhibition. Differentiell konnte zudem eine leichte Reduktion der Aggregationsfähigkeiten unter ADP-Stimulation beobachtet werden.

Die durchflusszytometrisch erhobene Oberflächenrezeptorexpression, sowohl von CD62P als auch von CD63 blieb hingegen unbeeinflusst von einer PLA2 Inhibition. Die Phospholipase A2 konnte somit nicht als alleiniges Zielmolekül des Furins im Signalweg angesehen werden, da die unbeeinflusste Expression gegen eine Beeinflussung der Thrombozyten Granula Degranulation, wie sie bei Furin auftritt, sprach.

Eine aktivierende Rolle spielt Furin bei der lysosomalen Granula Degranulation. Die erhobenen Daten präsentierten eine signifikante Reduktion der CD63 Expression, als Marker dieser Granula Degranulation, unter Häminstimulation und Furininhibition in der Durchflusszytometrie. Methodisch ergänzt konnte der Effekt der lysosomalen Granula Degranulation mittels Fluoreszenzmikroskopie untermauert werden. Sowohl in der mikroskopisch visuellen Auszählung der Lysosomen als auch in der durchflusszytometrischen *LysoTracker* gestützten Quantifizierung der Lysosomen an vitalen Thrombozyten konnte eine Reduktion der Lysosomenanzahl unter Häminstimulation, beziehungsweise eine geringere Reduktion bei Furininhibition und Häminstimulation signifikant erhoben werden.

Furin muss somit am Prozess der hämininduzierten Degranulation aktivierend beteiligt sein.

Differentiell für weitere Stimulatoren betrachtet konnten diese Effekte in der durchflusszytometrischen Quantifizierung von CD63 nicht erhoben werden. Die

bei Furininhibition beobachteten Effekte auf die lysosomale Granula Degranulation stellen sich also auch hämingspezifisch dar.

Für Furineffekte auf die Plättchenfunktionalität und die differentielle Granula Degranulation besteht eine Häminspezifität.

6. Anhang und Literaturangaben

6.1. Pufferzusammensetzungen

Die folgenden Tabellen zeigen die Inhaltsstoffe der bei dieser Dissertation verwendeten Puffer. Die Puffer dienen in erster Linie der Thrombozytenisolation und wurden täglich frisch angesetzt, beziehungsweise aus bestehenden Stockbehältern abgefüllt (ACD und TYRODES 10x wurde literweise angesetzt)

ACD Puffer:

Tabelle 10: ACD Puffer

Substanz	Konzentration
Na3-Citrat	12.5g
Citronensäure	6.82g
Glucose	10g
Destilliertes Wasser	Auf 500ml Volumen
NaOH	Ziel pH 4.69

Anschließend erfolgt die Sterilfiltration und die Lagerung abgedunkelt bei 4°C.

TYRODES Puffer:

Tabelle 11: TYRODES Inhalt

Substanz	Konzentration	pH
Destilliertes Wasser	180ml	
BSA	0.2g (0.1%)	7.0
Glukose	0.2g (0.1%)	
TYRODES 10x	20ml	

Die spezifische pH-Wert - Einstellung erfolgte mit HEPES auf einen Ziel pH von 7.4. Davon wurden ca. 10ml abgenommen und zur Seite gestellt und für die Isolation der Thrombozyten verwendet. Der Rest wurde mit 1% Salzsäure auf einen pH von 6.5 titriert und ebenfalls für die Isolation der Thrombozyten verwendet.

TYRODES 10x (1L)

Tabelle 12: TYRODES 10x

Substanz	Konzentration
Natriumchlorid	80g
NaHCO ₃	10.15g
Kaliumchlorid	1.95g
Destilliertes Wasser	Aufgefüllt auf 1000ml

Anschließende Sterilfiltration und Lagerung abgedunkelt bei 4°C.

