

**Aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Markus Böck

Der Einfluss der Proteasomhemmung durch Bortezomib auf die Aktivierbarkeit

humaner Thrombozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Anne Marie Heidi Schüpferling

aus Rosenheim

Würzburg, März 2023



Referent: Prof. Dr. med. Markus Böck

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Sophia Danhof

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.09.2023

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Thrombozyten.....	1
1.1.1	Physiologische Bedeutung der Thrombozyten.....	1
1.1.2	Ablauf der primären Hämostase	2
1.1.3	Die Rolle von Thrombozyten im Rahmen von Infektionen und Immunantwort	3
1.1.4	Aktivierende Systeme in Thrombozyten	6
1.1.4.1	MAP Kinasen Signalwege in Thrombozyten.....	6
1.1.4.2	Akt/PKB Signalweg in Thrombozyten.....	11
1.2	Proteasomsystem	13
1.2.1	Aufbau des Proteasomsystems	13
1.2.2	Funktionsweise des UPS	14
1.2.3	Funktionen des UPS.....	18
1.2.4	Das UPS in Thrombozyten	19
1.2.5	Proteasomhemmung.....	20
1.2.6	Proteasomhemmung in Thrombozyten	21
1.3	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Ethik- und Tierversuchsvotum	24
2.2	Material.....	24
2.2.1	Chemikalien	24
2.2.2	Puffer und Lösungen.....	26
2.2.3	Kits	27
2.2.4	Antikörper, Inhibitoren und Aktivatoren.....	27
2.2.4.1	Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot	27
2.2.4.2	Inhibitoren und Aktivatoren.....	28
2.2.5	Geräte und Software	29
2.2.6	Gebrauchsmaterial	31
2.3	Methoden	32
2.3.1	Gewinnung einer humanen Blutprobe.....	32
2.3.2	Präparation und Waschen von Thrombozyten	32
2.3.3	Proteasomhemmung mittels Bortezomib	33
2.3.4	Cell Viability	34

2.3.5	Lichttransmissions-Aggregometrie.....	35
2.3.6	Western Blot-Analyse	36
2.3.6.1	Aufbereitung der Proben für die Western Blot-Analyse.....	36
2.3.6.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.3.6.3	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot Verfahren	38
2.3.6.4	Immunologischer Proteinnachweis.....	38
2.3.7	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Einfluss von Bortezomib auf die Viabilität von Thrombozyten	40
3.2	Einfluss von Bortezomib auf die Thrombozytenaggregation	41
3.2.1	Wirkung von Bortezomib auf unstimulierte Thrombozyten	41
3.2.2	Wirkung von Bortezomib auf die Kollagen-induzierte Aggregation von Thrombozyten	42
3.2.3	Wirkung von Bortezomib auf die TRAP-6-induzierte Aggregation von Thrombozyten	44
3.3	Einfluss von Bortezomib auf aktivierende Signalwege	45
3.3.1	Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-p38 MAP Kinase 45	
3.3.2	Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-ERK1/2	47
3.3.3	Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-Akt/PKB.....	49
4	Diskussion	52
4.1	Abnahme der Thrombozytenviabilität durch supramaximale Proteasomhemmung	54
4.2	Aggregationsfähigkeit humaner Thrombozyten unter Proteasomhemmung.	55
4.3	Keine wesentliche Beeinflussung der aktivierenden Signalwege durch die Proteasomhemmung	60
4.4	Hämostaseologische Wirkung der Proteasominhibition	63
4.5	Methodische Herausforderungen und Einschränkungen.....	64
4.6	Ausblick	65
5	Zusammenfassung.....	67
6	Literaturverzeichnis	68
I	Abkürzungsverzeichnis	80
II	Abbildungsverzeichnis	83
III	Tabellenverzeichnis	84

IV	Danksagung	85
V	Persönliche Publikation	86

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Physiologische Bedeutung der Thrombozyten

Thrombozyten, die im Deutschen auch Blutplättchen genannt werden, sind neben den Erythrozyten und den Leukozyten ein korpuskulärer Blutbestandteil. Die bikonvex geformten Thrombozyten mit einem Durchmesser von circa 2 - 5 μm zirkulieren im Blut für 7-10 Tage in einer Konzentration (Konz.) von 150.000 - 400.000 pro μl (Michelson 2010).

Thrombozytopoiese beschreibt die Entstehung von Thrombozyten aus reifen Megakaryozyten, welche im Zytoplasma Granula und Demarkationsmembranen enthalten. Eben diese fusionieren und führen so zu einer Demarkierung von Fragmenten in Thrombozytengröße. In reifen Megakaryozyten fusionieren die Demarkierungsmembranen und die Scherkräfte des Blutes führen zu einer Freisetzung der Thrombozyten direkt ins Blut (Deutsch and Tomer 2006, Michelson 2010, Wang and Zheng 2016). Somit sind Thrombozyten zellkernlose Zellfragmente aus Megakaryozyten.

Die drei wichtigen sekretorischen Zellorganellen der Thrombozyten sind α -Granula, dichte Granula (dense bodies, δ -Granula) und Lysosomen (λ -Granula) (Blair and Flaumenhaft 2009, Rivera, Lozano et al. 2009). α -Granula sind die am häufigsten vorkommende Zellorganelle (Blair and Flaumenhaft 2009). Sie beinhalten sowohl prokoagulatorische Substanzen wie Adhäsionsmoleküle (P-Selektin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Thrombospondin, Fibrinogen, Integrine) und Bestandteile der Gerinnungskaskade (Faktor V, XI und XIII) als auch Bestandteile des fibrinolytischen Pathways (Plasminogen) (Harrison and Cramer 1993, Blair and Flaumenhaft 2009). Außerdem beinhalten sie immunologisch und infektiologisch wichtige Substanzen, z.B. Chemokine wie RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) oder Macrophage Inflammatory Protein-1 α (Blair and Flaumenhaft 2009). Dichte Granula enthalten überwiegend kleine Moleküle wie Adenosindiphosphat (ADP), Calcium (Ca), Phosphat und Serotonin (McNicol and Israels 1999).

Die wesentliche Funktion von Thrombozyten besteht in der Hämostase, ergo dem Verschluss von Läsionen eines Blutgefäßes. Ist das Endothel eines Blutgefäßes beschädigt, werden Thrombozyten durch den Kontakt mit subendothelialer Matrix (Kollagen und vWF) aktiviert und aggregieren. Diesen Vorgang der Thrombusbildung fasst man unter primärer Hämostase zusammen (vgl. 1.1.2) (Horiuchi 2006). Die sekundäre Hämostase führt über die Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Bildung eines „mechanisch stabilen Blutgerinnsels“ aus unlöslichen Fibrinfäden. Zelluläre Reparaturmechanismen verschließen den Gewebsdefekt und bauen im Verlauf das Gerinnsel wieder ab (Golebiewska and Poole 2015).

Thrombozyten spielen jedoch auch eine Rolle im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen, zum einen durch die Freisetzung inflammatorischer Zytokine, wie IL-1 α (Interleukin-1 α) oder TGF β 1 (Transforming growth factor β 1) und Chemokinen, wie RANTES aus den Granula, zum anderen durch Interaktionen mit Immunzellen, sowohl des angeborenen (Neutrophile, Monozyten und dendritische Zellen) als auch des erworbenen Immunsystems (B- und T-Lymphozyten) (vgl. 1.1.3) (Semple, Italiano et al. 2011, Golebiewska and Poole 2015, Lam, Vijayan et al. 2015).

Pathophysiologisch sind Thrombozyten durch die Bildung von arteriosklerotischen Plaques an der Entstehung vieler Krankheiten beteiligt (z.B. Koronare Herz Krankheit, Herzinfarkt, Apoplex) und somit auch Angriffspunkt für die Therapie dieser Erkrankungen (Gibbins 2004, Michelson 2010).

1.1.2 Ablauf der primären Hämostase

Die Bildung eines Thrombus an der Gefäßverletzung lässt sich in einem vereinfachten Modell in drei Phasen unterteilen: der Initiation, der Extension und der Stabilisierung (Rivera, Lozano et al. 2009).

Während der Initiationsphase kommt es zum Arrest der Thrombozyten am exponierten Subendothel. Insbesondere an Kollagen haften Thrombozyten vor allem über den vWF, was auch zur Induktion von aktivierenden Signalwegen führt (Golebiewska and Poole 2015). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung ist durch

Thrombin via Protease-aktivierter Rezeptoren (PAR), beispielweise bei einer thrombotischen oder inflammatorischen Erkrankung (Leger, Covic et al. 2006).

Die Extensionsphase beschreibt die Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Thrombozyten. Durch die initiale Aktivierung kommt es zu einer intrazellulären Calciumerhöhung. Diese wiederum führt zur Freisetzung des Inhalts der Granula sowie zur Integration der Oberflächenproteine der Granula in die Thrombozytenmembran mittels Exozytose (Horiuchi 2006, Golebiewska and Poole 2015). Diese Granula enthalten u.a. ADP, Thromboxan A₂ (TXA₂), Adrenalin und Thrombin, die beispielsweise mit ihren G-Protein gekoppelten Rezeptoren interagieren und somit inside-out Signalling generieren. Das hat unter anderem die Aktivierung von Integrinen wie $\alpha_{IIb}\beta_3$ zur Folge (Rivera, Lozano et al. 2009). Außerdem werden weitere flottierende Thrombozyten aktiviert und aggregieren so zu einem Thrombus.

Die Stabilisierungsphase verhindert ein verfrühtes Auflösen des Thrombus vor der abschließenden Wundheilung. Binden Integrine und vWF wiederum an Fibrinogen, so wird die Stabilisierung des Thrombus durch feste Brücken und die Thrombozytenaktivierung weiter unterstützt (Rivera, Lozano et al. 2009).

Parallel dazu ist die negative Regulation von Thrombozyten essenziell, um unkontrollierte Thrombusbildung zu verhindern. Hierfür wird eine Balance zwischen Aktivierung und Hemmung benötigt (Rivera, Lozano et al. 2009).

1.1.3 Die Rolle von Thrombozyten im Rahmen von Infektionen und Immunantwort

Angeborenes Immunsystem

Zur Erkennung von Krankheitserregern nutzen Immunzellen sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), welche mittels TLR (Toll-like-Rezeptoren) erkannt werden (Janeway and Medzhitov 2002). Einer der am besten untersuchten TLR-Liganden sind Lipopolysaccharide (LPS), welche Bestandteile der Zellmembran von gramnegativen Bakterien sind. LPS wird von Thrombozyten unter anderem mittels TLR4 erkannt und gebunden, die daraufhin ausgelösten Signalwege führen zu einer Thrombozytenaktivierung, zur Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 β und TNF α und zur Interaktion mit anderen Zellen des Immunsystems, beispielsweise Neutrophilen

(Aslam, Speck et al. 2006, D' Atri and Schattner 2017, Niklaus, Klingler et al. 2022). Neutrophile bilden dann sogenannte neutrophil extracellular traps (NETs), um Pathogene einzufangen (Clark, Ma et al. 2007). LPS führt zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation durch Thromboxan oder über den Glykoprotein VI (GPVI)-Kollagenrezeptor ausgelöst, sowie zur Fibrinogenbindung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezien (ROS). Es scheint, dass LPS durch einen TLR4-PI3K-Akt/PKB-ERK1/2-PLA₂ (Phosphoinositide 3-Kinase - Proteinkinase B -Extracellular-signal Regulated Kinase Phospholipase A₂) abhängigen Signalweg die Thrombozytenaktivierung verstärkt, da die Effekte von LPS mit einer Phosphorylierung ebendieser Substanzen assoziiert sind (Lopes Pires, Clarke et al. 2017).

Für die Stimulation von Thrombozyten via TLR2 wiederum ist beschrieben, dass die Aktivierung von TLR2 zur Bildung von Thrombozyten-Neutrophilen-Aggregaten führt. Außerdem kann über TLR2 Stimulation der PI3K-Akt/PKB Signalweg aktiviert werden. Dieser führt in Thrombozyten unter anderem zu Aggregation, Adhäsion, Sekretion und Interaktion mit Leukozyten (Blair, Rex et al. 2009).

Die erste Reaktion des Körpers auf eine Infektion wird als Akut-Phase-Reaktion bezeichnet. In dieser Phase werden typischerweise Akut-Phase-Proteine produziert, wie CRP und Fibrinogen. Diese Proteine sind verantwortlich, um das Wachstum von Mikroben zu hemmen bzw. zu stoppen. Außerdem wirken sie prokoagulatorisch, um Pathogene in lokalen Thromben einzufangen. Thrombozyten sind in der Lage eine Akut-Phase-Reaktion auszulösen (Aggrey, Srivastava et al. 2013). Auch scheint es logisch, dass Gefäßverletzungen eine Akut-Phase-Reaktion auslösen, um eine mögliche Invasion von Mikroorganismen ins Blutsystem zu verhindern (Morrell, Aggrey et al. 2014). Bislang konnte in Thrombozyten vor allem IL-1 β als potenter Auslöser der Akut-Phase-Reaktion nachgewiesen werden (Aggrey, Srivastava et al. 2013). IL-1 β , welches nicht in Granula gelagert ist, wird erst durch eine Thrombozytenaktivierung produziert, indem IL-1 β pre-messenger Ribonukleinsäure (mRNA) gespliced wird und in mRNA übersetzt wird. Dieses wiederum wird in pro-IL1 β übersetzt und durch die Caspase 1 prozessiert und final kann funktionales IL-1 β freigesetzt werden (Lindemann, Tolley et al. 2001).

Erworbenes Immunsystem

In Thrombozyten ist die Rolle des angeborenen Immunsystems besser untersucht als die des erworbenen Immunsystems. Jedoch wissen wir, dass Thrombozyten auch dieses beispielsweise durch Migration, Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen beeinflussen (Elzey, Tian et al. 2003, Danese, de la Motte et al. 2004, Morrell, Aggrey et al. 2014).

Thrombozyten nutzen verschiedene Mechanismen zur Interaktion mit dem Immunsystem, einerseits mittels Rezeptor-Liganden z.B. CD40 (Cluster of Differentiation) und CD40L, auch CD154 genannt, andererseits durch die Freisetzung von Mediatoren aus den Granula (Grewal and Flavell 1998, Elzey, Tian et al. 2003, Morrell, Aggrey et al. 2014).

Kommt es zu einer vaskulären Inflammation rekrutieren und aktivieren Thrombozyten durch die Freisetzung von Chemokinen, wie beispielsweise RANTES, T-Zellen. T-Zellen, die CD40L auf ihrer Oberfläche exprimieren, wiederum aktivieren durch CD40 Thrombozyten, welche wiederum RANTES freisetzen, so entsteht ein Feedbackloop der T-Zellrekrutierung (Danese, de la Motte et al. 2004). In den α -Granula von Thrombozyten ist außerdem eine relevante Menge an löslichem CD40L. Werden Thrombozyten aktiviert, kommt es zum einen zur Freisetzung von CD40L, zum anderen zur Expression von CD40L an der Thrombozytenoberfläche. Lösliches CD40L wiederum erzeugt durch eine Phosphorylierung von p38 MAP Kinasen, jedoch nicht über eine Phosphorylierung von ERK, auch den eben beschriebenen Feedbackloop der T-Zellrekrutierung (Danese, de la Motte et al. 2004). Zudem konnte eine Verstärkung der T-Zellimmunität gegenüber viralen und bakteriellen Angriffen durch thrombozytäres CD40L nachgewiesen werden (Elzey, Tian et al. 2003, Elzey, Schmidt et al. 2008). Thrombozyten können außerdem über CD40L zu einem B-Zell-Isotyp switch und somit zur Produktion von Immunglobulin G führen und die Reifung von dendritischen Zellen induzieren (Elzey, Tian et al. 2003, Kissel, Berber et al. 2006, Semple, Italiano et al. 2011).

1.1.4 Aktivierende Systeme in Thrombozyten

Thrombozyten können durch verschiedene Aktivatoren aktiviert werden. Zwei der wichtigsten Aktivatoren sind Kollagen und Thrombin.

Thrombozyten besitzen verschiedene Rezeptoren, an welche Kollagen bindet. Die zwei wichtigsten Rezeptoren sind GPVI (Aktivierung der Thrombozyten) und das Integrin $\alpha_2\beta_1$ (stabile Adhäsion) (Gibbins 2004). Beim ersten Kontakt von Thrombozyten mit subendotheliale Kollagen binden Thrombozyten, vermittelt durch den vWF, an den GPIb-V-IX-Komplex oder $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Gibbins 2004).

Bei der Bildung und Stabilisierung von Thromben spielt Thrombin, als vermutlich effektivster Aktivator von Thrombozyten, eine entscheidende Rolle. Thrombin induziert unter anderem den shape change, Sekretion, Calciumerhöhung und Proteinphosphorylierungen. Vor allem die G_q -gekoppelten (Phospholipase C stimulierende G-Proteine) Rezeptoren PAR1 und PAR4 vermitteln die Thrombin-induzierten Antworten. Aber auch der GPIb/IX/V Komplex ist ein Angriffspunkt von Thrombin. In humanen Thrombozyten scheint PAR1 der hauptverantwortliche Rezeptor für die Aktivierung zu sein, welcher auch Angriffspunkt des Reagenz Thrombin Receptor-Activating Peptide 6 (TRAP-6) ist (Rivera, Lozano et al. 2009).

1.1.4.1 MAP Kinasen Signalwege in Thrombozyten

Während Thrombozyten von außen über verschiedene Rezeptoren angesteuert werden können, lassen sich daraufhin intrazellulär verschiedene Signalwege verfolgen. In vielen Zellen spielen Mitogen aktivierte Protein Kinasen (MAPK) hierbei eine Rolle. In Thrombozyten wurden bislang 3 Subfamilien der MAPK nachgewiesen: Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK1/2), c-Jun amino-terminal Kinase (JNK abgekürzt) 1/2/3 und die p38 MAP Kinase. Zur Aktivierung dieser MAP Kinasen führt typischerweise ein Signalweg, der mit Ras/Rho beginnt, diese stimulieren die MAPKKKK, diese wiederum führen über eine Phosphorylierung der MAPKKK zur Phosphorylierung der MAPKK. Final führt die Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAPK durch die MAPKK zu einer Aktivierung der Zielsubstrate, die auch als MKs (MAPK-aktivierte Proteinkinasen) bezeichnet werden, und beispielsweise zytoplasmatische oder -skelettale Proteine sind

(Adam, Kauskot et al. 2008). Im Folgenden wird genauer auf die p38 MAP Kinase und die ERK1/2 eingegangen.