6.2. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: **Schema der Thrombozytenrezeptoren**
- Abbildung 2: **Schema zur Analyse der Kernhypothesen**
- Abbildung 3: **CD62P „Shedding“ [25] unter Häminstimulation**
- Abbildung 4: **ADP steigert die thrombozytäre CD62P Expression**
- Abbildung 5: **Expressionzunahme von CD62P unter CRP-Stimulation**
- Abbildung 6: **Durchflusszytometrisch erhobene CD62P Expressionszunahme unter TRAP-Stimulation**
- Abbildung 7: **Hämin stimuliert die Thrombozyten CD63 Expression**
- Abbildung 8: **Keine CD63 Expressionsänderung unter ADP Stimulation**
- Abbildung 9: **CRP steigert die thrombozytäre CD63 Oberflächenexpression**
- Abbildung 10: **Zuwachs der thrombozytären CD63 Oberflächenexpression unter TRAP Stimulation**
- Abbildung 11: **Quantitative Reduktion der Lysosomenzahl je Thrombozyt nach 6,25 μ M Häminstimulation**
- Abbildung 12: **Visualisierung der Lysosomen je Thrombozyt vergleichend unter Hämin und CRP Stimulation**
- Abbildung 13: **Differentielle Quantifikationsänderung des LysoTracker Signals**
- Abbildung 14: **Differentielle Betrachtung der Thrombozytenaggregationsfähigkeit**
- Abbildung 15: **Durchflusszytometrische Analyse der Effekte der Phospholipase A2 Inhibition auf die CD62P Expression auf Thrombozyten**
- Abbildung 16: **Die Phospholipase A2 Inhibitoren ändert die Thrombozytenaggregationsfähigkeit unter Häminstimulation**
- Abbildung 17: **Zeitliche Änderung der Aggregation unter Häminstimulation bei Verwendung einer Phospholipaseinhibition**
- Abbildung 18: **Zeitliche Änderung der Aggregation unter CRP Stimulation und Verwendung des Phospholipase - A2 - Inhibitors**
- Abbildung 19: **Einfluss der PLA - inhibition auf die Thrombozytenaggreaction unter ADP Stimulation**
- Abbildung 20: **Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition auf die Thrombozytenaggreaction unter TRAP-Stimulation**
- Abbildung 21: **Vergleichender Einfluss der Phospholipase A2 Inhibition auf die Expression von CD63**
- Abbildung 22: **Furininhibition reduziert das CD62P „Shedding“ [25] unter Häminstimulation**
- Abbildung 23: **Einfluss der Furininhibition auf die CD62P Expression unter CRP Stimulation**
- Abbildung 24: **Furineinfluss auf die CD62P Expression unter ADP-Stimulation**
- Abbildung 25: **Einfluss der Furininhibition auf die CD62P Expression unter TRAP-Stimulation.**
- Abbildung 26: **Vergleich der maximalen Aggregation häminstimulierter humaner Thrombozyten mit und ohne Furininhibition**

- Abbildung 27: **Zeitliche Änderung der Aggregation unter Häminstimulation und Furininhibition**
- Abbildung 28: **Vergleich der Einflussnahme verschiedener Proteaseinhibitoren auf die hämininduzierte Aggregationsfähigkeit**
- Abbildung 29: **Aggregationsverhalten unter Furininhibition und CRP Stimulation**
- Abbildung 30: **Aggregationsverhalten unter Furininhibition und ADP Stimulation**
- Abbildung 31: **Aggregationsverhalten unter Furininhibition und TRAP-Stimulation**
- Abbildung 32: **Furin beeinflusst die CD63 Expression unter Häminstimulation**
- Abbildung 33: **Furininhibition beeinflusst nicht die CD63 Expression unter CRP Stimulation**
- Abbildung 34: **Furininhibition hat keinen Einfluss auf die CD63 Expression unter ADP Stimulation**
- Abbildung 35: **Furininhibition ändert nicht die CD63 Expression unter TRAP- Stimulation**
- Abbildung 36: **Visualisierung des Furineinfluss auf die absolute Anzahl an Lysosomen je Thrombozyt**
- Abbildung 37: **Furininhibition steigert die durchschnittliche Lysosomenzahl je Thrombozyt unter Häminstimulation**
- Abbildung 38: **Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen des LysoTracker unter differentieller Thrombozytenstimulation und Furininhibition**
- Abbildung 39: **Häminabhängige Expressionssteigerung von Furin im Vergleich mit weiteren Stimulatoren und Furininhibition**
- Abbildung 40: **Furin ist relevant für die hämininduzierte lysosomale Granula Degranulierung**

6.3. Eigenanteil des Promovierenden

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik III unter Betreuung von Professor Dr. med. Meinrad Paul Gawaz von mir, Andreas Pelzer, durchgeführt.