Die Aktivatoren der p38 MAP Kinase in Thrombozyten sind unter anderem Thrombin (Kramer, Roberts et al. 1995, Saklatvala, Rawlinson et al. 1996), Kollagen (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996, Borsch-Haubold, Kramer et al. 1997, Mazharian, Roger et al. 2005), TXA₂ (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996) und ADP (Begonja, Geiger et al. 2007). Die dabei involvierten Upstream-Signalwege sind noch nicht genauer beschrieben und Gegenstand aktueller, teils kontroverserer Forschung (Canobbio, Reineri et al. 2004, Mazharian, Roger et al. 2005, Begonja, Geiger et al. 2007).

Auch der Downstream-Signalweg der p38 MAP Kinase ist bislang nicht genau untersucht. Ein Substrat der p38 MAP Kinase ist die zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂), welche für die Aggregation relevant ist. Der dazugehörige Signalweg kann durch niedrige Konzentrationen verschiedener Agonisten wie Thrombin oder Kollagen induziert werden (Kramer, Roberts et al. 1995, Borsch-Haubold, Kramer et al. 1997, Canobbio, Reineri et al. 2004).

Für die Aggregation, induziert durch niedrige Kollagenkonzentrationen, scheint die p38 MAP Kinase ein notwendiger Teil des Signalwegs zu sein. Dieser Signalweg beinhaltet u.a. die TXA₂ Produktion. TXA₂ erzeugt wiederum ein positives Feedback über seinen eigenen Rezeptor (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996). Hohe Kollagenkonzentrationen scheinen bei der Aggregationsinduktion nicht abhängig von der p38 MAP Kinase (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996). Auf physiologischer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass die p38 MAP Kinase im platelet spreading über eine Kollagenmatrix via $\alpha_2\beta_1$ beteiligt und unabhängig von der Stärke der Scherkräfte ist (Mazharian, Roger et al. 2005). Insgesamt sind jedoch die genauen Signalwege der p38 MAP Kinase, die durch Kollagen induziert werden, weitestgehend unklar (Mazharian, Roger et al. 2005, Li, Zhang et al. 2006).

Für Thrombin ist bekannt, dass die p38 MAP Kinase über verschiedene Signalwege aktiviert wird. Die durch PAR und GPIIb-IX-V vermittelte Freisetzung der Granula, insbesondere TXA₂ und ADP führt über deren Rezeptoren (P2Y₁₂ bzw. TXA₂-Rezeptor)

an den Thrombozyten zur Phosphorylierung der p38 MAP Kinase (vgl. Abb. 1) (Begonja, Geiger et al. 2007). Niedrige Thrombinkonzentrationen scheinen bei der Aggregationsinduktion nicht abhängig von der p38 MAP Kinase (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996, Begonja, Geiger et al. 2007).

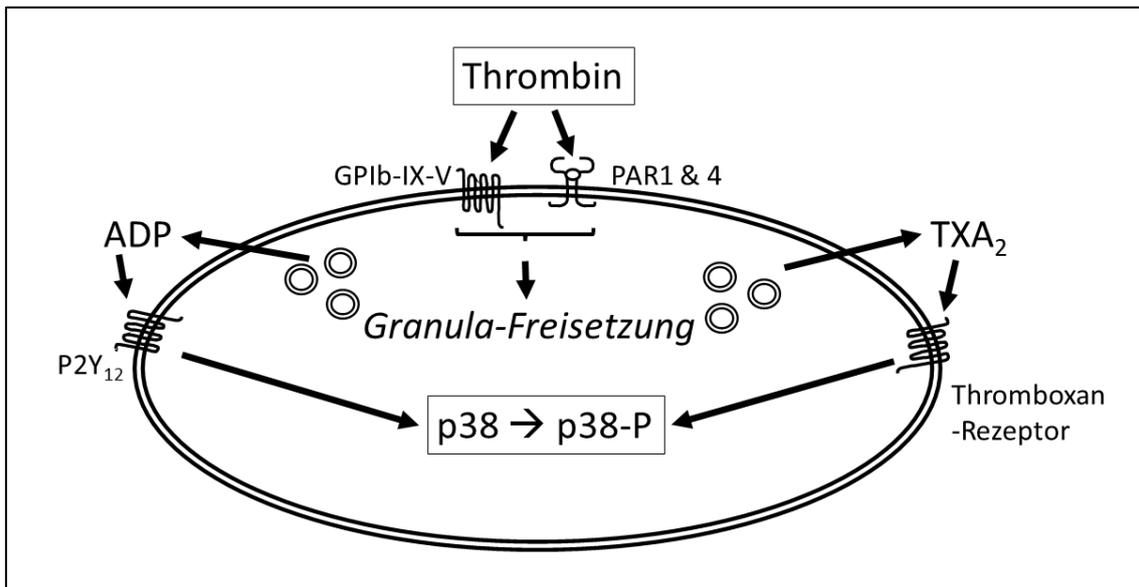


Abb. 1 Modell der p38 MAP Kinase-Aktivierung durch Thrombin

Thrombin (insbesondere in hohen Konzentrationen) bindet an Thrombozyten via GPIb-IX-V, PAR1 und PAR4. Diese Rezeptoren führen intrazellulär zu einer Freisetzung der Granula und somit u.a. von ADP, welches via P2Y₁₂-Rezeptor, und TXA₂, welches via TXA-Rezeptor, intrazellulär zu einer Phosphorylierung der p38 MAP Kinase führen. Abbildung modifiziert nach (Adam, Kauskot et al. 2008). Lizenz liegt vor. Adenosindiphosphat (ADP), Glykoprotein (GP), Mitogen-aktiviertes Protein (MAP), Protease-aktivierter Rezeptor (PAR), Thromboxan A (TXA);

In Thrombozyten kann eine Aktivierung der ERK2 durch Thrombin (Nadal-Wollbold, Pawlowski et al. 2002), Kollagen (Oury, Toth-Zsomboki et al. 2002, Roger, Pawlowski et al. 2004), ADP (Garcia, Shankar et al. 2007) und andere Agonisten erfolgen. Im Gegensatz dazu scheint es, dass die ERK1 durch starke Aktivatoren wie Thrombin oder Kollagen wenig phosphoryliert wird (Borsch-Haubold, Kramer et al. 1995, Garcia, Shankar et al. 2007). Eine Erklärung hierfür ist, dass die ERK1 in deutlich niedrigeren Konzentrationen in Thrombozyten vorkommt als die ERK2 (Borsch-Haubold, Kramer et al. 1995, Adams 2003, Garcia, Shankar et al. 2007, Adam, Kauskot et al. 2008).

Betrachten wir die intrazellulären Signalwege, die durch Kollagen induziert werden, genauer, so zeigen sich abhängig von der verwendeten Konzentration verschiedene Signalwege. Niedrige Dosen von Kollagen (1 µg/ml) führen zu einer initialen

Freisetzung von Adenosintriphosphat (ATP), welches über P2X₁ (ATP-gated Kationenkanal) zu einem Calciumeinstrom in die Zelle führt. Über den P2X₁-PKC-MEK1/2 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Signalweg wird die ERK2 aktiviert und die Myosin Leicht Ketten Kinase phosphoryliert, was auf zellulärer Ebene zum shape change und zur Exozytose der Granula führt (Oury, Toth-Zsamboki et al. 2002, Toth-Zsamboki, Oury et al. 2003). Hohe Dosen von Kollagen (2 µg/ml und mehr) führen zu einer Aktivierung der Thrombozyten unabhängig vom P2X₁-Signalweg (Oury, Toth-Zsamboki et al. 2002, Toth-Zsamboki, Oury et al. 2003). Hier wird einerseits direkt über die Kollagenrezeptoren GPVI und α₂β₁ sowie andererseits indirekt durch die Kostimulation des P2Y₁₂ ADP-Rezeptors und durch den G_q-gekoppelten TXA₂-Rezeptor vermittelt (vgl. Abb. 2) (Roger, Pawlowski et al. 2004, Adam, Kauskot et al. 2008). Diese Aktivierung der ERK2 ist essenziell für die Kollagen-induzierte Aggregation und Sekretion von Thrombozyten (Roger, Pawlowski et al. 2004).

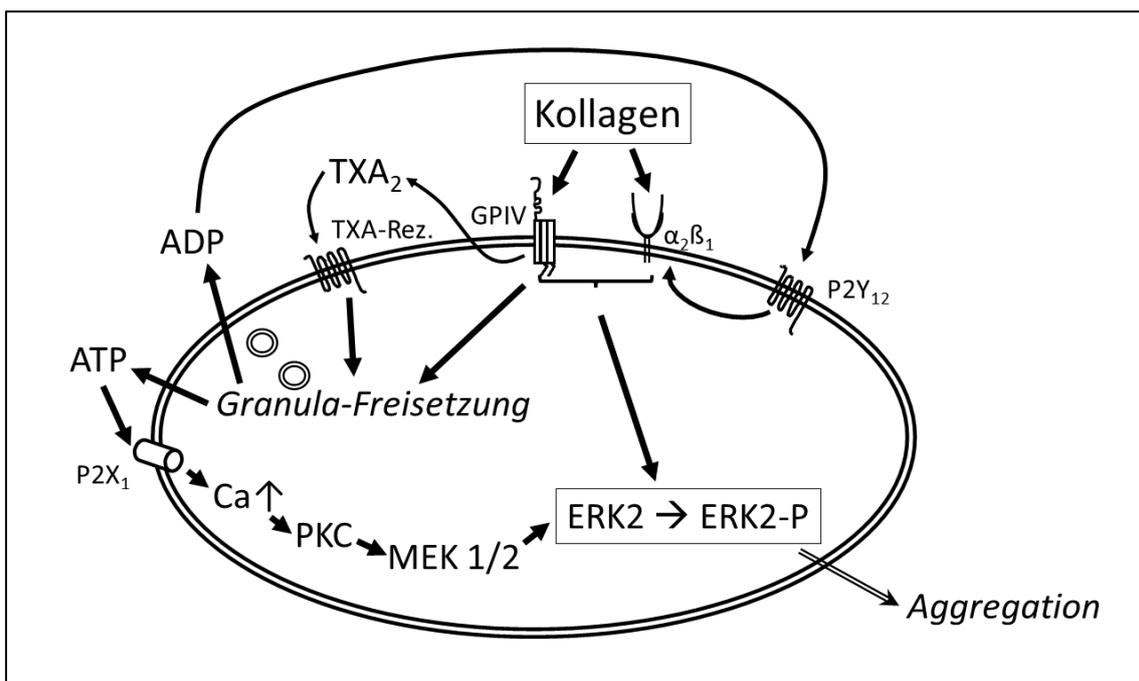


Abb. 2 Modell der ERK2-Aktivierung durch Kollagen

In niedrigen Konzentrationen führt Kollagen v.a. via ATP und den P2X₁-PKC-MEK-Signalweg zur Phosphorylierung von ERK2. Liegt jedoch eine hohe Konzentration von Kollagen vor, so wird ERK direkt über die GPVI- und α₂β₁-Rezeptoren und indirekt über ADP aktiviert. Diese Aktivierung kann zur Aggregation der Thrombozyten führen. Abbildung modifiziert nach (Roger, Pawlowski et al. 2004, Adam, Kauskot et al. 2008). Lizenzen liegen vor.

Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), Calcium (Ca), Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), Glykoprotein (GP), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MEK), Proteinkinase C (PKC), Thromboxan A (TXA);

Die ERK2 spielt bei der Thrombozytenadhäsion an Kollagen hoher Dichte erst bei hohen Scherkräften eine Rolle. Dies wird vermutlich v.a. über GPIIb-vWF vermittelt (Mazharian, Roger et al. 2005). Es scheint, als würde in Gefäßen mit hohen Scherkräften initial die Bindung von Thrombozyten über den vWF stattfinden, wobei die ERK2 intrazellulär bei der Aktivierung dieser Thrombozyten beteiligt ist. Im zweiten Schritt folgt darauf die irreversible Bindung von Thrombozyten über die Kollagenrezeptoren, wobei hier die p38 MAP Kinase intrazellulär bei der Aktivierung beteiligt ist (Mazharian, Roger et al. 2005).

Verwendet man Thrombin in variablen Konzentrationen als Aktivator führt dies zu einer ERK1/2 Aktivierung, welche entscheidend für die PAR-vermittelte TXA₂ Generierung ist, die wiederum durch den P2Y₁₂-Rezeptor-vermittelten Signalweg verstärkt wird (Shankar, Garcia et al. 2006). Beim Einsatz hoher Thrombinkonzentrationen ist bekannt, dass diese über die PKC und die MEK1/2 zur Aktivierung der ERK2 führen (Nadal-Wollbold, Pawlowski et al. 2002). Eine wichtige Rolle bei der durch Thrombin induzierten ERK2-Phosphorylierung spielt die ADP-Freisetzung und dessen Wirkung am P2Y₁₂-Rezeptor (vgl. Abb. 3) (Gurbel, Kuliopulos et al. 2015). Welcher Signalweg, der Thrombin-PAR1/4 oder der ADP-P2Y₁₂, jedoch hauptverantwortlich für die Thrombozytenaggregation und -sekretion ist, scheint bis heute unklar (Gurbel, Kuliopulos et al. 2015).

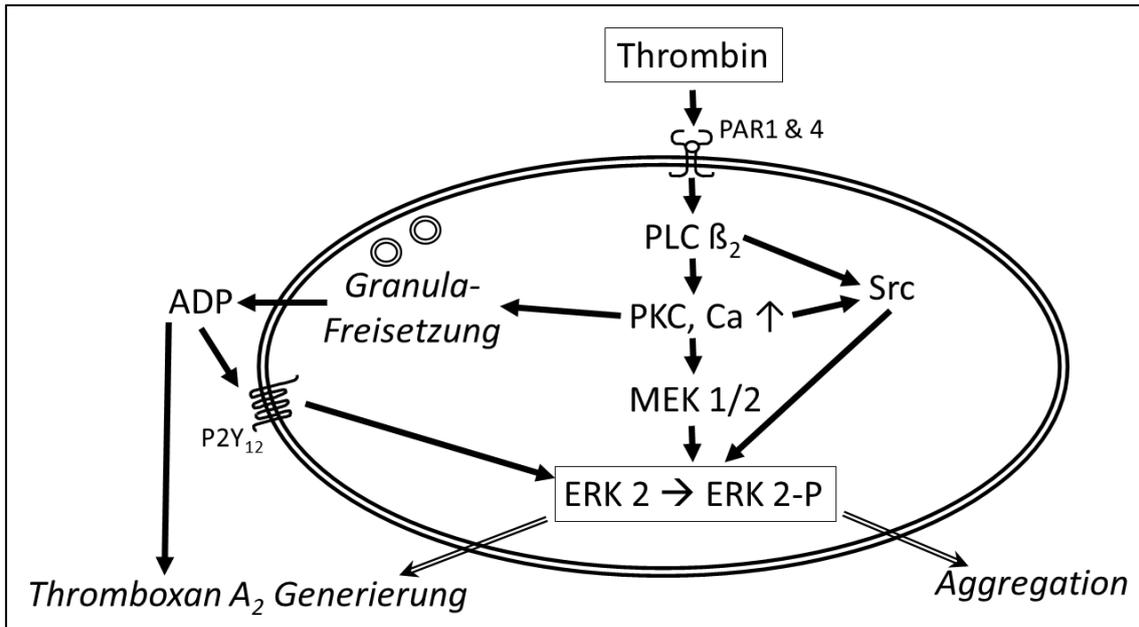


Abb. 3 Modell der ERK2-Aktivierung durch Thrombin

Thrombin bindet an die PAR1 und 4 von Thrombozyten und führt einerseits via PKC-MEK andererseits via ADP-P2Y₁₂ zur ERK2-Phosphorylierung. Insgesamt ist der ERK-Signalweg sowohl an der Aggregation als auch an der TXA₂ Generierung beteiligt. Abbildung modifiziert nach (Adam, Kauskot et al. 2008). Lizenz liegt vor.

Adenosindiphosphat (ADP), Calcium (Ca), Extracellulär-signal Regulierte Kinase (ERK), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MEK), Phospholipase C (PLC), Protease-aktivierter Rezeptor (PAR), Proteinkinase C (PKC), Thromboxan A (TXA);

1.1.4.2 Akt/PKB Signalweg in Thrombozyten

Ein weiteres Molekül, das Teil intrazellulärer Signalkaskaden in Thrombozyten ist, ist die Akt/PKB. Diese wird durch Phosphorylierung nach Stimulation mit z.B. Thrombin (Barry and Gibbins 2002, Kim, Jin et al. 2004) oder Kollagen (Barry and Gibbins 2002) aktiviert.

Kollagen bindet unter anderem an den GPVI-Rezeptor der via Syk, PLCγ2 und PI3K die Akt/PKB phosphoryliert und somit aktiviert (Gibbins 2004).

Die Aktivierung durch Thrombin erfolgt vermittelt durch die G-gekoppelten Rezeptoren PAR1 und PAR4 und mündet auch in der Aktivierung von PI3K (Barry and Gibbins 2002, Kim, Jin et al. 2004). Eine Aktivierung von Akt/PKB durch PAR1 induziert, ist überwiegend von der G_i (Cyclase inhibierende G-Proteine)-Stimulation durch freigesetztes ADP am P2Y₁₂-Rezeptor abhängig (Kim, Jin et al. 2004, Resendiz, Kroll et al. 2007, Gurbel, Kuliopulos et al. 2015). Molekulare Verbindungen zwischen PI3K und Akt/PKB sind z.B. die PDK1 und 2 (Phosphoinositide-dependent Kinase) (Barry and

Gibbins 2002, Kim, Jin et al. 2004). In Thrombin-stimulierten Thrombozyten gibt es jedoch auch einen weiteren Akt/PKB-Signalweg, der unabhängig von PI3K scheint (Barry and Gibbins 2002). Hierbei spielt unter anderem die Aktivierung von PLC β 1 und PKC eine Rolle (Barry and Gibbins 2002).

Auch wenn Thrombin und Kollagen verschiedene Signalwege aktivieren, so münden beide in die Aktivierung von PI3K. Diese ist ein Schlüsselmolekül in den intrazellulären Signalwegen bei der Aktivierung durch Agonisten (Barry and Gibbins 2002). Das genaue Downstream-Signalling von Akt/PKB ist bislang jedoch nicht vollständig verstanden (Gibbins 2004).