Die Konzeption der Experimente erfolgte nach Absprache in den wöchentlichen Besprechungen mit Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz durch mich selbst, in Absprache mit Frau Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing.

Die Experimente, die notwendige Vorbereitung und anschließende Auswertung und Interpretation der gewonnenen Daten wurden, nach Einarbeitung in die Methodik durch Frau Dr. Anne-Katrin Rohlfing und Frau Dr. Annalena Fink (Allgemeine Einarbeitung), Herrn Marcel Kremser (Einarbeitung Aggregometrie) und Frau Valerie Dicenta (Einarbeitung Durchflusszytometrie) (jeweils Mitglieder der AG Gawaz) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie (nur die Bilder und Einstellung der Ebene, nicht die Auswertung, Probengenerierung und Bearbeitung) erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing.

Die *Abbildung 3, 22 und 28* aus dieser Dissertation beziehungsweise die darin dargestellten Daten stammen aus *Fink et. al. The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI* (Bibliografie Nr.25), der Arbeitsgruppe Gawaz (Veröffentlicht 2023). Diese Daten wurden von Frau Fink und Frau Dr. Rohlfing erhoben und dienten in Absprache mit Frau Dr. Rohlfing als Positivkontrolle in meiner Dissertation. Meine Mitarbeit an der genannten Veröffentlichung bezog sich auf Daten, die in dieser Dissertation nicht zum Tragen kommen. Die Verwendung der Grafiken ist im Text und den Literaturangaben entsprechend gekennzeichnet. Eine gesonderte Zertifizierung ist laut Verlag für Autoren nicht erforderlich.

Die in dieser Dissertation vorgestellten Daten, die in den *Abbildungen 7-11, 12, 13, 32-38* visualisiert wurden, wurden von mir bereits anteilig im *Journal Biochemical and Biophysical Research Communications* veröffentlicht (02.2024). Dies ist an den Grafiken selbst, sowie im Fließtext per Bibliografie Nr: 52 als Eigenzitat angegeben. Eine gesonderte Zertifizierung ist laut Verlag für Studienautoren nicht erforderlich.

Es besteht eine abgesprochene geteilte Erst-Autorenschaft zwischen mir, Andreas Pelzer, und Frau M.Sc. Valerie Dicenta, die durch Ihre Schulung für das *FACS Lyric™* bei der Messung und letztlich bei der Interpretation und Publikation der Daten mitgearbeitet hat.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Einarbeitung in die Software *GraphPad Prism* durch Frau Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing, eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Andreas Pelzer (cand.med). Doktorand AG Gawaz

6.4. Veröffentlichung im Zusammenhang mit der Dissertation

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht im Journal: *Biochemical and Biophysical Research Communication*: **Bibliografie Nr: 52**

Dicenta V, Pelzer A, Laspa Z, Castor T, Gawaz MP, Rohlfing AK.

The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets.

Biochem Biophys Res Commun. 2024 Mar 15;701:149629. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149629. Epub 2024 Feb 2. PMID: 38330730.

Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe Gawaz, deren Teilergebnisse als Vorbereitung dieser Dissertation dienten: **Bibliografie Nr: 25**

Fink A, Rohlfing AK, Dicenta V, Schaale D, Kremser M, Laspa Z, Sigle M, Fu X, Pelzer A, Fischer M, Münzer P, Castor T, Müller KAL, Borst O, Lämmerhofer M, Gawaz MP.

The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI.

Thromb Haemost. 2023 Jul;123(7):679-691. doi: 10.1055/s-0043-1768057. Epub 2023 Apr 10. PMID: 37037200.

Zertifizierung der Grafiken:

Die Verwendung der Grafiken 3,7-13, 22, 28, 32 - 38 aus den oben genannten Publikationen, die in dieser Dissertation (antellig) verwendet wurden, bedürfen laut Verlagsinformationen für Autoren der Publikationen zur nicht kommerziellen Verwendung in der eigenen Dissertationsschrift keine gesonderte Zertifizierung.

6.5. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Professor Doktor Meinrad Gawaz, der diese Dissertation ermöglicht und begutachtet hat und stets mit Rat und Zeit ein offenes Ohr für Fragen und Anregungen hatte.