Auf funktionaler Ebene ist die Akt/PKB nicht nur in der Thrombozytenaggregation (Chen, De et al. 2004, Woulfe, Jiang et al. 2004) sondern auch in der Aktivierung von Integrinen (Gibbins 2004) , Granula-Sekretion (Chen, De et al. 2004, Gibbins 2004, Woulfe, Jiang et al. 2004, Resendiz, Kroll et al. 2007) und Calcium-Regulation beteiligt (Chen, De et al. 2004). Außerdem ist die Akt/PKB in diversen Zellen für die Regulation des Zell-Survivals, des Zellzyklus und den zellulären Metabolismus relevant (Romashkova and Makarov 1999, Barry and Gibbins 2002). Beispielsweise ist die Akt/PKB in Thrombozyten in der Lage die Phosphorylierung der Glykogen Synthase Kinase (GSK) 3 zu induzieren (Gibbins 2004). Diese wiederum fördert die Glykogensynthese und so den Transport von Glucose in die Zellen, wodurch der Zellmetabolismus und das Überleben der Zelle unterstützt wird (Barry, Graham et al. 2003). GSK3 scheint möglicherweise eine negativ regulatorische Funktion in stimulierten Thrombozyten zu haben (Barry, Graham et al. 2003).

1.2 Proteasomsystem

1.2.1 Aufbau des Proteasomsystems

Für die Entdeckung und Erforschung des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) erhielten Professor Avram Hershko, Professor Aaron Ciechanover und Professor Irwin Rose 2004 den Nobelpreis für Chemie.

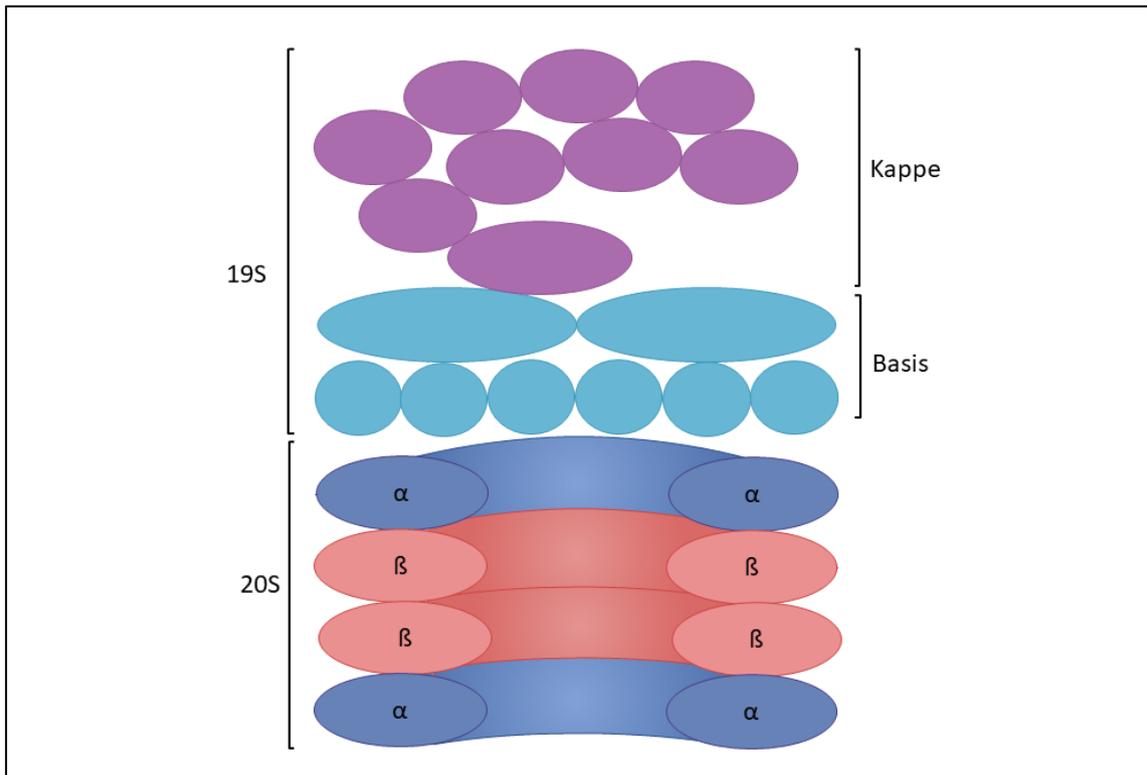


Abb. 4 Schematische Darstellung des 26S Proteasoms

Das 26S Proteasom besteht aus einer 19S und einer 20S Untereinheit. Die 19S Untereinheit lässt sich unterteilen in eine Kappe (lila), die aus Rpn besteht und einer Basis (hellblau), die sich aus Rpn und Rpt zusammensetzt. Die 20S Untereinheit besteht aus vier Ringen. Die äußeren Ringe (dunkelblau) setzen sich aus je sieben α Untereinheiten, die inneren Ringe (lachsfarben) aus je sieben β Untereinheiten zusammen. Abbildung modifiziert nach (Gomes 2013). Commons Attribution License liegt vor. Regulatory particle non-ATPase (Rpn), regulatory particle ATPase (Rpt);

Das Proteasom ist ein Multienzymkomplex, welches bei eukaryotischen Zellen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern existiert (Wojcik and DeMartino 2003). Bei Eukaryoten setzen sich die 26S Proteasome aus einem katalytischen 20S Kernkomplex und regulatorischen 19S Komplexen zusammen (vgl. Abb. 4). Die 19S Untereinheit bindet entweder an beiden Enden oder an einem Ende der 20S Untereinheit (Peters 1994, Pickart and Cohen 2004).

Die 19S Untereinheit besteht aus mehreren Untereinheiten, einer Basis und einer Kappe (vgl. Abb. 4). Die Basis enthält sechs ATPase Untereinheiten, sogenannte Rpt (regulatory particle ATPase), und zwei non ATPase Untereinheiten, Rpn (regulatory particle non-ATPase) (Gomes 2013).

Die 20S Untereinheit ist als Hohlzylinder geformt, der aus vier aufeinander gestapelten Ringen mit je sieben Untereinheiten besteht (vgl. Abb. 4). Die zwei äußeren Ringe bestehen aus je sieben α -Untereinheiten, die inneren hingegen aus je sieben β -Untereinheiten. In eukaryotischen Zellen besitzen drei der sieben β -Untereinheiten katalytisch aktive Proteasen ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) (Heinemeyer, Fischer et al. 1997, Groll, Heinemeyer et al. 1999). Die ebengenannten $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$ Untereinheiten sind in Eukaryoten Bestandteile des sogenannten Standard-Proteasom, auch konstitutives Proteasom genannt. Wenn Zellen jedoch immunologischen Stress erfahren, werden Zytokine wie beispielsweise $\text{INF}\gamma$ (Interferon γ), $\text{INF}\beta$ oder $\text{TNF}\alpha$ freigesetzt. Diese Botenstoffe führen in Eukaryoten zum Einbau eines alternativer Satz von aktiven, interferoninduzierten Untereinheiten ($\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$) (Akiyama, Yokota et al. 1994, Hisamatsu, Shimbara et al. 1996, Nandi, Tahiliani et al. 2006). Diese Formation wird Immunoproteasom genannt. Neben den beiden beschriebenen Proteasomtypen gibt es auch Kombinationen der Untereinheiten. Die Anzahl der verschiedenen Proteasome variiert je nach Zelltyp (Marques, Palanimurugan et al. 2009).

1.2.2 Funktionsweise des UPS

Für eine konstante Anzahl an zur Verfügung stehender, funktionaler Proteine bedarf es eines Gleichgewichts zwischen Proteinsynthese und -abbau. Funktionslose oder falsch gefaltete Proteine werden in eukaryotischen Zellen v.a. im Zytosol polyubiquitiniert und durch das UPS abgebaut (Hershko, Eytan et al. 1982, Nandi, Tahiliani et al. 2006).

Proteasomaktivatoren

Das proteolytische Zentrum der 20S Untereinheit wird erst durch Bindung von sogenannten Proteasomaktivatoren (PA), wie $\text{PA}28\alpha\beta$, $\text{PA}28\gamma$ oder dem 19S Regulatorkomplex, zugänglich, um eine unkontrollierte Proteolyse in der Zelle zu verhindern (Glickman, Rubin et al. 1998, Pickart and Cohen 2004).

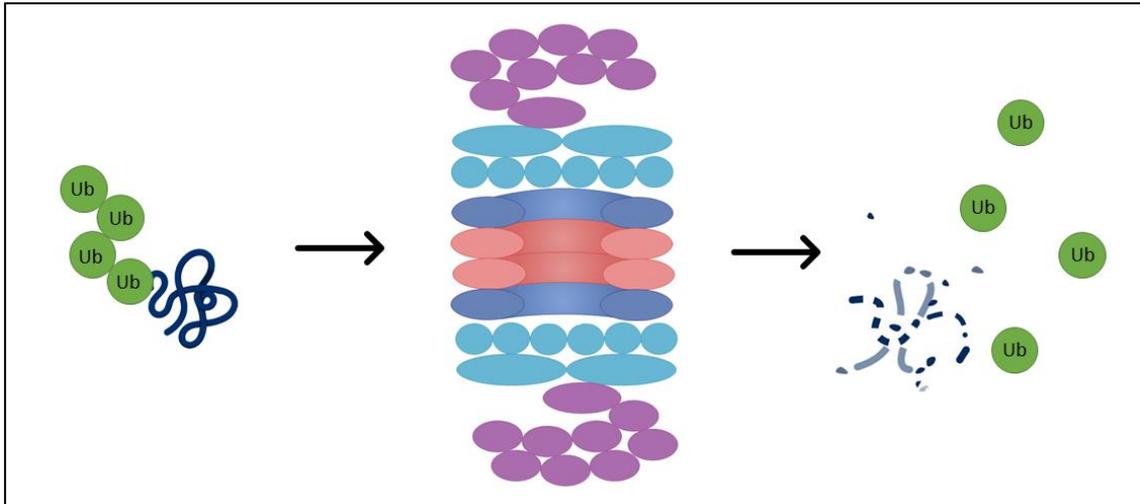


Abb. 5 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Polyubiquitinierte Proteine werden durch das 26S Proteasom entfaltet und durch dessen proteolytische Untereinheiten in Oligopeptide zerlegt. Created with BioRender. Lizenz liegt vor. Ubiquitin (Ub);

Um die Funktionsweise des UPS besser zu verstehen, werden im Folgenden die verschiedenen Schritte, von der Erkennung eines Proteins bis zur Freisetzung von Oligopeptiden, sequenziell dargestellt (vgl. Abb. 5). Dies stellt jedoch eine Vereinfachung dar, da bekannt ist, dass gewisse Prozesse unabhängig von anderen beobachtet werden können und zeitgleich ablaufen (Pickart and Cohen 2004). Auch sind bis heute noch nicht alle einzelnen Schritte und Funktionen des Proteasomsystems vollständig erforscht und verstanden.

Markierung von Proteinen mit Ubiquitin

Um ein Substrat mit einer spezifisch aufgebauten Polyubiquitinkette zu modifizieren, sind mehrere enzymatische Schritte notwendig. Es erfolgt zuerst die Ubiquitin-Aktivierung mittels E1, dann die Ubiquitinkonjugation mittels E2 und zuletzt die Ubiquitinbindung mittels E3 (Komander and Rape 2012). In der Substratauswahl spielen E3 Ubiquitin-Ligasen eine zentrale Rolle. Diese binden in Abhängigkeit von substratspezifischen Signalen, wobei es auch E3 Enzyme gibt, die mehrere Signale erkennen (Hershko and Ciechanover 1998, Pickart 2001). Die Polyubiquitinierung ist das Hauptsignal für das 26S Proteasom. Die Substratspezifität ist jedoch auf Grund der E3-Substrat-Signal-Interaktionen sehr divers (Pickart 2001). Für die Polyubiquitinierung wird zunächst eine kovalente Bindung zwischen dem Carboxy-Terminus (C-Terminus) von Ubiquitin und einem Lysin des Substrates hergestellt, dann wird durch wiederholte

Bindung von weiterem Ubiquitin an Lysin eine Polyubiquitinkette erstellt (Komander and Rape 2012).

Erkennung von Polyubiquitinketten und Bindung durch das 26S Proteasom

Um als Substrat für das Proteasomsystem in Frage zu kommen, müssen zwei Grundvoraussetzungen erfüllt sein: Es braucht ein Zielsignal zur Erkennung, in den meisten Fällen die Polyubiquitinierung, und eine entfaltete Initiationsregion (Lee, Schwartz et al. 2001, Prakash, Tian et al. 2004). Mittels Modells substraten konnte in Studien eine hohe Bindungsaffinität für Ketten mit einer Länge von vier oder mehr Ubiquitin demonstriert werden (Thrower, Hoffman et al. 2000). Man nimmt an, dass für die Identifizierung und feste Bindung der Polyubiquitinketten eine Interaktion mit intrinsischen oder transient gebundenen Ubiquitinrezeptoren notwendig ist. Intrinsische Rezeptoren für Ubiquitin im 19S Komplex sind beispielsweise die UIM (ubiquitin interacting motifs) von Rpn10 oder die PRU (plextrin-like receptor for ubiquitin) Domäne von Rpn13 (Husnjak, Elsasser et al. 2008, Schreiner, Chen et al. 2008, Peth, Uchiki et al. 2010). Das Proteasom besitzt viele Bindungsstellen für ubiquitinierte Proteine. Unklar ist jedoch, ob bereits alle entdeckt sind und warum es eine so große Anzahl gibt (Collins and Goldberg 2017). Nachdem das Substrat mit der Ubiquitinkette ans 26S Proteasom gebunden wurde, folgt eine festere Bindung des Substrates. Diese Hydrolyse ist ATP-abhängig und benötigt eine entfaltete Region im Protein (Peth, Uchiki et al. 2010). Dies zeigt, dass die Degeneration eines Proteins sowohl von der Ubiquitinierung als auch von der Proteinkonformation abhängig ist (Lee, Schwartz et al. 2001). Um eine Zersetzung des Proteasoms selbst oder der gebundenen Faktoren zu verhindern, haben diese keine entfalteteten Segmente (Fishbain, Prakash et al. 2011, Bard, Goodall et al. 2018).

Entfernung der Ubiquitin-Kette

Zur Entfernung des Ubiquitinsignals besitzt das Proteasom Deubiquitinase-Enzyme. Das wichtigste scheint Rpn11 zu sein. Dieses spaltet, nach der Substratbindung, durch Hydrolyse der Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins und dem Substrat-Lysin. Somit wird die Ubiquitinmarkierung en bloc entfernt, welches im Anschluss im Zytoplasma wiederverwendet werden kann (Verma, Aravind et al. 2002,

Yao and Cohen 2002). Dieser Schritt ist wichtig, um das Substrat effizient in die 20S Untereinheit zu transportieren. Hierbei scheint eine lange Ubiquitinkette hinderlich (Verma, Aravind et al. 2002).

Entfaltung von Proteinen durch die 19S Untereinheit

Die 19S Untereinheit katalysiert aktiv die Entfaltung von Proteinen (Grantcharova, Alm et al. 2001, Lee, Schwartz et al. 2001, Verma, McDonald et al. 2001). Es wird angenommen, dass die ATPasen Rpt1-Rpt6, welche sich an der Basis des 19S Komplexes befinden, Proteine entfalten (Rubin, Glickman et al. 1998). Der genaue Entfaltungsprozess in Eukaryoten ist wenig untersucht, jedoch wird angenommen, dass dieser dem bakteriellen Pendant sehr ähnlich ist (Rubin, Glickman et al. 1998, Wolf and Hilt 2004). Der 19S Komplex entfaltet bemerkenswert selektiv. Wird ein Substrat mit mehreren Untereinheiten präsentiert, wird vom 26S Proteasom lediglich die polyubiquitinierte, gehemmte Untereinheit extrahiert und abgebaut. Der übrige Substratkomplex bleibt aktiv (Verma, McDonald et al. 2001). Dass Proteinkomplexe mit mehreren Untereinheiten selektiv, in Abhängigkeit von Signalen, remodelliert werden können, ist möglicherweise die zentrale Funktion des Proteasomsystems (Pickart and Cohen 2004).

Öffnen der proteolytischen Kammer des 20S Komplexes

In eukaryotischen Zellen ist der Eingang der proteolytischen Kammer durch die Form der α Ringe verschlossen (Groll, Bajorek et al. 2000). Sowohl in biochemischen als auch strukturellen Studien konnte gezeigt werden, dass, wenn die C-Terminalen Enden von Rpt2, Rpt3 und Rpt5 (drei ATPasen des 19S Komplexes) in Taschen zwischen den Untereinheiten des äußeren α Rings binden, es zu einer Konformationsänderung des Zwischenraumes zwischen den Untereinheiten und zu einer Rotation der α Untereinheit kommt (Yu, Smith et al. 2010). Dieser Schritt öffnet das Tor zum Eintritt von Substraten in die proteolytische Kammer des 20S Komplexes.

Translokation des Substrates in den 20S Kernkomplex

Der sogenannte Rpt1-Rpt6 Motor besitzt eine hexametrische Struktur und wandelt chemische Energie von ATP-Bindungen durch Hydrolyse in mechanische Arbeit um,

welche die Proteinsubstrate von der 19S Kappe in die proteolytische Kammer überführt (Bard, Goodall et al. 2018).

Proteolyse in der 20S Untereinheit des Proteasoms

Der 20S Komplex des Proteasoms baut mit seinem im Zentrum gelegenen proteolytisch aktiven Zentren Proteine zu Oligopeptiden ab (Groll, Ditzel et al. 1997, Lupas, Flanagan et al. 1997). $\beta 1$ hat eine Caspase-ähnliche Aktivität und spaltet die entfalteten Peptidketten nach sauren Aminosäuren. $\beta 2$ spaltet mit seiner Trypsin-ähnlichen Aktivität nach basischen Aminosäuren und $\beta 5$ mit einer Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität nach hydrophoben Aminosäuren (Heinemeyer, Fischer et al. 1997, Groll, Heinemeyer et al. 1999). In Studien mit realen Proteinen zeigte sich jedoch, dass die aktiven Zentren weitaus weniger spezifisch nach spezifischen Aminosäureresten spalten, als es die zuvor erwähnte Klassifikation vermuten lässt (Nussbaum, Dick et al. 1998). Die durch die 20S Untereinheit entstandenen Oligopeptide gelangen durch Diffusion ins Zytoplasma und werden dort zu wiederverwertbaren Aminosäuren zerlegt (Groll, Ditzel et al. 1997, Lupas, Flanagan et al. 1997). Es ist jedoch nicht zwingend erforderlich das gesamte Protein zu spalten, vielmehr können beispielsweise auch nur fehlgefaltete Proteinringe gespalten werden. Dieser Mechanismus wird als endoproteolytische Spaltung bezeichnet und erklärt zum Beispiel die Fähigkeit des Proteasomsystems aus inaktiven Vorstufen aktive Transkriptionsfaktoren freizusetzen (Hoppe, Matuschewski et al. 2000, Liu, Corboy et al. 2003).

1.2.3 Funktionen des UPS

Das UPS ist in diversen biologischen Prozessen wesentlich beteiligt (Nandi, Tahiliani et al. 2006).

Regulation des Zellzyklus

Beispielsweise hat das UPS eine Schlüsselrolle im Verlauf des Zellzyklus. Durch die Steuerung der Level an regulatorischen Proteinen, wie Cyclinen oder Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren, können Zellen die Mitose-Phase verlassen (Murray 2004). Grundsätzlich ist das UPS während des gesamten Zellzyklus für ein ausreichendes Level an regulatorischen Proteinen verantwortlich (Murray 2004).

Inflammation

Auch in der inflammatorischen Reaktion ist das UPS durch Elimination von Inhibitor- κ B und somit der Freisetzung von NF- κ B (Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells) involviert. NF- κ B wiederum führt zur Expression von Genen, die für die inflammatorische Antwort verantwortlich sind (Karin and Ben-Neriah 2000).

Immunsystem

Um eine Immunantwort auszulösen, müssen Zellen mikrobiologische Proteine in Peptide zerlegen, dies erfolgt durch das UPS. Im Anschluss werden die Peptide mittels MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse I-Molekülen den CD8+-T-Zellen präsentiert (Kloetzel 2004). Immunoproteasome weisen im Gegensatz zu Standardproteasomen eine erhöhte Kapazität zur Degradierung von Proteinsubstraten auf, um Zellen gegen „Proteinstress“ zu schützen (Seifert, Bialy et al. 2010, Colberg, Cammann et al. 2020)

1.2.4 Das UPS in Thrombozyten

Auch in den zellkernlosen Thrombozyten findet im Zytosol weiterhin Proteinsynthese und -abbau statt. Verschiedenen Forschergruppen gelang der Nachweis proteasomähnlicher Aktivität in Thrombozyten (Yukawa, Sakon et al. 1991, Yukawa, Sakon et al. 1993, Ostrowska, Ostrowska et al. 2003, Dangelmaier, Quinter et al. 2005, Nayak, Kumar et al. 2011). Dangelmaier et al. zeigten, dass spezifische Proteine, wie beispielsweise Syk, in Thrombozyten ubiquitiniert und durch das UPS zerlegt werden (Dangelmaier, Quinter et al. 2005, Mitchell, Li et al. 2006). Außerdem konnte bewiesen werden, dass die Schlüsselbestandteile des UPS in humanen Thrombozyten vorhanden sind (Brophy, Raab et al. 2008). Hierzu zählen im 19S Komplex die ATPase Untereinheiten Rpt1-6, die non-ATPase Untereinheiten Rpn1-12, im 20S Komplex α 1-6, β 1-7 und β 1i, β 2i und β 5i, für das Immunoproteasom, sowie PA28 α als Regulator (Colberg, Cammann et al. 2020). Mittels RNA (Ribonukleinsäuren)-Sequenzierung konnte mRNA in Thrombozyten nachgewiesen werden, welche für Gene, die Teil des UPS sind, kodieren (Rowley, Oler et al. 2011).

Die genaue Funktion und pathophysiologische bzw. physiologische Bedeutung des Proteasomsystems in Thrombozyten ist jedoch kaum verstanden und Gegenstand aktueller Forschung. Bezüglich der immunologischen Funktion des Proteasomsystems in Thrombozyten konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten MHC-Klasse I-Komplexe, welche mit Peptiden beladen sind, präsentieren. Chapman et al. konnten zusätzlich noch nachweisen, dass die präsentierten Peptide von T-Zellrezeptoren erkannt werden und zytotoxische T-Lymphozyten (CD8+) aktivieren (Chapman, Aggrey et al. 2012). Es gibt einige Untersuchungen zur Proteasomaktivität im Zusammenhang mit der Thrombozytenaktivierung, auf diese wird im Verlauf unter 1.2.6 noch genauer eingegangen.

1.2.5 Proteasomhemmung

Will man die Funktion, Regulation und Bedeutung des Proteasomsystems evaluieren, so können Proteasominhibitoren eingesetzt werden.

Eine Einteilung der Proteasominhibitoren ist nach strukturellen Charakteristika oder nach der Bindungsmodalität möglich. Es gibt reversibel kovalent bindende Proteasomhemmer. Beispiele hierfür sind die Aldehyde, z.B. PSI, β -Lactone oder die deutlich potenteren Borsäure-Peptide, wie Bortezomib. Nicht-kovalent bindende Inhibitoren sind beispielsweise zyklische Peptide, capped Peptide wie Ritonavir oder nicht-Peptide. Außerdem gibt es irreversibel kovalent bindende Proteasomhemmer, die α' β' -Epoxyketone wie das Carfilzomib (Beck, Dubiella et al. 2012).

Der erste in der Klinik zugelassene Proteasominhibitor ist Bortezomib, welcher bis dato therapeutisch unter anderem beim Multiplen Myelom eingesetzt wird (Chauhan, Hideshima et al. 2005, Scott, Hayden et al. 2016).

Bortezomib (vormals MG-341 oder PS-341 genannt) ist ein borsäurehaltiges Dipeptid, welches selektiv und potent die $\beta 5$ und $\beta 5i$ der 20S Untereinheit des 26S Proteasoms bindet. Hierdurch wird das Proteasom dosisabhängig und reversibel in seinen zahlreichen Funktionen gehemmt (Adams, Behnke et al. 1998, Adams 2003, Teicher and Tomaszewski 2015). Ein neuer Proteasomhemmer ist Carfilzomib, der im Vergleich

zu Bortezomib gleich potent, jedoch selektiver für die chymotrypsinartige Aktivität in Proteasomen ist (Demo, Kirk et al. 2007).

Die Hemmung des Proteasomsystems nutzt man in der Tumorthherapie. Tumorzellen haben eine erhöhte Proliferationsrate und produzieren viele defekte Zellzyklusproteine. Hemmt man nun das UPS, akkumulieren diese Proteine und der Zellzyklus kommt zum Erliegen. Unter anderem durch diesen Mechanismus hemmen Proteasominhibitoren das Tumorwachstum, die Angiogenese und führen zur Apoptose (Hideshima, Richardson et al. 2001, Chauhan, Hideshima et al. 2005).

1.2.6 Proteasomhemmung in Thrombozyten

Um die Bedeutung des Proteasomsystems in Thrombozyten zu untersuchen, wurden bereits diverse Studien mit unterschiedlichen Proteasominhibitoren durchgeführt (vgl. Tab. 4). Die Aggregation, als physiologische Funktion der Thrombozyten, ausgelöst durch hohe Thrombinkonzentrationen oder Kollagen, scheint *in vitro* unabhängig vom Proteasomsystem (Avcu, Ural et al. 2008, Gupta, Li et al. 2014). Nutzt man jedoch niedrige Thrombinkonzentrationen oder den schwachen Aktivator ADP wird die Aggregation durch Proteasominhibitoren *in vitro* eingeschränkt (Avcu, Ural et al. 2008, Gupta, Li et al. 2014). *In vivo* wurde jedoch eine Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch Bortezomib beobachtet (Zangari, Guerrero et al. 2008, Rupa-Matysek, Gil et al. 2014). Betrachtet man den Einfluss von Proteasominhibitoren auf aktivierende Signalwege in verschiedenen Zelltypen, so wird man feststellen, dass sich keine einheitliche Aussage treffen lässt. In humanen Tenon's Fibroblasten hatte Bortezomib beispielsweise keinen Einfluss auf den p38 MAP Kinase oder den ERK1/2 Signalweg (Chung, Moon et al. 2010). In verschiedenen Tumorzellen u.a. Myelomzellen hingegen triggerte es die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase und ERK1/2 (Yu, Rahmani et al. 2003, Lioni, Noma et al. 2008, Zhou, Fang et al. 2013). Die genaue Rolle des Proteasomsystems in Thrombozyten ist jedoch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Studien.

Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die basale oder Agonist-induzierte Proteasomaktivität und die Polyubiquitinierung in Thrombozyten durch die

Proteasomhemmung mittels Bortezomib spezifisch in einer dosisabhängigen Weise gehemmt wird (Koessler, Etzel et al. 2016). Verwendet man circa 10 nM oder mehr Bortezomib, so wird eine fast vollständige Hemmung der Proteasomaktivität erreicht. Auch wenn die Induktion der Aggregation, beispielsweise durch ADP oder Kollagen, in Platelet Rich Plasma (PRP) durch eine Proteasomhemmung unbeeinflusst scheint (Koessler, Etzel et al. 2016), so wäre es möglich, dass die Proteasomaktivität andere funktionelle Effekte vermittelt. Daher ist es essenziell, andere Prozesse der Thrombozytenaktivierung, wie die Thrombozytenadhäsion, Sekretion oder die Calciummobilisation genauer zu untersuchen.

1.3 Zielsetzung

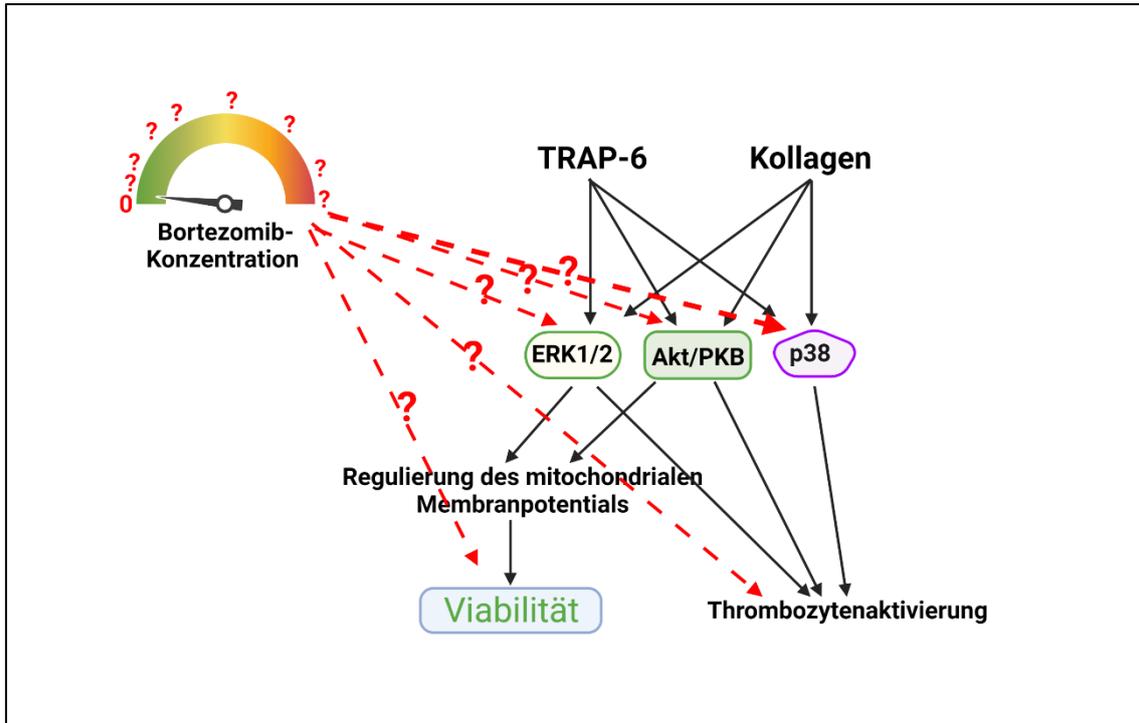


Abb. 6 Schematische Darstellung der Zielsetzung dieser Arbeit

Welchen Einfluss übt Bortezomib, als Proteasomhemmer, in verschiedenen Konzentrationen auf aktivierende Signalwege (via ERK1/2, Akt/PKB oder p38 MAP Kinase), auf die Thrombozytenaktivierung bzw. auf die Viabilität von Thrombozyten aus? Created with BioRender. Lizenz liegt vor. Proteinkinase B (Akt/PKB), Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP);

Das Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der Proteasomhemmung auf die Aktivierbarkeit humaner Thrombozyten zu untersuchen (vgl. Abb. 6). Zuerst wurde dazu die Viabilität von Thrombozyten unter Proteasomhemmung mit Bortezomib, in Konzentrationen von 0,1 nM bis 200 µM, fluorometrisch mit Hilfe des VisionBlue Quick Cell Viability Kit gemessen. In einem zweiten Schritt wurde die Aggregationsfähigkeit von humanen Thrombozyten, die durch Kollagen oder TRAP-6 stimuliert wurden, mittels Lichttransmissions-Aggregometrie unter dem Einfluss der obengenannten Bortezomibkonzentrationen evaluiert. Und um die intrazellulären Vorgänge genauer zu verstehen, wurden drei Signalwege, die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase, der ERK1/2 sowie der Akt/PKB, unter der Proteasomhemmung durch variable Bortezomibkonzentrationen mittels Western Blot-Analyse untersucht. Diese drei Kinasen sind am intrazellulären Signalling bei der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen oder TRAP-6 beteiligt.

2 Material und Methoden

2.1 Ethik- und Tierversuchsvotum

Die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigte das Forschungsvorhaben (Ethikvotum-Nummer: 101/15).

2.2 Material

<i>2.2.1 Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Albumin from Bovin Serum (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammonium Peroxodisulfate (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ampuwa 50 ml, 10 l	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Aqua	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Blotting-Grade Blocker (Nonfat dry milk)	Bio-Rad Laboratories, München
Bortezomib (Velcade®)	Selleckchem, München
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Calcium Chloride Dihydrate	Merck KGaA, Darmstadt
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxid Hybri-max® (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid (NaCl, Sodium chloride)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumcitrat (Tri-Sodium Citrate dihydrate)	Merck KGaA, Darmstadt

Material und Methoden

Ponceau S Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
Rotiphorese [®] Gel (30 % Acrylamidstammlösung mit 0,8 % Bisacrylam)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trichloressigsäure (TCA)	Merck KGaA, Darmstadt
Trizma Base (Tris(hydroxymethyl)aminomethane)	Merck KGaA, Darmstadt
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tyrode`s Salt Solution (TSS) mit NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt

Material und Methoden

<i>2.2.2 Puffer und Lösungen</i>	<i>Zusammensetzung</i>
10 x Tris Buffered Saline (TBS)	24,2 g Trizma Base 80 g NaCl pH mit HCl auf 7,6 adjustieren
3 % Milch	3 g Blotting milk in 100 ml TBS-Tween
CGS-Puffer pH 6,5	120 mM NaCl 12,9 mM Natriumcitrat 30 mM D-Glucose Aqua
Elektrophoresepuffer	1 l Ampuwa 6 g Trizma Base 14,5 g Glycin 10 ml SDS 10 %
Ponceau S-Färbung	0,1 % Ponceau in 5 % Acetessigsäure
SDS-Stopp-Lösung 3 x, nach Laemmli	2,42 g Trizma Base in 70ml Aqua, pH 6,7; 6 g SDS 6 % 15 ml Glycerin 15 % 3 mg Bromphenol Blau 1/10 2-Mercapotoethanol
TBS-Tween	100 ml 10 x TBS 900 ml Ampuwa 500 µl Tween®
Transferpuffer	4 l Ampuwa 1 l Methanol 15,17 g Trizma Base 72,5 g Glycin
Trizma Base (Tris-HCl) 3 M pH 8,9 Trizma Base (Tris-HCl) 0,5 M pH 6,7	Trizma Base Ampuwa HCl
Tyrode`s Salt Solution (TSS)	CaCl ₂ x 2 H ₂ O 2,65 g/l, MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,214 g/l, KCl 0,2 g/l, NaHCO ₃ 1 g/l, NaCl 8,0 g/l, NaH ₂ PO ₄ 0,05 g/l, D-Glucose 1 g/l, pH 7,2-7,6)

2.2.3 Kits	Hersteller
Amersham ECL (Enhanced Chemoluminescence) Western Blotting Detection Kit	Amersham Pharmacia Biotech, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VisionBlue™ Quick Cell Viability Fluorometric Assay Kit	Bio Vision Incorporated, Milpitas, USA

2.2.4 Antikörper, Inhibitoren und Aktivatoren

2.2.4.1 Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot

Tab. 1 Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper

Proteinkinase B (Akt/PKB), Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), Heavy and light chains (H+L), gamma-Immunglobulin (IgG), monoklonaler Antikörper (mAb), Mitogen-aktiviertes Protein (MAP), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), polyklonaler Antikörper (pAb);

Bezeichnung	Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Blotting Grade goat Anti-rabbit IgG (H+L)- Horseradish Peroxidase Conjugate (Katalognummer: 1706516)		1:3.000	Bio-Rad Laboratories Inc., München
Pan-Actin (Katalognummer: 8456S)	Rabbit mAb	1:1.000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Phospho-Akt/PKB (Serin473) (Katalognummer: 4060S)	Rabbit mAb	1:2.000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Phospho-p38 MAP Kinase (Threonin180/Tyrosin182) Antibody (Katalognummer: 9211L)	Rabbit pAb	1:1.000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Threonin202/Tyrosin204) (Katalognummer: 4370S)	Rabbit mAb	1:2.000	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

Material und Methoden

<i>2.2.4.2 Inhibitoren und Aktivatoren</i>	<i>Hersteller</i>
Kollagenreagenz Horm® <i>in vitro</i>	Takeda Pharma GmbH, Wien, Österreich
SFK-Lösung zum Verdünnen von Kollagen	Takeda Pharma GmbH, Wien, Österreich
TRAP-6 Reagent	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Calcium Ionophor	LabiTec, Ahrensburg

Material und Methoden

<i>2.2.5 Geräte und Software</i>	<i>Hersteller</i>
APACT 4004 (Aggregometer)	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
APACT LPC-Software Version 1.21c	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
BioRender.com	BioRender, Toronto, Kanada
Digitaler Magnetrührer: D6010	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Ecomax X-Ray Film Processor	Protect GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Excel 2003, 2010, 2016, 2022	Microsoft Corporation, Redmond, USA
FL300 Umlauf-/Umwälzkühler	Julabo GmbH, Seelbach
Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fluoroskan Ascent Software Version 2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GraphPad	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
HI 2211 pH/ORP Meter	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Kehl am Rhein
Image J 1.49v	National Institutes of Health, USA
MFC-9460CDN (Scanner, Drucker)	Brother International, GmbH, Bad Vilbel
Photoshop Version 12.0	Adobe, Dublin, Irland
Pipetman Classic® P2, P10, P20, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer 8-5010	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., München
PowerPoint 2022	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Präzisionswaage PLJ 3500-2NM	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Reagenzglasschüttler Vortex-genie 2	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Shaker DRS-12	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories Inc., München

Material und Methoden

<i>Geräte und Software</i>	<i>Hersteller</i>
TV 200Y, Standard Twin-Plate Wide Format Mini Gel Electrophoresis Unit	Scie-Plas Ltd, Cambridge, England
Wasserbad WNB7	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Word 2003, 2010, 2016, 2022	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Zentrifuge Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 320R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Material und Methoden

<i>2.2.6 Gebrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller</i>
96 Well Microplate, F-bottom (chimney well), black	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Biosphere Filter Tips 20 µl, 200 µl, 1.000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Blotting Paper 330 g/m ²	Fa. Hartenstein, Würzburg
CELLSTAR® Serological Pipettes 5 ml, 25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
CELLSTAR® Centrifuge Tubes 12 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Desinfektionsmittel: Sterilium® classic pure	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Fuji Medical X-Ray Film 100 NIF 13x18	Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan
Gelloader Pipettenspitze 200 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Handschuhe: SensiCare Ice®	Medline Industries, Inc., Mundelein, USA
Küvetten für Aggregometer APACT 4004	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg
Overhead Kopierfolien	Soennecken eG, Overath
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging, Measha, USA
Pipetman (Pipette)	Gilson, Middleton, USA
Pipette mit Spitze (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Röntgenkassette	Fa. Hartenstein, Würzburg
Safe-Locke Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
SafeSeal Gefäß 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Safety-Multifly®-Kanüle, 0,9 x 19 mm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Skalpell: Feather disposable Scalpel N0.10	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
S-Monovette® 10 ml 9NC (Citrat)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Transparente Prospekthüllen	Soennecken eG, Overath
Whatman® Protran® nitrocellulose membranes BA 85 0,45 µm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

2.3 Methoden

2.3.1 Gewinnung einer humanen Blutprobe

Es wurde venöses Vollblut von gesunden, erwachsenen freiwilligen Personen gewonnen, die nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung ihre Blutspende für dieses Forschungsprojekt zur Verfügung stellten.