Die sehr qualitative Betreuung war für mich beispielhaft.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Gawaz für die Bereitstellung der Laborausüstung und der notwendigen Gelder.

Ich möchte mich zudem bei Frau Prof. Dr. Melanie Philipp für die Zweitbegutachtung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe um Frau Dr. rer. nat. Anne-Katrin Rohlfing, Valerie Dicenta, Zoi Laspa und David Schaale bedanken, die bei Fragen zur Methodik und bezüglich des „cleversten Weges zur Erfüllung der Aufgabe“ stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Marcel Kremser und Frau Dr. med. dent. Annalena Fink, die sich zu Beginn meiner Promotion viel Zeit für die Einarbeitung in die Methodik und die Beantwortung zahlreicher Fragen meinerseits genommen haben.

Schlussendlich möchte ich einen auch besonderen Dank an Frau Dr. Tatsiana Castor aussprechen, die viele Empfehlungen, Tipps und Erfahrungswerte für das Verfassen wissenschaftlicher Texte beigesteuert hat.

6.6. Bibliografie

1. (Destatis), S.B. *Ausblick auf die Bevölkerungsentwicklung in Deutschland und den Bundesländern nach dem Corona-Jahr 2020*. 2021.
2. Bundesamt, S. *Verteilung der häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 2020*. 2021.
3. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
4. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
5. Gawaz, M., K. Stellos, and H.F. Langer, *Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells*. J Thromb Haemost, 2008. **6**(2): p. 235-42.
6. van Gils, J.M., J.J. Zwaginga, and P.L. Hordijk, *Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(2): p. 195-204.
7. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449-61.
8. Liu, G., et al., *P-selectin increases angiotensin II-induced cardiac inflammation and fibrosis via platelet activation*. Mol Med Rep, 2016. **13**(6): p. 5021-8.
9. Choudhury, A., et al., *Platelet surface CD62P and CD63, mean platelet volume, and soluble/platelet P-selectin as indexes of platelet function in atrial fibrillation: a comparison of "healthy control subjects" and "disease control subjects" in sinus rhythm*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(19): p. 1957-64.
10. Bouhamdani, N., D. Comeau, and S. Turcotte, *A Compendium of Information on the Lysosome*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 798262.
11. Mantovani, A. and C. Garlanda, *Platelet-macrophage partnership in innate immunity and inflammation*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 768-70.
12. Duerschmied, D., C. Bode, and I. Ahrens, *Immune functions of platelets*. Thromb Haemost, 2014. **112**(4): p. 678-91.
13. Saklatvala, J., et al., *Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue*. J Biol Chem, 1996. **271**(12): p. 6586-9.
14. Farndale, R.W., *Collagen-induced platelet activation*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 162-5.
15. Skoglund, C., et al., *C1q induces a rapid up-regulation of P-selectin and modulates collagen- and collagen-related peptide-triggered activation in human platelets*. Immunobiology, 2010. **215**(12): p. 987-95.
16. Sang, Y., et al., *A Synthetic Triple Helical Collagen Peptide as a New Agonist for Flow Cytometric Measurement of GPVI-Specific Platelet Activation*. Thromb Haemost, 2019. **119**(12): p. 2005-2013.
17. Colman, R.W., *ADP receptors in platelets*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **603**: p. 198-209; discussion 209-10.
18. Cattaneo, M., *P2Y12 receptors: structure and function*. J Thromb Haemost, 2015. **13 Suppl 1**: p. S10-6.
19. Sellers, S.L., et al., *Platelets: Implications in Aortic Valve Stenosis and Bioprosthetic Valve Dysfunction From Pathophysiology to Clinical Care*. JACC Basic Transl Sci, 2021. **6**(12): p. 1007-1020.
20. Kramer, R.M., et al., *Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets*. J Biol Chem, 1995. **270**(46): p. 27395-8.
21. Downes, K., et al., *G protein-coupled receptor kinase 5 regulates thrombin signaling in platelets via PAR-1*. Blood Adv, 2022. **6**(7): p. 2319-2330.