Nach gründlicher Hautdesinfektion erfolgte die Punktion einer gestauten Cubitalvene mit Hilfe einer Safety-Multifly-Kanüle. Das Blut wurde langsam und unter wenig Aspiration in 10 ml Citrat-Monovetten entnommen, um die Thrombozyten nicht durch Scherkräfte zu präaktivieren. Auf eine vollständige Füllung der Monovetten wurde geachtet, um ein Verhältnis von 1 zu 10 zwischen Blut und 3,2 %-iger Tri-Natriumcitrat-Lösung zu erhalten.

2.3.2 Präparation und Waschen von Thrombozyten

10 ml Vollblut wurden umgehend mit 60 μ l 0,5 M EGTA versetzt, um einer Thrombozytenaktivierung durch freie Calciumionen während der Thrombozytenpräparation entgegenzuwirken. Es folgte eine Zentrifugation in der Hettich Universal 320R bei 330 x g für 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur (RT). Diese resultierte in einer Phasentrennung: Erythrozyten setzten sich im unteren Teil des Röhrchens ab, darüber bildete sich eine Schicht aus Leukozyten. Als Überstand bleibt PRP. Letzteres wurde mittels Pipette abgenommen und im Falle mehrerer Blutproben vom selben Spendenden in ein Greiner-Röhrchen zusammengeführt, um anschließend gleichmäßig auf mehrere Röhrchen verteilt zu werden. Diese wurden in der Hettich-Zentrifuge Universal 320R bei 430 x g bei Raumtemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Dies führte dazu, dass schwere Teilchen, vor allem Thrombozyten, am Boden ein Pellet bilden. Das überstehende Plasma wurde abpipettiert und das Pellet mit 5 ml CGS-Puffer je Röhrchen resuspendiert. Um weitere Plasmareste zu entfernen, erfolgte eine erneute Zentrifugation, analog zur zweiten Zentrifugation, allerdings für 5 Minuten. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und das Sediment mit TSS resuspendiert. Das finale Produkt, die gewaschenen Thrombozyten (washed platelets, WP), wurde zum Schluss in ein Röhrchen zusammengeführt und für die weiteren Versuche eingesetzt (Schwarz, Geiger et al. 1999).

Je nach Versuch wurde eine Thrombozytenkonzentration von $3 \times 10^8/\text{ml}$ bzw. $5 \times 10^8/\text{ml}$ eingestellt. Hierzu wurde die Konzentration der WP mit Hilfe des Hämatologie-Analyseautomaten Sysmex KX-21N bestimmt und mit TSS eine entsprechende Verdünnung durchgeführt.

2.3.3 Proteasomhemmung mittels Bortezomib

Für die Hemmung des Proteasomsystems wurde Bortezomib in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Der breite Konzentrationsbereich wurde gewählt, um sowohl den pharmakologischen Wirkungsbereich, welcher im nM-Bereich liegt, als auch darüberhinausgehende Spiegel abzudecken (Teicher and Tomaszewski 2015). Die Stammlösung 100 mM, in DMSO gelöst, wurde bis zu einer Endkonzentration von 10 mM zu 50 % mit DMSO und zu 50 % mit Aqua destillata verdünnt, um eine optimale Lösung zu gewährleisten. Für Konzentrationen kleiner als 10 mM wurde nur Aqua zum Verdünnen verwendet (vgl. Tab. 2). Die Inkubation der WP erfolgte mit diesen Verdünnungen (für Details vgl. 2.3.3, 2.3.5, 2.3.6.1).

Tab. 2 Bortezomibverdünnungsreihe
Dimethylsulfoxid (DMSO), Mol (M);

Konzentration des Bortezomibansatzes	Verdünnung zur Herstellung des Bortezomibansatzes	Endkonzentration in der Probe (bei einer Verdünnung von 1:100)
20 mM	2 μl 100 mM Bortezomib + 4 μl Aqua + 4 μl DMSO	200 μM
10 mM	1 μl 100 mM Bortezomib + 4,5 μl Aqua + 4,5 μl DMSO	100 μM
1 mM	1 μl 10 mM Bortezomib + 9 μl Aqua	10 μM
100 μM	1 μl 1 mM Bortezomib + 9 μl Aqua	1 μM
10 μM	1 μl 100 μM Bortezomib + 9 μl Aqua	100 nM
1 μM	1 μl 10 μM Bortezomib + 9 μl Aqua	10 nM
100 nM	1 μl 1 μM Bortezomib + 9 μl Aqua	1 nM
10 nM	1 μl 100 nM Bortezomib + 9 μl Aqua	0,1 nM

2.3.4 Cell Viability

Die Zellviabilität wurde fluorometrisch mit Hilfe des VisionBlue Quick Cell Viability Kit, der die metabolische Umsetzung von Resazurin zu Resorufin erfasst, gemessen (Riss, Moravec et al. 2013). Der Grad der Fluoreszenz dient als Indikator für die Aktivität des Zellmetabolismus (Page, Page et al. 1993). Hierfür wurden WP in einer Konzentration von $5 \cdot 10^8$ /ml mit Puffer, mit den in Tab. 2 genannten Konzentrationen von Bortezomib oder mit $10 \mu\text{M}$ Calcium Ionophor A23187 versetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Calcium Ionophor A23187 hemmt die mitochondriale Aktivität und induziert die Apoptose (Leytin, Allen et al. 2009). Danach wurden die Proben mit 1 mM CaCl_2 rekalkifiziert, um das durch EGTA gebunden Calcium wieder für die Aggregation zur Verfügung zu stellen. Eine zweite Negativkontrolle ohne Inkubationszeit wurde ebenso mitgeführt.

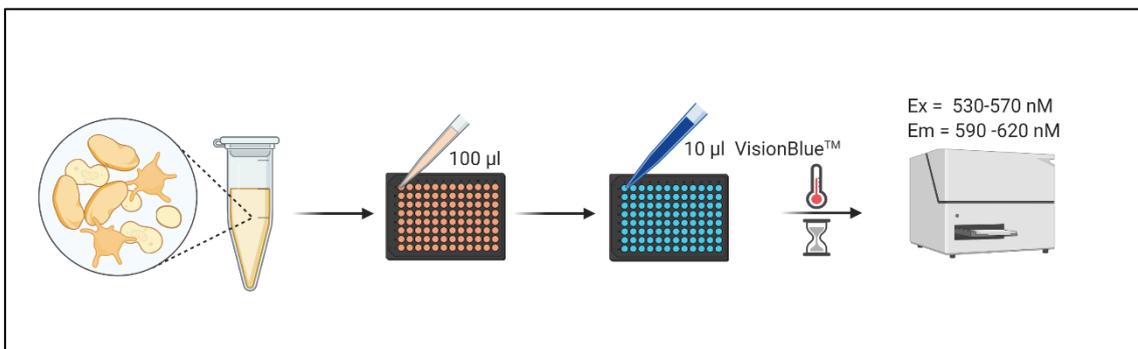


Abb. 7 Workflow für die Viabilitätsmessung mittels VisionBlue Quick Cell Viability Kit

WP wurden mit Puffer, verschiedenen Bortezomibkonzentrationen oder $10 \mu\text{M}$ Calcium Ionophor A23187 versetzt. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden je Probe $100 \mu\text{l}$ in die Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zu jeder Probe wurde mit $10 \mu\text{l}$ VisionBlue Reagenz gegeben. Es folgte eine zweite Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 37°C . Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität mit einer Ex bei 560 nm und einer Em bei 590 nm gemessen. Created with BioRender. Lizenz liegt vor. Emission (Em), Extinktion (Ex), washed platelets (WP);

Alle Proben wurden im Anschluss in eine schwarze, 96 Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit $10 \mu\text{l}$ VisionBlue Reagenz versetzt, welches Resazurin enthält. Dieses wurde von metabolisch aktiven Thrombozyten während der Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 37°C im Dunklen zu Resorufin, das pink fluoresziert, verstoffwechselt. Die anschließende Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit einem geeigneten Filter bei 560 nm Extinktion und 590 nm Emission (vgl. Abb. 7) (Riss, Moravec et al. 2013).

2.3.5 Lichttransmissions-Aggregometrie

Um die physiologische Funktionsfähigkeit der Thrombozyten zu testen, wurde die Lichttransmissions-Aggregometrie nach Born eingesetzt. Diese basiert auf dem Prinzip der gesteigerten Transmission von Licht durch das Medium bei Thrombozytenaggregation (Born 1962, Christie, Avari et al. 2008). Die Transmission von TSS, welche als Puffer der WP verwendet wurde, entspricht dabei einer Aggregation von 100 %. Eine Aggregation von 0 % hingegen bezieht sich auf die Lichttransmission für die Suspension von WP (Christie, Avari et al. 2008).

Für die Messungen wurden WP in einer Konzentration von $3,0 \cdot 10^8$ /ml mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen, wie in Tab. 2 beschrieben, versetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Bortezomib und ohne Aktivator mitgeführt, genauso wie eine Positivkontrolle mit dem jeweiligen Aktivator zur Prüfung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten.

Für die Messung im AACT 4004 wurden Küvetten mitsamt Rührer auf 37°C erwärmt. Vor jeder Messung wurde eine Eichkurve mit 200 µl TSS erstellt. In eine Küvette wurden je 200 µl WP gegeben und die Messung bei 740 nm gestartet. Nach circa 20 Sekunden erfolgte eine Rekalzifizierung mit 1 mM CaCl₂. Direkt im Anschluss wurden die Stimulatoren 5 µg/ml Kollagen bzw. 10 µM TRAP-6 in die Küvetten pipettiert. Bei unstimulierten Kontrollen entfiel dieser Schritt. Die prozentuale Transmissionsänderung, welche der Aggregation entspricht, wurde für insgesamt 5 Minuten bei 37°C unter kontinuierlichem Rühren mit 1000 Umdrehungen pro Minute gemessen.

2.3.6 Western Blot-Analyse

Mittels Western Blot-Analyse können Proteingemische zum Nachweis einzelner Proteine aufgetrennt werden (Laemmli 1970, Egger and Bienz 1994). Hierfür wurden folgende Schritte nacheinander durchgeführt: Gelelektrophorese, Membrantransfer und Proteinnachweis (Egger and Bienz 1994).

2.3.6.1 Aufbereitung der Proben für die Western Blot-Analyse

WP in einer Konzentration von $3,0 \cdot 10^8$ /ml wurden zu je 100 μ l auf Eppendorf-Cups verteilt. Bestimmte Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen Bortezomib (vgl. Tab. 2) versetzt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur und im Anschluss für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es erfolgte die Rekalzifizierung mit 1 mM CaCl_2 , wie bereits in den Vorkapiteln beschrieben, und die Stimulation mit 5 μ g/ml Kollagen oder 10 μ M TRAP-6 für 2 Minuten bei 37°C.

Als Negativkontrolle wurden zwei unstimulierte Proben von WP mitgeführt, eine Probe davon inkubiert für 15 Minuten bei 37°C, die andere Probe für 60 Minuten bei Raumtemperatur und für 15 Minuten bei 37°C. Die 2-minütige Inkubation mit einem Stimulator entfiel. Des Weiteren wurden für eine Positivkontrolle WP ohne Bortezomib nach Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur und für 15 Minuten bei 37°C mit 5 μ g/ml Kollagen oder 10 μ M TRAP-6 für 2 Minuten bei 37°C stimuliert.

Bei allen Proben wurde die Inkubationszeit durch SDS-Stopp-Puffer nach Laemmli (Laemmli-Ansatz + 1:10 2-Mercaptoethanol) beendet (Laemmli 1970). Dieser beinhaltet 2-Mercaptoethanol zur Reduktion von Disulfidbrücken, SDS zur Proteindenaturierung und negativen Markierung, Bromphenolblau, um die Proben sichtbar zu machen, sowie Glycerin zum Erhöhen der Dichte (Egger and Bienz 1994). Durch ein Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten wurden die Proben in ihre lineare Struktur zerlegt. Bis zur Durchführung der Western Blot-Analyse lagerten die Proben bei -25°C.

2.3.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden Gele im Gelkammersystem von Biorad gegossen, die aus einem oberem, 5 %-igem Sammelgel und einem unterem, 10 %-igem Trenngel bestanden. Für die genaue

Zusammensetzung siehe Tab. 3. Als Katalysator für die Acrylamidpolymerisation wurden APS und TEMED zugegeben (Rüchel, Steere et al. 1978). Um eine vollständige Polymerisation sicherzustellen, wurden die Gele für mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert.

Tab. 3 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele
Ammonium Peroxdisulfat (APS), Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Substanzen	Sammelgel 5 %	Trenngel 10 %
Aqua	9,93 ml	15,8 ml
30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylam	2,46 ml	10 ml
0,5 M Trizma Base pH 6,7	1,88 ml	-
3 M Trizma Base pH 8,9	-	3,76 ml
10 % SDS	150 µl	300 µl
10 % APS (0,1 g/ml)	150 µl	300 µl
TEMED	7,5 µl	15 µl

Die, wie unter 2.3.6.1 beschrieben aufbereiteten, gefrorenen Proben wurden für eine Minute bei 65°C aufgetaut und im Anschluss für 10 Sekunden bei maximaler Umdrehung in der Hettich-Zentrifuge Mikro 200 abzentrifugiert, damit das beim Auftauen entstandene Kondenswasser der Probe wieder zugeführt wurde. Direkt vor dem Beladen des Gels, mit 20 µl je Tasche, wurden die Proben kurz und gründlich mittels Vortex durchmischt. Zur Ermittlung des Molekulargewichts der Banden und somit zur Identifikation der Proteinbanden wurde der Marker PageRuler mitgeführt. Dieser wurde entsprechend der Proben mit SDS-Stopp-Puffer verdünnt und ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden in den Elektrophoresepuffer gesetzt und eine Spannung von 80 Volt angelegt, damit sich nach circa 45 Minuten die denaturierten Proteine an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentrieren. Danach wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht und die Proteine trennten sich ihrer Größe entsprechend im Trenngel auf.

2.3.6.3 Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembran mittels Western-Blot Verfahren

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran in der Trans-Blot Cell von Bio-Rad Laboratories transferiert (Kyhse-Andersen 1984). Der Transfer erfolgte bei 1.000 Milliampere (mA) für eine Stunde. Um Proteinschäden durch die entstehende Hitze zu vermeiden, wurde ein Kühler in die Trans-Blot Cell eingebracht und ein Rührer sorgte für eine gleichmäßige Temperaturverteilung.

Um eventuelle Ungenauigkeiten beim Pipettieren direkt zu erkennen und zur Kontrolle des Proteintransfers, wurden die Banden auf der Nitrozellulosemembran mittels 0,1 %-igem Ponceau S in 5 % Acetessigsäure gefärbt und fotodokumentiert (Romero-Calvo, Ocon et al. 2010). Im Anschluss wurde die Färbung mittels TBS Tween unter kontinuierlichem Schwenken abgewaschen.

2.3.6.4 Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Proteintransfer wurden die zu identifizierenden Proteine mittels Primärantikörper markiert (vgl. Tab. 1) (Renart, Reiser et al. 1979). Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran mit 5 %-igem BSA in TBS Tween für 20 Minuten unter ständiger Agitation auf dem Schüttler bei Raumtemperatur geblockt. Abschließend folgte die Inkubation mit einem Primärantikörper (vgl. Tab. 1) in 5 %-igem BSA in TBS Tween bei 4°C für 16 Stunden. Ungebundene Primärantikörper wurden dreimal mit TBS Tween für je 5 Minuten auf dem Schüttler abgewaschen. Der Sekundärantikörper anti-rabbit IgG, der an eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, inkubierte, in 5 %-igem BSA in TBS Tween gelöst, für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Überschüssige Antikörper wurden im Anschluss mit TBS Tween fünfmal für je 10 Minuten abgewaschen.

Zur Detektion wurde das ECL-Analysesystem von Amersham genutzt, welches auf Chemolumineszenz basiert. Dabei wurde Luminol in seine oxidierte Form umgesetzt, katalysiert von der Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers (Whitehead,

Kricka et al. 1979). Bei der Rückkehr in den Grundzustand wurde Licht mit einem Maximum bei der Wellenlänge von 428 nm emittiert (Whitehead, Kricka et al. 1979). Das zugegebene Phenol verstärkte und verlängerte die Dauer des Lichtsignals. Die beiden Reagenzien des ECL-Analysesystems wurden zusammengemischt und für eine Minute auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Diese Inkubationszeit wurde durch Abtupfen mit Blot-Papier beendet. Die Darstellung erfolgte auf Röntgenfilmen mittels Röntgenfilmentwickler Ecomax X-Ray Film Processor in der Dunkelkammer, um ein Ausbleichen der Röntgenfilme zu verhindern. Die Röntgenfilme wurden für jeweils 5 bis 30 Sekunden auf mit Folie bedeckten Membranen gelegt. Das Lichtsignal schwärzte die Stellen auf dem Röntgenfilm, an welchen Primär- und Sekundärantikörper gebunden hatten. Die Blots wurden quantitativ densitometrisch mittels Image J nach unkalibrierter optischer Dichte analysiert.

Um eine gleichmäßige Auftragung der Proteinmenge zu gewährleisten, wurde eine Normalisierung mittels des Housekeeping-Proteins Aktin durchgeführt (Romero-Calvo, Ocon et al. 2010). Hierfür wurden die Membranen mit 3 %-iger Milchlösung für 20 Minuten geblockt. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem Aktin-Antikörper, der in 3 %-iger Milchlösung gelöst war, bei 4°C für 16 Stunden. Überschüssiger Primärantikörper wurde mit TBS Tween dreimal für je 5 Minuten auf dem Schüttler abgewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper anti-rabbit IgG. Alle weiteren Schritte inklusive Auswertung erfolgten wie bereits oben beschrieben.

2.3.7 Statistische Auswertung

Zur Datenerfassung wurde Excel 2016 der Firma Microsoft verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte zusammen mit PD Dr. Anna Kobsar mit Hilfe des Statistik-Programms GraphPad PRISM 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Die Überprüfung der Normal-Verteilung der Messergebnisse wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Unterschiede in den Varianzen zwischen verschiedenen Gruppen wurde mit one-way analysis of variance (ANOVA) erfasst, gefolgt von dem post-hoc Tukey-Kramer-Test. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Bortezomib auf die Viabilität von Thrombozyten

Zunächst wurde untersucht, welchen Effekt die Proteasomhemmung durch Bortezomib auf die Viabilität von WP ausübt. Hierfür wurde das Reagenz VisionBlue eingesetzt, das Resazurin enthält. Dieses wird von metabolisch aktiven Zellen zum pink fluoreszierenden Produkt Resorufin verstoffwechselt. Das Ausmaß der Fluoreszenz ist somit ein Indikator für die Aktivität des Zellmetabolismus (Page, Page et al. 1993). Da es sich bei proteasomabhängigen Mechanismen eher um langsame und zeitlich verzögerte Prozesse handeln dürfte, wurde eine relativ lange Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur mit Bortezomib analog zu früheren Studien gewählt (Koessler, Etzel et al. 2016).

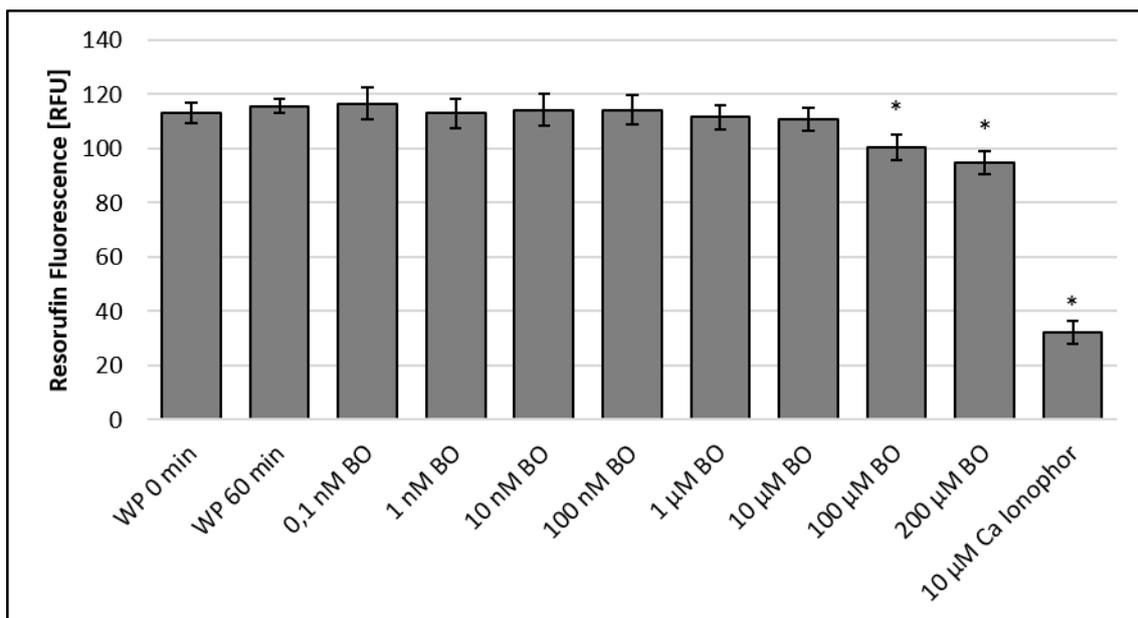


Abb. 8 Einfluss von BO auf die Viabilität von unstimulierten WP

WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen BO-Konzentrationen oder Calcium Ionophor A23187, als Negativkontrolle, inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben mit dem VisionBlue Reagenz versetzt. Es folgte die Messung der Fluoreszenz bei einer Extinktion von 560 nm und einer Emission von 590 nm. (Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; Anzahl $n=5$; *: $p < 0,05$ verglichen mit WP 60 min.) Bortezomib (BO), Minuten (min), Mol (M), Anzahl (n), p-Wert (p), Resorufin Fluoreszenz Units (RFU), Raumtemperatur (RT), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), washed platelets (WP);

Frische WP zeigten eine Fluoreszenz von $113,2 \pm 3,6$ RFU (Resorufin Fluoreszenz Units) (vgl. Abb. 8). Eine Präinkubation mit TSS für 60 Minuten bei Raumtemperatur führte zu keiner signifikanten Änderung der Fluoreszenz, genau wie die Präinkubation mit Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis 10 μ M. Eine Erniedrigung der

Fluoreszenzwerte auf $100,4 \pm 4,8$ und $94,8 \pm 4,2$ RFU war bei $100 \mu\text{M}$ und $200 \mu\text{M}$ Bortezomib zu beobachten. Wurden WP mit $10 \mu\text{M}$ Calcium Ionophor A23187 präinkubiert, wodurch die mitochondriale Aktivität gehemmt und die Apoptose induziert wird (Leytin, Allen et al. 2009), zeigte sich ein deutlicher Abfall des Fluoreszenzlevels auf $32,1 \pm 4,1$ RFU.

3.2 Einfluss von Bortezomib auf die Thrombozytenaggregation

3.2.1 Wirkung von Bortezomib auf unstimulierte Thrombozyten

Im Folgenden wurde der Einfluss von Bortezomib auf die Thrombozytenfunktion mit Hilfe der Lichttransmissions-Aggregometrie evaluiert. Im ersten Schritt wurde getestet, ob Bortezomib selbst eine Aggregation auslösen kann. Es zeigte sich, dass bei den verwendeten Bortezomibkonzentrationen mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten jeweils keine Aggregation induzierbar ist (vgl. Abb. 9).

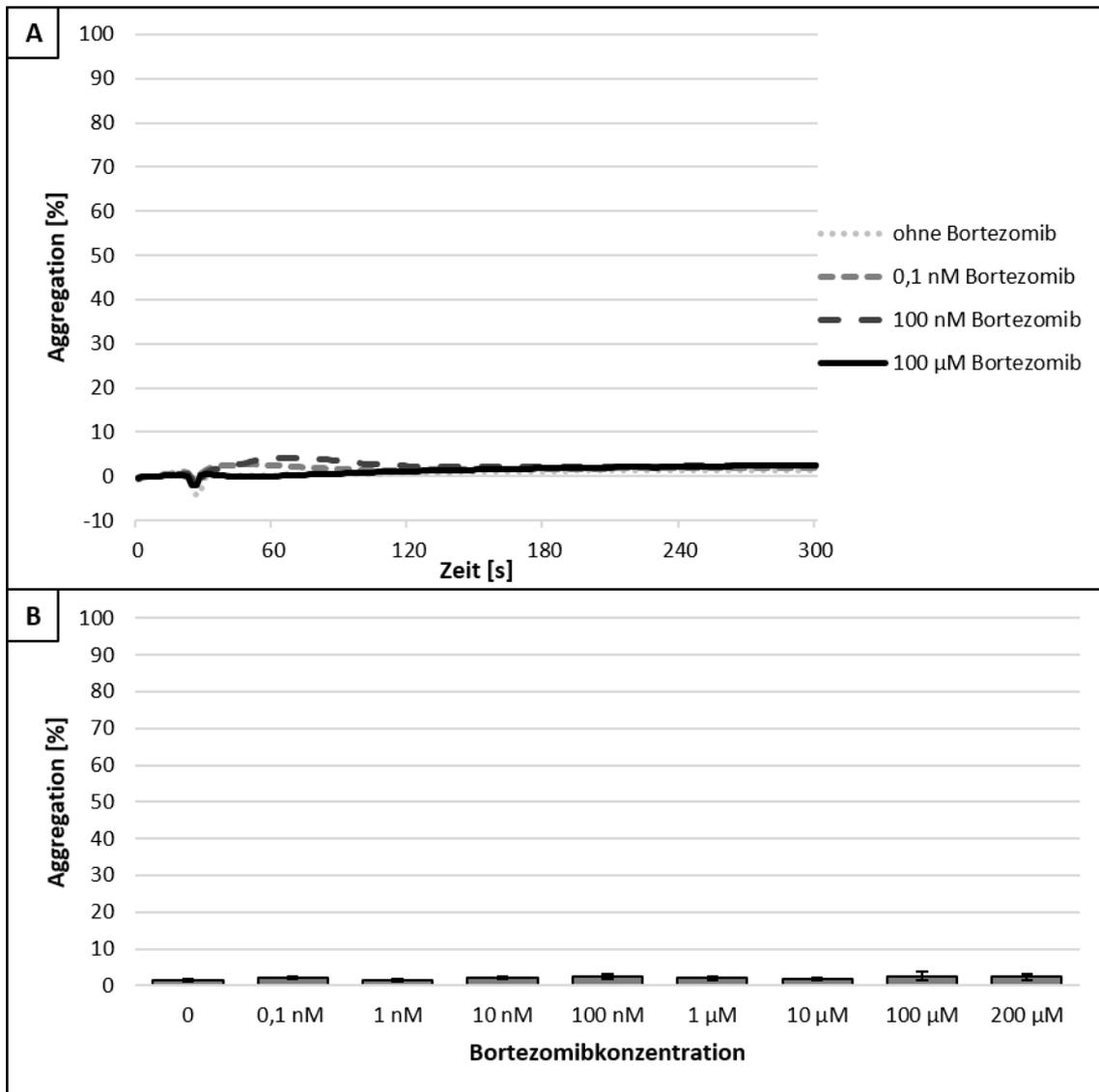


Abb. 9 Einfluss von Bortezomib auf die Aggregation von unstimulierten WP

WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde die Lichttransmissions-Aggregometrie ohne weitere Induktorzugabe durchgeführt.

A) Repräsentative Aggregationskurven (Gezeigt sind die Mittelwerte für drei ausgewählte Bortezomibkonzentrationen im zeitlichen Verlauf; $n=4$)

B) Aggregationswerte (Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. als Endpunktmessung nach 300 s; $n=4$)

Mol (M), Minuten (min), Anzahl (n), Raumtemperatur (RT), Sekunden (s), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), washed platelets (WP);

3.2.2 Wirkung von Bortezomib auf die Kollagen-induzierte Aggregation von Thrombozyten

Im zweiten Schritt wurde der Einfluss von Bortezomib auf die durch Kollagen induzierte Aggregation untersucht. Hierfür wurden WP mit Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis 200 μ M für 60 Minuten inkubiert und danach mit 5 μ g/ml Kollagen stimuliert (vgl. Abb. 10).

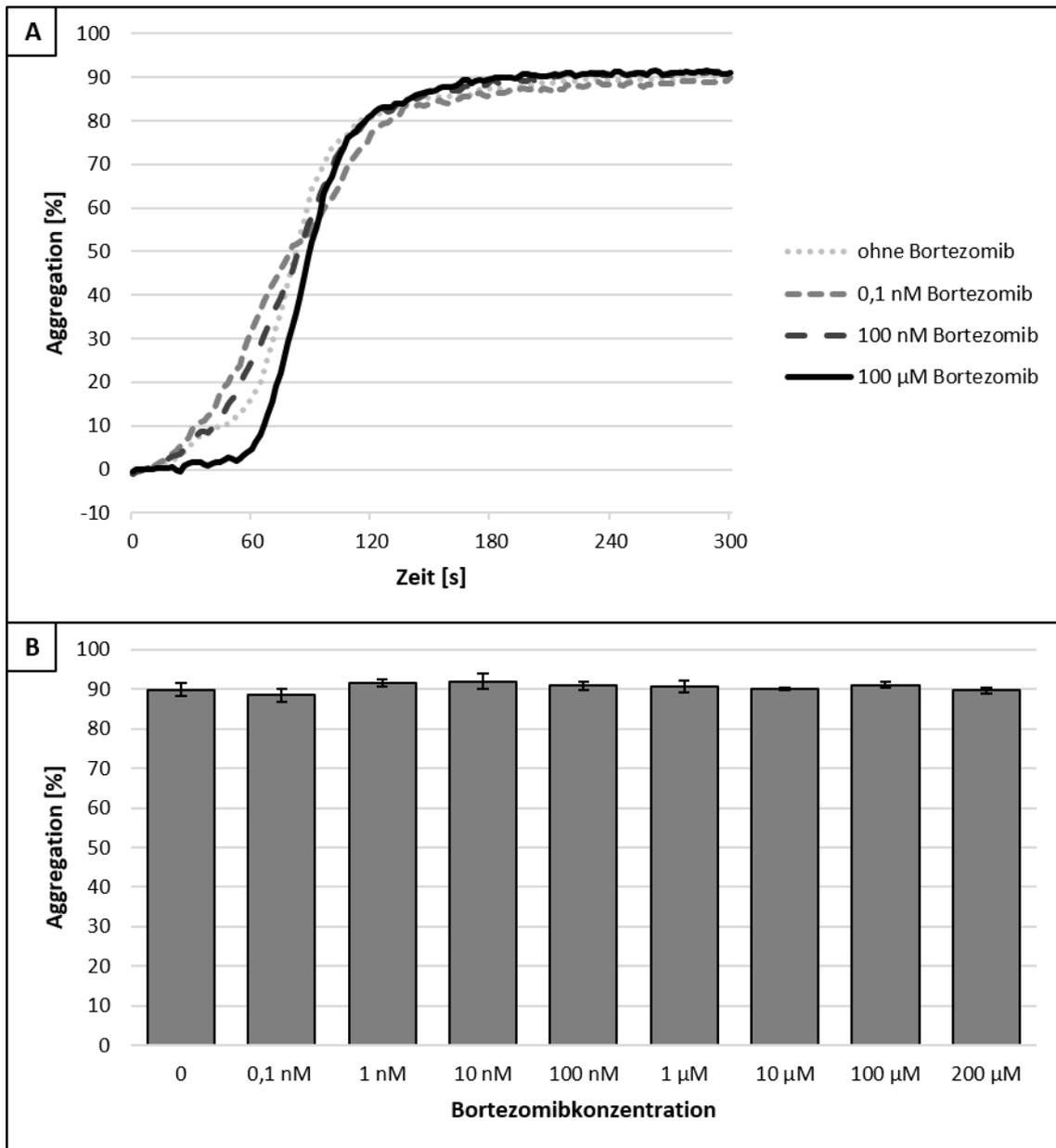


Abb. 10 Einfluss von Bortezomib auf die mit 5 µg/ml Kollagen induzierte Aggregation

WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde die Lichttransmissions-Aggregometrie mit 5 µg/ml Kollagen als Induktor durchgeführt.

A) Repräsentative Aggregationskurven (Gezeigt sind die Mittelwerte für drei ausgewählte Bortezomibkonzentrationen im zeitlichen Verlauf; n=4)

B) Aggregationswerte (Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M. als Endpunktmessung nach 300 s; n=4)

Mol (M), Minuten (min), Anzahl (n), Raumtemperatur (RT), Sekunden (s), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), washed platelets (WP);

Ohne Bortezomib wurde eine Aggregation von $89,8 \pm 1,7\%$ erreicht. Vergleichbare Werte wurden bei den Proben, die mit 0,1 nM bis 200 µM Bortezomib inkubiert wurden, gemessen (vgl. Abb. 10B).

3.2.3 Wirkung von Bortezomib auf die TRAP-6-induzierte Aggregation von Thrombozyten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von Bortezomib auf die durch TRAP-6 induzierte Aggregation untersucht. Dafür wurden WP mit 0,1 nM bis 200 μ M Bortezomib inkubiert und im Anschluss mit 10 μ M TRAP-6 stimuliert (vgl. Abb. 11).