22. Kraemer, B.F., I. Martinovic, and S. Lindemann, *Human platelets release TGFβ1 in acute myocardial infarction*. *Heart Vessels*, 2022. **37**(11): p. 1962-1970.
23. NaveenKumar, S.K., et al., *Hemin-induced platelet activation and ferroptosis is mediated through ROS-driven proteasomal activity and inflammasome activation: Protection by Melatonin*. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019. **1865**(9): p. 2303-2316.
24. Janciauskiene, S., V. Vijayan, and S. Immenschuh, *TLR4 Signaling by Heme and the Role of Heme-Binding Blood Proteins*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1964.
25. Fink, A., et al., *The Subtilisin-Like Protease Furin Regulates Hemin-Dependent Ectodomain Shedding of Glycoprotein VI*. *Thromb Haemost*, 2023.
26. Alshehri FSM, A.S., Alraizah AMS (2022) The Biological Structure of Platelet and their Role with Subpopulations in Haemostasis. *J Blood Disord Transfus*. 13:522.
27. Smith, C.W., *Release of alpha-granule contents during platelet activation*. *Platelets*, 2022. **33**(4): p. 491-502.
28. Heijnen, H. and P. van der Sluijs, *Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not?* *J Thromb Haemost*, 2015. **13**(12): p. 2141-51.
29. Sharda, A. and R. Flaumenhaft, *The life cycle of platelet granules*. *F1000Res*, 2018. **7**: p. 236.
30. Meng, R., et al., *Defective release of alpha granule and lysosome contents from platelets in mouse Hermansky-Pudlak syndrome models*. *Blood*, 2015. **125**(10): p. 1623-32.
31. Al Hawas, R., et al., *Munc18b/STXBP2 is required for platelet secretion*. *Blood*, 2012. **120**(12): p. 2493-500.
32. Gunay-Aygun, M., M. Huizing, and W.A. Gahl, *Molecular defects that affect platelet dense granules*. *Semin Thromb Hemost*, 2004. **30**(5): p. 537-47.
33. Harrison, P. and E.M. Cramer, *Platelet alpha-granules*. *Blood Rev*, 1993. **7**(1): p. 52-62.
34. King, S.M. and G.L. Reed, *Development of platelet secretory granules*. *Semin Cell Dev Biol*, 2002. **13**(4): p. 293-302.
35. Chen, Y., Y. Yuan, and W. Li, *Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from alpha-granules*. *Biosci Rep*, 2018. **38**(5).
36. Dupuis, A., et al., *Platelet delta-Storage Pool Disease: An Update*. *J Clin Med*, 2020. **9**(8).
37. Pols, M.S. and J. Klumperman, *Trafficking and function of the tetraspanin CD63*. *Exp Cell Res*, 2009. **315**(9): p. 1584-92.
38. Oishi, S., et al., *Heme activates platelets and exacerbates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via CLEC-2 and GPVI/FcγR3*. *Blood Adv*, 2021. **5**(7): p. 2017-2026.
39. Belcher, J.D., et al., *Heme triggers TLR4 signaling leading to endothelial cell activation and vaso-occlusion in murine sickle cell disease*. *Blood*, 2014. **123**(3): p. 377-90.
40. Schaer, D.J., et al., *Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins*. *Blood*, 2013. **121**(8): p. 1276-84.
41. Delvasto-Nunez, L., I. Jongerius, and S. Zeerleder, *It takes two to thrombosis: Hemolysis and complement*. *Blood Rev*, 2021. **50**: p. 100834.

42. Rohlfing, A.K., et al., *cGMP modulates hemin-mediated platelet death*. *Thromb Res*, 2024. **234**: p. 63-74.
43. Sparkenbaugh, E.M., et al., *Excess of heme induces tissue factor-dependent activation of coagulation in mice*. *Haematologica*, 2015. **100**(3): p. 308-14.
44. Rayes, J., S.P. Watson, and B. Nieswandt, *Functional significance of the platelet immune receptors GPVI and CLEC-2*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(1): p. 12-23.
45. Qiao, J., et al., *Regulation of platelet activation and thrombus formation by reactive oxygen species*. *Redox Biol*, 2018. **14**: p. 126-130.
46. Meng, D., M. Luo, and B. Liu, *The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 688643.
47. NaveenKumar, S.K., et al., *The Role of Reactive Oxygen Species and Ferroptosis in Heme-Mediated Activation of Human Platelets*. *ACS Chem Biol*, 2018. **13**(8): p. 1996-2002.
48. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin in arterial thrombosis*. *Z Kardiol*, 2004. **93**(11): p. 855-63.
49. Graff, J., et al., *Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**(3): p. 952-7.
50. Chen, M. and J.G. Geng, *P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2006. **54**(2): p. 75-84.
51. Israels, S.J. and E.M. McMillan-Ward, *CD63 modulates spreading and tyrosine phosphorylation of platelets on immobilized fibrinogen*. *Thromb Haemost*, 2005. **93**(2): p. 311-8.
52. Dicenta, V., et al., *The subtilisin-like protease furin regulates hemin-induced CD63 surface expression on platelets*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024. **701**: p. 149629.
53. Cai, H., et al., *Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder*. *Semin Thromb Hemost*, 2016. **42**(3): p. 282-91.
54. Israels, S.J., et al., *CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets*. *Thromb Haemost*, 2001. **85**(1): p. 134-41.
55. Jung, K.K., et al., *Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein*. *EMBO J*, 2006. **25**(17): p. 3934-42.
56. Israels, S.J., et al., *Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140)*. *Blood*, 1992. **80**(1): p. 143-52.
57. Klinkhardt, U., et al., *Differential in vitro effects of the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors abiximab or SR121566A on platelet aggregation, fibrinogen binding and platelet secretory parameters*. *Thromb Res*, 2000. **97**(4): p. 201-7.
58. Metzelaar, M.J., et al., *CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(5): p. 3239-45.
59. Solovyeva, N.I., et al., *[Furin as proprotein convertase and its role in normal and pathological biological processes]*. *Biomed Khim*, 2016. **62**(6): p. 609-621.
60. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(10): p. 753-66.

61. Thomas, G., F. Couture, and A. Kwiatkowska, *The Path to Therapeutic Furin Inhibitors: From Yeast Pheromones to SARS-CoV-2*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(7).
62. Bassi, D.E., H. Mahloogi, and A.J. Klein-Szanto, *The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression*. Mol Carcinog, 2000. **28**(2): p. 63-9.
63. Mani, H., et al., *Influence of blood collection techniques on platelet function*. Platelets, 2004. **15**(5): p. 315-8.
64. Fontana, P., et al., *Antiplatelet therapy: targeting the TxA2 pathway*. J Cardiovasc Transl Res, 2014. **7**(1): p. 29-38.
65. McEwen, B.J., *The influence of herbal medicine on platelet function and coagulation: a narrative review*. Semin Thromb Hemost, 2015. **41**(3): p. 300-14.
66. Anderson, B.J., *Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action*. Paediatr Anaesth, 2008. **18**(10): p. 915-21.
67. Patrono, C. and B. Rocca, *Aspirin: promise and resistance in the new millennium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(3): p. s25-32.
68. Martínez-Quintana, E. and A. Tugores, *Clopidogrel: A multifaceted affair*. J Clin Pharmacol, 2015. **55**(1): p. 1-9.
69. Gelbenegger, G. and B. Jilma, *Clinical pharmacology of antiplatelet drugs*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2022. **15**(10): p. 1177-1197.
70. Ragni, M.V., et al., *Bleeding tendency, platelet function, and pharmacokinetics of ibuprofen and zidovudine in HIV(+) hemophilic men*. Am J Hematol, 1992. **40**(3): p. 176-82.
71. Thon, J.N. and J.E. Italiano, *Platelets: production, morphology and ultrastructure*. Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 3-22.
72. Nielsen, M.J., H.J. Moller, and S.K. Moestrup, *Hemoglobin and heme scavenger receptors*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(2): p. 261-73.
73. Schmuckenschlager, A., et al., *Platelet count, temperature and pH value differentially affect hemostatic and immunomodulatory functions of platelets*. Thromb Res, 2023. **223**: p. 111-122.
74. Linden, M.D., *Platelet flow cytometry*. Methods Mol Biol, 2013. **992**: p. 241-62.
75. Spurgeon, B.E.J. and K.M. Naseem, *Platelet Flow Cytometry: Instrument Setup, Controls, and Panel Performance*. Cytometry B Clin Cytom, 2020. **98**(1): p. 19-27.
76. Ault, K.A., *The clinical utility of flow cytometry in the study of platelets*. Semin Hematol, 2001. **38**(2): p. 160-8.
77. Paniccia, R., et al., *Platelet function tests: a comparative review*. Vasc Health Risk Manag, 2015. **11**: p. 133-48.
78. Chazotte, B., *Labeling lysosomes in live cells with LysoTracker*. Cold Spring Harb Protoc, 2011. **2011**(2): p. pdb prot5571.
79. Jing, Y., et al., *Lysine-arginine imbalance overcomes therapeutic tolerance governed by the transcription factor E3-lysosome axis in glioblastoma*. Nat Commun, 2025. **16**(1): p. 2876.
80. Cazenave, J.P., et al., *Preparation of washed platelet suspensions from human and rodent blood*. Methods Mol Biol, 2004. **272**: p. 13-28.
81. Alves, R. and R. Grimalt, *A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification*. Skin Appendage Disord, 2018. **4**(1): p. 18-24.
82. Soha, S.A., et al., *Improved imaging and preservation of lysosome dynamics using silver nanoparticle-enhanced fluorescence*. Mol Biol Cell, 2023. **34**(10): p. ar96.