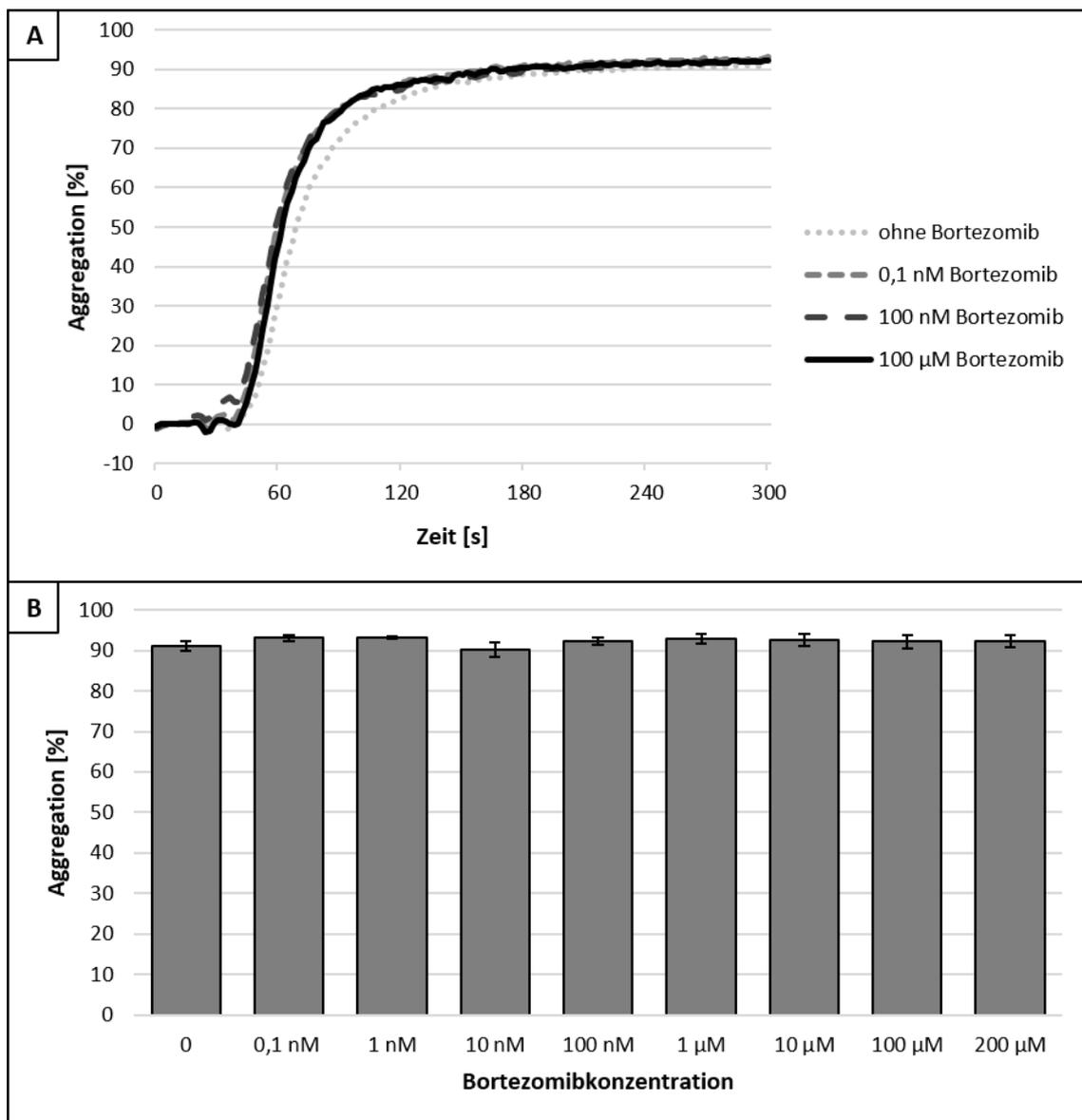


Abb. 11 Einfluss von Bortezomib auf die mit 10 μ M TRAP-6 induzierte Aggregation

WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen inkubiert. Im Anschluss wurde die Lichttransmissions-Aggregometrie mit 10 μ M TRAP-6 als Induktor durchgeführt.

A) Repräsentative Aggregationskurven (Gezeigt sind die Mittelwerte für drei ausgewählte Bortezomibkonzentrationen im zeitlichen Verlauf; n=5)

B) Aggregationswerte (Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M. als Endpunktmessung nach 300 s; n=5)

Mol (M), Minuten (min), Anzahl (n), Raumtemperatur (RT), Sekunden (s), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.) Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP), washed platelets (WP);

Im Ansatz ohne Bortezomib ergab sich im Endpunkt eine Aggregation von $91,2 \pm 1,2 \%$. Die Werte blieben bei Inkubation mit Bortezomib in einer Konzentration von 0,1 nM bis 200 μ M unverändert (vgl. Abb. 11B).

3.3 Einfluss von Bortezomib auf aktivierende Signalwege

3.3.1 Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-p38 MAP Kinase

Im Aktivierungsprozess von Thrombozyten sind verschiedene Signalwege involviert, die zum Teil in der Phosphorylierung verschiedener Kinasen münden. Beispielsweise wird durch die Stimulation mit den Agonisten Kollagen oder TRAP-6 ein Anstieg der Phosphorylierung der p38 MAP Kinase erzielt (Kramer, Roberts et al. 1995, Mazharian, Roger et al. 2007). Um den Einfluss der Proteasomhemmung durch Bortezomib auf Signalwege der Thrombozytenaktivierung zu evaluieren, wurden WP mit unterschiedlichen Bortezomibkonzentrationen inkubiert und danach die basale und die Agonist-induzierte Phosphorylierung der p38 MAP Kinase mittels Western Blot-Analyse bestimmt (vgl. Abb. 12).

Ergebnisse

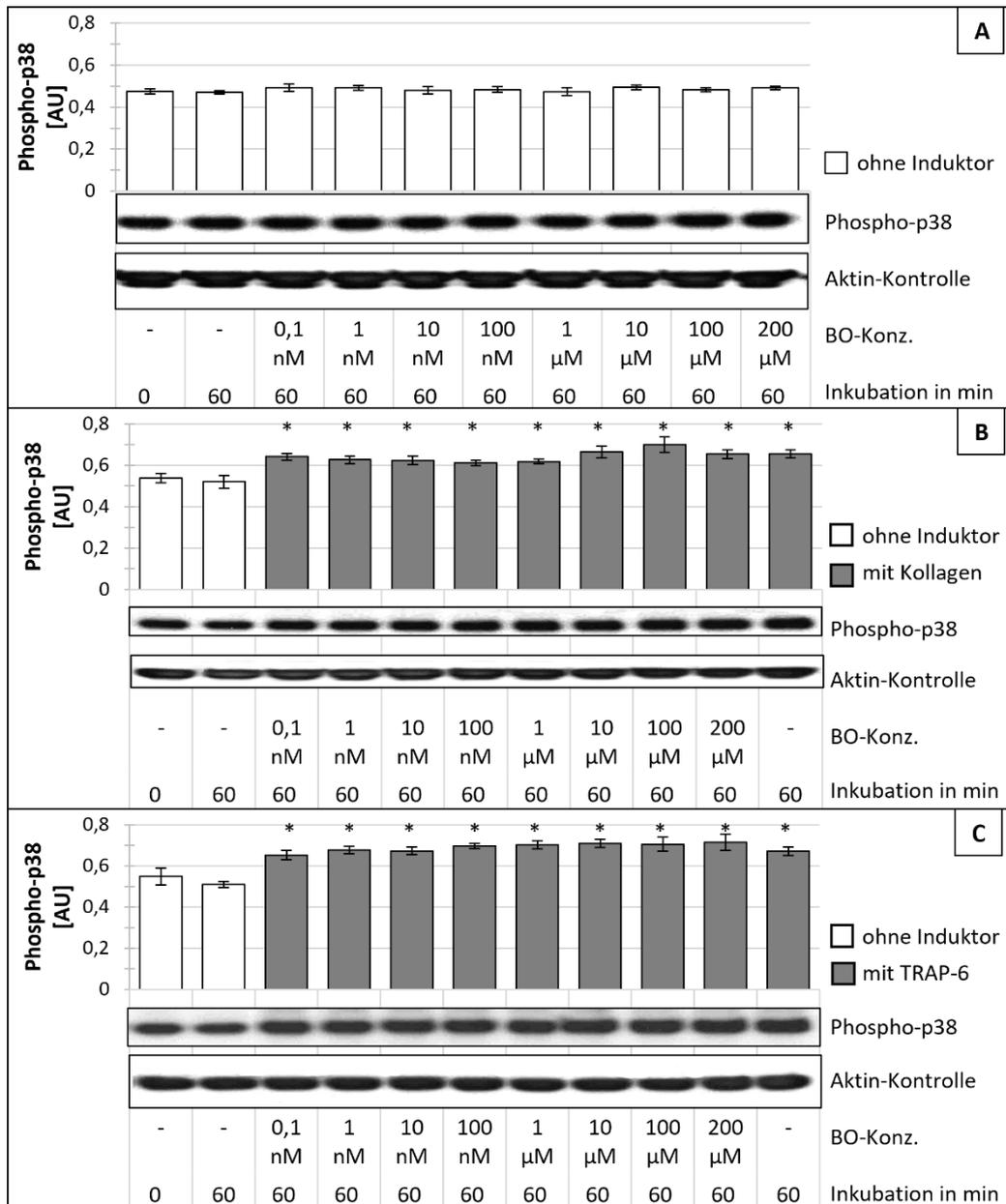


Abb. 12 Phosphorylierung der p38 MAP Kinase in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen

A) Basale Werte. B) Induktion mit Kollagen. C) Induktion mit TRAP-6. WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen BO-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit 5 μ g/ml Kollagen bzw. 10 μ M TRAP-6 stimuliert. Zum Vergleich wurden zwei Proben WP ohne Induktor mit einer Inkubationszeit von 0 bzw. 60 min bei RT mitgeführt. Bei allen Proben folgte die Zellyse mit Laemmli-Puffer und die Analyse der Phospho-p38 MAP Kinase mittels Western Blot. Zur Normalisierung wurde eine Aktinkontrolle mitgeführt. Zur Quantifizierung wurde Image J verwendet. (Gezeigt sind die Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 6$; $*p < 0,05$ verglichen mit den unstimulierten, basalen Werten.)

Arbitrary Units (AU), Bortezomib (BO), Mol (M), Mitogen-aktiviertes Protein (MAP), Minuten (min), Anzahl (n), p -Wert (p), Raumtemperatur (RT), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP), washed platelets (WP);

Die 60-minütige Inkubationszeit änderte die basale Phosphorylierung der p38 MAP Kinase von $0,47 \pm 0,01$ arbitrary units (AU) nicht, genauso wie die Inkubation mit Bortezomibkonzentration von 0,1 nM bis 200 μ M (vgl. Abb. 12A).

Nach Stimulation der WP mit 5 μ g/ml Kollagen ergab sich ein Anstieg der basalen Phosphorylierung von $0,54 \pm 0,02$ AU auf $0,65 \pm 0,02$ AU (vgl. Abb. 12B), nach Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 kam es zu einer Erhöhung auf $0,67 \pm 0,02$ AU (vgl. Abb. 12C). Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis 200 μ M hatten dabei keinen Einfluss auf den Kollagen- oder TRAP-6-induzierten Phosphorylierungsgrad der p38 MAP Kinase (vgl. Abb. 12B und C).

3.3.2 Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-ERK1/2

Die ERK1/2 wird ebenfalls nach Aktivierung mit Agonisten, wie beispielsweise Kollagen, verstärkt phosphoryliert (Mazharian, Roger et al. 2007). Analog zu 3.3.1 wurden WP mit verschiedenen Bortezomibkonzentrationen inkubiert und im Anschluss die Agonist-induzierte Phosphorylierung der ERK1/2 mittels Western Blot-Analyse gemessen (vgl. Abb. 13).

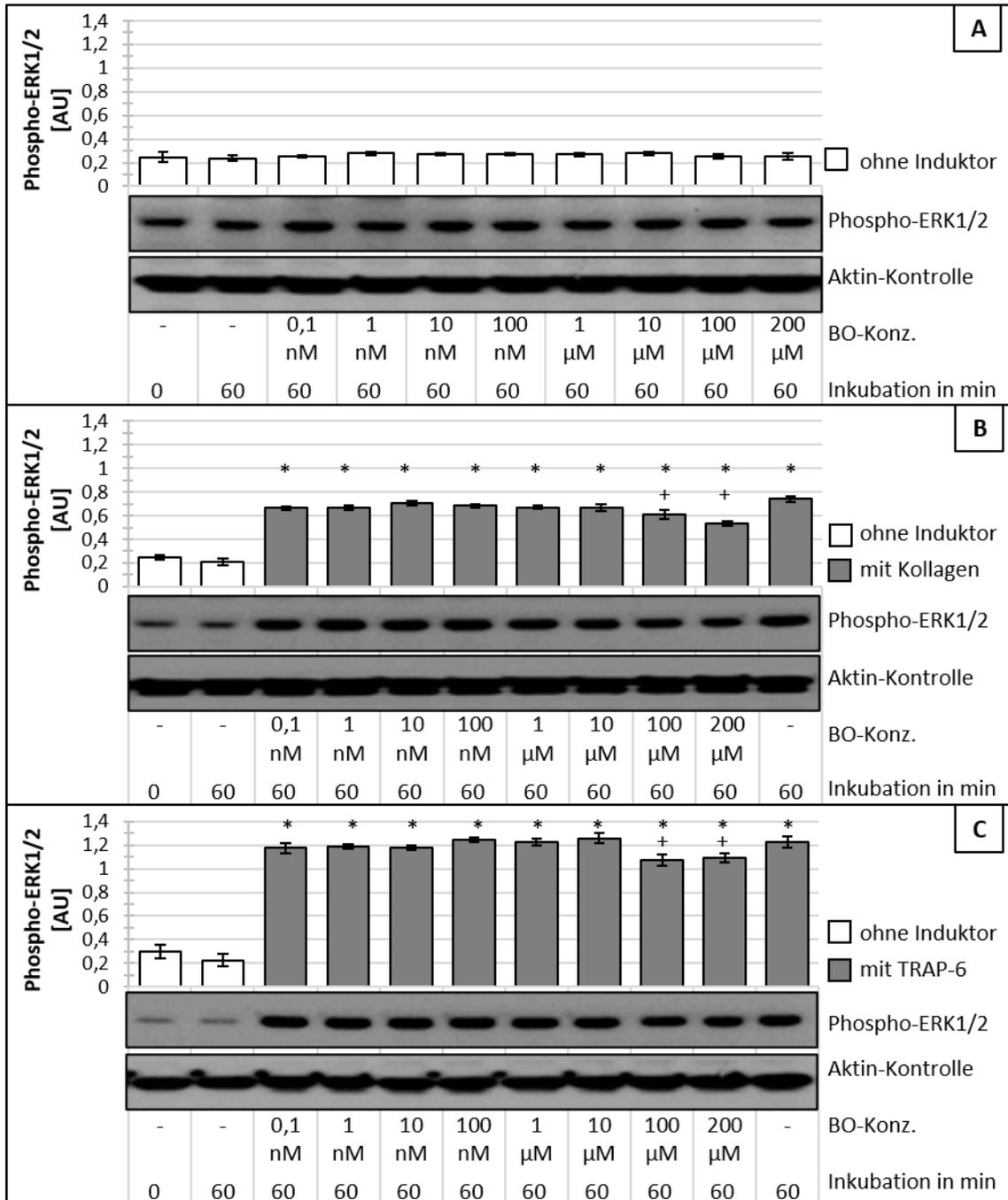


Abb. 13 Phosphorylierung der ERK1/2 in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen
A) Basale Werte. B) Induktion mit Kollagen. C) Induktion mit TRAP-6.
 WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen BO-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit 5 μg/ml Kollagen bzw. 10 μM TRAP-6 stimuliert. Zum Vergleich wurden zwei Proben WP ohne Induktor mit einer Inkubationszeit von 0 bzw. 60 min bei RT mitgeführt. Bei allen Proben folgte die Zellyse mit Laemli-Puffer und die Analyse der Phospho-ERK1/2 mittels Western Blot. Zur Normalisierung wurde eine Aktinkontrolle mitgeführt. Zur Quantifizierung wurde Image J verwendet. (Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M.; n = 5; *p: < 0,05 verglichen mit den unstimulierten, basalen Werten; +: p < 0,05 verglichen mit den Kollagen-/TRAP-6-stimulierten Werten ohne BO-Zugabe.)
 Arbitrary Units (AU), Bortezomib (BO), Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), Mol (M), Minuten (min), Anzahl (n), p-Wert (p), Raumtemperatur (RT), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP), washed platelets (WP);

Weder die alleinige Inkubation mit Puffer noch eine Inkubation mit Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis 200 μ M führte zu einer Änderung der basalen Phosphorylierung der ERK1/2 von initial $0,25 \pm 0,04$ AU (vgl. Abb. 13A).

Die Stimulation der WP durch 5 μ g/ml Kollagen führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung der ERK1/2 von $0,25 \pm 0,03$ AU auf $0,74 \pm 0,02$ AU (vgl. Abb. 13B). Mit 10 μ M TRAP-6 als Stimulator stieg der Grad der Phosphorylierung von $0,30 \pm 0,06$ AU auf $1,23 \pm 0,4$ AU (vgl. Abb. 13C). Wurde das Proteasomsystem durch Bortezomib in Konzentrationen von 0,1 nM bis 10 μ M gehemmt, ergab sich keine Änderung in der Kollagen- oder TRAP-6-induzierten Phosphorylierung der ERK1/2. Bei hohen Konzentrationen von 100 μ M oder 200 μ M Bortezomib zeigte sich eine signifikant verminderte Phosphorylierung der ERK1/2 nach Induktion mit Kollagen auf $0,61 \pm 0,04$ AU bzw. $0,53 \pm 0,03$ AU, bei Stimulation mit 10 μ M TRAP-6 auf $1,07 \pm 0,05$ AU bzw. $1,09 \pm 0,04$ AU.

3.3.3 Dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Phospho-Akt/PKB

Als weitere Kinase wurde die Phosphorylierung von Akt/PKB in Thrombozyten unter Proteasomhemmung durch Bortezomib analysiert. Die Aktivierung durch Induktoren, wie beispielsweise Kollagen, führt bekanntermaßen zu einer Steigerung der Phosphorylierung von Akt/PKB (Barry and Gibbins 2002). Hierzu wurden WP für 60 Minuten mit Bortezomib inkubiert. Im Anschluss wurde mittels Western Blot-Analyse die Agonist-induzierte Phosphorylierung von Akt/PKB bestimmt (vgl. Abb. 14).