83. Zhitomirsky, B., H. Farber, and Y.G. Assaraf, *LysoTracker and MitoTracker Red are transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance*. J Cell Mol Med, 2018. **22**(4): p. 2131-2141.
84. Bennett, J.S., *Platelet-fibrinogen interactions*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 340-54.
85. Maslow, A., et al., *Interaction Between Platelet and Fibrinogen on Clot Strength in Healthy Patients*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2023. **37**(6): p. 942-947.
86. Wang, C., et al., *Investigation of endosome and lysosome biology by ultra pH-sensitive nanoprobe*s. Adv Drug Deliv Rev, 2017. **113**: p. 87-96.
87. Watts, C., *The endosome-lysosome pathway and information generation in the immune system*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1824**(1): p. 14-21.
88. Banerjee, M. and S.W. Whiteheart, *The ins and outs of endocytic trafficking in platelet functions*. Curr Opin Hematol, 2017. **24**(5): p. 467-474.
89. Langnau, C., et al., *Platelet Activation and Plasma Levels of Furin Are Associated With Prognosis of Patients With Coronary Artery Disease and COVID-19*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021. **41**(6): p. 2080-2096.
90. Ji, W., et al., *Erythrocytes as carriers of immunoglobulin-based therapeutics*. Acta Biomater, 2020. **101**: p. 422-435.
91. Martin, N.C., et al., *The use of phosphate buffered saline for the recovery of cells and spermatozoa from swabs*. Sci Justice, 2006. **46**(3): p. 179-84.
92. Schaale, D., et al., *Hemin promotes platelet activation and plasma membrane disintegration regulated by the subtilisin-like proprotein convertase furin*. FASEB J, 2024. **38**(21): p. e70155.
93. Kacprzak, M.M., et al., *Inhibition of furin by polyarginine-containing peptides: nanomolar inhibition by nona-D-arginine*. J Biol Chem, 2004. **279**(35): p. 36788-94.
94. Cameron, A., et al., *Polyarginines are potent furin inhibitors*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36741-9.
95. Cheng, Y.W., et al., *Furin Inhibitors Block SARS-CoV-2 Spike Protein Cleavage to Suppress Virus Production and Cytopathic Effects*. Cell Rep, 2020. **33**(2): p. 108254.
96. Remacle, A.G., et al., *Selective and potent furin inhibitors protect cells from anthrax without significant toxicity*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(6): p. 987-95.
97. Chen, C.H., et al., *α -granule biogenesis: from disease to discovery*. Platelets, 2017. **28**(2): p. 147-154.
98. Anderson, R., et al., *ADP-Mediated Upregulation of Expression of CD62P on Human Platelets Is Critically Dependent on Co-Activation of P2Y1 and P2Y12 Receptors*. Pharmaceuticals (Basel), 2020. **13**(12).
99. Sano, Y., et al., *Platelet activation through CD62P and the formation of platelet-monocyte complexes are associated with the exacerbation of mucosal inflammation in patients with ulcerative colitis*. Sci Rep, 2024. **14**(1): p. 28055.
100. Annarapu, G.K., et al., *Heme stimulates platelet mitochondrial oxidant production to induce targeted granule secretion*. Redox Biol, 2021. **48**: p. 102205.
101. Aoki, N., K. Naito, and N. Yoshida, *Inhibition of platelet aggregation by protease inhibitors. Possible involvement of proteases in platelet aggregation*. Blood, 1978. **52**(1): p. 1-12.

102. Takano, H., et al., *Platelet aggregation induced by platelet-activating factor is suppressed by cystine protease inhibitor*. *Biochem Med Metab Biol*, 1991. **45**(1): p. 41-7.
103. Mubeen, S., et al., *Exploring the Complex Network of Heme-Triggered Effects on the Blood Coagulation System*. *J Clin Med*, 2022. **11**(19).
104. Gitz, E., et al., *CLEC-2 expression is maintained on activated platelets and on platelet microparticles*. *Blood*, 2014. **124**(14): p. 2262-70.
105. Molloy, S.S., et al., *Bi-cycling the furin pathway: from TGN localization to pathogen activation and embryogenesis*. *Trends Cell Biol*, 1999. **9**(1): p. 28-35.
106. He, Z., A.M. Khatib, and J.W.M. Creemers, *The proprotein convertase furin in cancer: more than an oncogene*. *Oncogene*, 2022. **41**(9): p. 1252-1262.
107. Jemel, I., et al., *Group X secreted phospholipase A2 proenzyme is matured by a furin-like proprotein convertase and releases arachidonic acid inside of human HEK293 cells*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(42): p. 36509-21.
108. Puri, R.N., *Phospholipase A2: its role in ADP- and thrombin-induced platelet activation mechanisms*. *Int J Biochem Cell Biol*, 1998. **30**(10): p. 1107-22.
109. Rukoyatkina, N., et al., *Dual role of the p38 MAPK/cPLA2 pathway in the regulation of platelet apoptosis induced by ABT-737 and strong platelet agonists*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**(11): p. e931.
110. Nomura, S., *[Platelet activation marker]*. *Rinsho Byori*, 2003. **51**(11): p. 1096-101.
111. Bourne, J.H., et al., *Heme induces human and mouse platelet activation through C-type-lectin-like receptor-2*. *Haematologica*, 2021. **106**(2): p. 626-629.
112. Pachel, C., et al., *Inhibition of Platelet GPVI Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016. **36**(4): p. 629-35.
113. Konopatskaya, O., et al., *PKCalpha regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(2): p. 399-407.
114. Kinlough-Rathbone, R.L., et al., *Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: comparison with degranulation by thrombin*. *Thromb Haemost*, 1993. **70**(6): p. 1019-23.
115. Janes, S.L., et al., *ADP causes partial degranulation of platelets in the absence of aggregation*. *Br J Haematol*, 1994. **86**(3): p. 568-73.
116. Ciferri, S., et al., *Platelets release their lysosomal content in vivo in humans upon activation*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(1): p. 157-64.
117. Chen, D., et al., *Molecular mechanisms of platelet exocytosis: role of SNAP-23 and syntaxin 2 and 4 in lysosome release*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1782-8.
118. Tian, Y., et al., *Platelets and diseases: signal transduction and advances in targeted therapy*. *Signal Transduct Target Ther*, 2025. **10**(1): p. 159.
119. Schallreuter, K.U., *[Hermansky-Pudlak syndrome]*. *Hautarzt*, 1989. **40**(3): p. 130-3.
120. De Jesus Rojas, W. and L.R. Young, *Hermansky-Pudlak Syndrome*. *Semin Respir Crit Care Med*, 2020. **41**(2): p. 238-246.
121. Berz, F., M. Weiss, and B.H. Belohradsky, *[Albinism, thrombopathy, ceroid storage disease--Hermansky-Pudlak syndrome. Overview and description with immunodeficiency]*. *Klin Padiatr*, 1996. **208**(2): p. 83-7.
122. Krisp, A., et al., *Hermansky-Pudlak syndrome*. *Eur J Dermatol*, 2001. **11**(4): p. 372-3.

123. Vicary, G.W., et al., *Pulmonary Fibrosis in Hermansky-Pudlak Syndrome*. Ann Am Thorac Soc, 2016. **13**(10): p. 1839-1846.