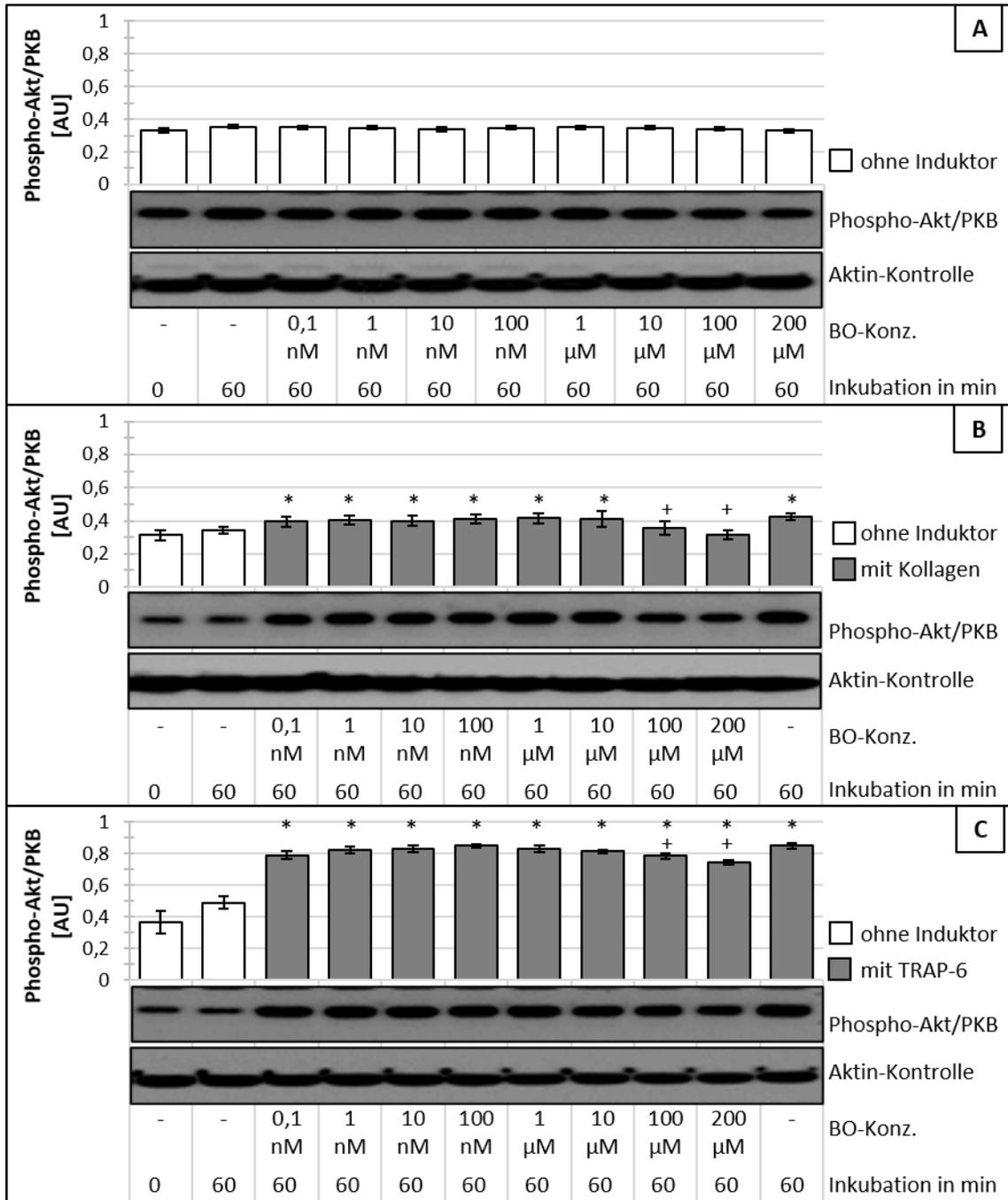


Abb. 14 Phosphorylierung von Akt/PKB in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen
A) Basale Werte. B) Induktion mit Kollagen. C) Induktion mit TRAP-6.
 WP wurden für 60 min bei RT mit verschiedenen BO-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten mit 5 μg/ml Kollagen bzw. 10 μM TRAP-6 stimuliert. Zum Vergleich wurden zwei Proben WP ohne Induktor mit einer Inkubationszeit von 0 bzw. 60 min bei RT mitgeführt. Bei allen Proben folgte die Zellyse mit Laemmli-Puffer und die Analyse der Phospho-Akt/PKB mittels Western Blot. Zur Normalisierung wurde eine Aktinkontrolle mitgeführt. Zur Quantifizierung wurde Image J verwendet. (Gezeigt sind die Mittelwerte ± S.E.M.; n = 6; *: p < 0,05 verglichen mit den unstimulierten, basalen Werten; +: p < 0,05 verglichen mit den Kollagen-/TRAP-6-stimulierten Werten ohne BO-Zugabe.)
 Proteinkinase B (Akt/PKB), Arbitrary Units (AU), Bortezomib (BO), Mol (M), Minuten (min), Anzahl (n), p-Wert (p), Raumtemperatur (RT), Standard Error of the Mean/Standardfehler (S.E.M.), Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP), washed platelets (WP);

Die basale Phosphorylierung von Akt/PKB mit $0,33 \pm 0,01$ AU blieb durch eine Inkubation mit Puffer und auch durch eine Inkubation mit Bortezomib in Konzentrationen von 0,1 nM bis 200 μ M unbeeinflusst (vgl. Abb. 14A).

Die Phosphorylierung von Akt/PKB stieg durch Induktion mit 5 μ g/ml Kollagen von $0,31 \pm 0,03$ AU auf $0,42 \pm 0,01$ AU an (vgl. Abb. 14B). Wurden WP mittels 10 μ M TRAP-6 stimuliert, erhöhte sich die Phosphorylierung auf $0,85 \pm 0,02$ AU (vgl. Abb. 14C). Es zeigte sich keine signifikante Änderung in der Kollagen- oder TRAP-6-stimulierten Phosphorylierung bei einer Hemmung des Proteasomsystems mit Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis zu 10 μ M. Bei Inkubation mit 100 μ M und 200 μ M Bortezomib und Induktion mit Kollagen erniedrigte sich die Phosphorylierung der Akt/PKB signifikant auf $0,36 \pm 0,02$ AU und $0,32 \pm 0,1$ AU, bei Induktion mit TRAP-6 auf $0,78 \pm 0,2$ AU und $0,74 \pm 0,02$ AU.

4 Diskussion

Das Proteasomsystem spielt unter anderem bei der Regulation des Zellzyklus, bei inflammatorischen und immunologischen Antworten sowie beim Abbau von ubiquitinierten Proteinen eine wichtige Rolle (Nandi, Tahiliani et al. 2006). Bisher wurden die Funktionen des Proteasomsystems vor allem an zellkernhaltigen und Tumorzellen erforscht (Chauhan, Hideshima et al. 2005, Kraemer, Weyrich et al. 2013). Auch in den zellkernlosen Thrombozyten gibt es einen aktiven Proteinsyntheseapparat (Thon and Devine 2007, Weyrich, Schwertz et al. 2009) sowie ein funktionierendes Ubiquitinierungssystem. Dieses markiert Proteine zum Abbau und zerlegt diese in Aminosäuren, um in den Zellen ein Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und -abbau zu gewährleisten (Dangelmaier, Quinter et al. 2005, Karim, Vemana et al. 2015). Die Bestandteile des zum Proteinabbau benötigten Proteasomsystems, insbesondere die katalytische 20S Untereinheit, wurden in Thrombozyten nachgewiesen (Zhang, Rogalski et al. 2011, Klockenbusch, Walsh et al. 2014). Eine Aktivierung des Proteasomsystems kann durch eine Agonisten-induzierte Aktivierung von Thrombozyten erfolgen (Nayak, Kumar et al. 2011, Gupta, Li et al. 2014, Koessler, Etzel et al. 2016). Die genaue Bedeutung des Proteasomsystems für die Thrombozytenphysiologie und -pathophysiologie ist allerdings noch nicht umfassend aufgeklärt.

Die Verfügbarkeit spezifischer Proteasominhibitoren ermöglicht die Evaluation funktioneller Systeme in Zellen, auch in Thrombozyten, in Abhängigkeit von der Proteasomaktivität. Ein hochpotenter Proteasominhibitor ist Bortezomib, welcher spezifisch die 20S Untereinheit der 26S Proteasomen blockiert (Adams, Behnke et al. 1998, Teicher and Tomaszewski 2015). Bortezomib inhibiert die Zellproliferation und induziert, über NF- κ B vermittelt, die Apoptose in Myelomzellen (Hideshima, Richardson et al. 2001). Außerdem macht es diese Zellen anfälliger für DNA-schädigende Chemotherapeutika (Mitsiades, Mitsiades et al. 2003). So werden die Eigenschaften von Bortezomib sowohl klinisch in der Tumorthherapie, beispielsweise des Multiplen Myeloms, als auch für experimentelle Untersuchungen genutzt (Koessler, Etzel et al. 2016, Scott, Hayden et al. 2016). Die genauen pharmakologischen

Wirkungen von Bortezomib auf humane Thrombozyten sind jedoch bislang noch nicht umfassend beschrieben.

In einer vorausgegangenen Studie wurden daher die Dosis-Wirkbeziehungen von Bortezomib in Bezug auf die Proteasomaktivität und die Ubiquitinierung in Thrombozyten erarbeitet (Koessler, Etzel et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass die basale Proteasomaktivität in WP konzentrationsabhängig durch 10 nM oder höhere Dosen von Bortezomib unterdrückt wird. Die durch 10 µg/ml Kollagen zusätzlich induzierte Aktivierung des Proteasomsystems wurde durch 1 nM Bortezomib komplett unterbunden. Konzentrationen von über 1 nM führten sogar zu einem Absinken unter das Basalniveau (Koessler, Etzel et al. 2016). Auch in anderen Versuchen wurden pharmakologische Effekte von Bortezomib im nanomolaren Bereich beobachtet (Piva, Ruggeri et al. 2008). Des Weiteren wurde die Wirkung von Bortezomib auf die Ubiquitinierung in WP untersucht (Koessler, Etzel et al. 2016). Eine Aktivierung dieser mittels 10 µg/ml Kollagen oder 10 µM TRAP-6 stimulierte die Polyubiquitinierung. Bortezomibkonzentrationen von 0,1 bis 10 nM hatten keinen Einfluss auf die basale oder durch Kollagen induzierte Polyubiquitinierung in WP. Eine Inkubation mit 100 nM oder mehr Bortezomib führten jedoch zu einer Akkumulation polyubiquitinerter Proteine (Koessler, Etzel et al. 2016). Überdies zeigte sich, dass die durch 10 µg/ml Kollagen induzierte Aggregation von Thrombozyten in PRP durch Proteasomhemmung mittels Bortezomib in Konzentrationen von 10 nM bis 100 µM nicht beeinflusst wird (Koessler, Etzel et al. 2016).

In dieser Arbeit wurden nun WP untersucht, um spezifische Effekte in den Thrombozyten nachzuweisen und den Einfluss von kontaminierenden Faktoren aus dem Plasma zu minimieren. Für die Präparation wurde eine in der experimentellen Thrombozytenforschung gängige Methode unter Verwendung von CGS-Puffer und TSS eingesetzt (vgl. 2.3.2).

4.1 Abnahme der Thrombozytenviabilität durch supramaximale Proteasomhemmung

Vor Durchführung von weiterführenden Untersuchungen der Signalwege wurde geprüft, inwieweit Bortezomib toxische Effekte auf WP ausübt. Hierfür wurde der schwach fluoreszierende zellpermeable Redoxindikator Resazurin, ein blauer Farbstoff, verwendet. In viablen Zellen mit aktivem Stoffwechsel und intakter mitochondrialer Funktion wird dieser zu fluoreszierendem Resorufin reduziert (Page, Page et al. 1993). Andere Studien hatten dargelegt, dass von Bortezomib eine zytotoxische Wirkung auf Myelomzellen ausgeht. Bereits 15-30 nM Bortezomib führten zu einer verminderten Zellviabilität, die mit der Resazurin-Methode gemessen wurde (Salem, McCormick et al. 2015). In den WP hatten Bortezomibkonzentrationen von 0,1 nM bis 10 µM keinen Einfluss auf den Resazurin-abhängigen Stoffwechsel. In Konzentrationen von 100 µM bzw. 200 µM erniedrigte Bortezomib dagegen die Viabilität um circa 10-20 %, was auf toxische Effekte in diesen suprainhibitorischen Bortezomibkonzentrationen hindeutet. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung auch durch die partielle Reduktion der ADP-induzierten Aggregation bei einer Inkubation mit Konzentrationen von über 100 µM Bortezomib (Koessler, Etzel et al. 2016). In anderen Arbeiten wurde in Thrombozyten unter Einfluss von 25 µM Bortezomib eine verstärkte Annexin V-Bindung und ein Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials gemessen, was die Induktion der Apoptose impliziert (Nayak, Kulkarni et al. 2013).

Die verminderte Fluoreszenz nach Inkubation mit höheren Bortezomibkonzentrationen weist auf eine gestörte Mitochondrienfunktion hin. Es ist auch bekannt, dass die beiden durch hohe Dosen Bortezomib gehemmten Proteinkinasen ERK1/2 und Akt/PKB (vgl. 4.3) eine wesentliche Rolle in der Regulation der über Mitochondrien induzierten Apoptose spielen. Die beiden Kinasen phosphorylieren pro-apoptotische Proteine, unter anderem das BAD-Protein (BCL-XL/BCL-2 Associated Death Promotor). Dies führt dazu, dass phosphorylierte BAD-Proteine von den Poren-Proteinen, BCL-XL und BCL-2, fernbleiben oder durch das Proteasom-System zerstört werden (Kennedy, Kandel et al. 1999, Cook, Stuart et al. 2017). Die Bortezomib induzierte-Hemmung von ERK1/2 und Akt/PKB vermindert in der Folge offensichtlich die Phosphorylierung von

BAD-Proteinen, und erlaubt der nicht-phosphorylierten Form der BAD-Proteine die Bindung an BCL-XL und BCL-2. Diese Bindung führt zur Öffnung der Poren in der äußeren Membran der Mitochondrien, gefolgt von einer mitochondrialen Schwellung, Reduzierung des Membranpotenzials und der Freisetzung von Cytochrom C. Das Letztere löst unwiderruflich eine Apoptose aus (Kennedy, Kandel et al. 1999, Cook, Stuart et al. 2017, Urbani, Prosdocimi et al. 2020).

4.2 Aggregationsfähigkeit humaner Thrombozyten unter Proteasomhemmung

In vorangegangenen Projekten wurde die Wirkung von Bortezomib auf die Aggregation, als eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von Thrombozyten, in PRP untersucht (Koessler, Etzel et al. 2016). Nachdem das umgebende Milieu wesentlichen Einfluss auf die Thrombozytenreaktivität haben kann (Koessler, Niklaus et al. 2019), ist es von großer Bedeutung Aggregationsstudien auch mit WP durchzuführen. Eine potente Aktivierung von Thrombozyten initiiert eine Formveränderung, shape change genannt, und eine nachfolgende Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors auf der Thrombozytenoberfläche, was final in der irreversiblen Thrombozytenaggregation endet (Shattil, Hoxie et al. 1985). Die Aggregationsfähigkeit wurde mit den Induktoren Kollagen oder TRAP-6, in Konzentrationen durchgeführt, die erwartungsgemäß in WP zu einer stabilen Aggregation führen. Bortezomib beeinflusste, selbst in den mutmaßlich toxischen Konzentrationen von über 100 µM, die irreversible Aggregation nicht und führte auch nicht zu einer spontanen Induktion der Aggregation, konkordant zu den früheren Ergebnissen mit PRP (Koessler, Etzel et al. 2016). Diese Resultate implizieren, dass ein aktives Proteasomsystem offenbar keine zwingende Voraussetzung für die Auslösung einer Aggregation durch die potenten Induktoren Kollagen oder TRAP-6 von Thrombozyten ist.

In einer nachfolgenden Untersuchung wurden längerfristige Effekte der Proteasomhemmung durch eine Inkubation von 24 Stunden evaluiert (Klingler, Niklaus et al. 2021). Interessanterweise ergab die verlängerte Inkubation der Proteasomhemmung eine Verstärkung der Aggregation mit den verwendeten Agonisten, mit 1,5 - 5,0 µg/ml Kollagen, 18,75 - 28,75 ng/ml Convulxin und 562,5 -

937,5 µg/ml Ristocetin (Klingler, Niklaus et al. 2021). Ebenso konnte gezeigt werden, dass es unter der längeren Inkubation mit Bortezomib zu einer erhöhten Adhäsion an einer mit Agonisten-beschichteten Oberfläche kommt. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass eine Proteasomhemmung in Thrombozyten zur Hemmung der inhibitorischen Signale führt. Es konnte unter anderem eine reduzierte Fibrinogenbindung vermittelt durch DEA/NO (Diethylamine nonoate/Stickstoffmonooxid) gezeigt werden (Koessler, Schuepferling et al. 2019, Klingler, Niklaus et al. 2021). Es muss jedoch bedacht werden, dass funktionale Effekte von geringgradig verminderten inhibitorischen Signalwegen durch starke Thrombozytenaktivierung, beispielsweise mit 10 µM TRAP-6, wie in den hier durchgeführten Experimenten verwendet, kaschiert werden.

Die Auswirkung einer Proteasomhemmung auf die Thrombozytenaggregation war bereits Gegenstand früherer Studien, welche mit diversen Thrombozytenproben (Vollblut, PRP oder WP) und verschiedenen Aktivatoren in variablen Konzentrationen zu teils kontroversen Ergebnissen führten (Überblick in Tab. 4). Gupta et al. untersuchten den Einfluss von Bortezomib auf die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation. Bei geringen Thrombinkonzentrationen zeigte sich eine Hemmung der Thrombozytenaggregation. Bei hohen Thrombinkonzentrationen blieb die Aggregation unbeeinflusst, konkordant zu dieser Arbeit. Dies lässt sich durch die verschiedenen Signalwege erklären, die in Abhängigkeit von der Thrombinkonzentration eine entscheidende Rolle spielen. In geringen Konzentrationen erfolgt die Induktion der Aggregation durch Thrombin überwiegend durch den GPIIb-IIIa Rezeptorkomplex, indem dieser herunterreguliert wird. Bortezomib jedoch stabilisiert diesen an der Thrombozytenoberfläche. Bei hohen Thrombinkonzentrationen wird die Aggregation via PAR1 vermittelt, der auch als Rezeptor von TRAP-6 dient. Bortezomib beeinflusst die Aggregation über PAR1 nicht, übereinstimmend mit den eigenen erhobenen Ergebnissen (Gupta, Li et al. 2014).

Tab. 4 Übersicht über Studien zur Aggregationsfähigkeit unter Proteasomhemmung
Bortezomib (BO), Tage (d), Stunden (h), Minuten (min), platelet rich plasma (PRP), washed platelets (WP)

Proteasominhibitor Form der Verabreichung (Inkubationszeit)	Dosierung des Thrombozyten- aktivators	Aggregation unter Proteasom- inhibition	Art und Ursprung Thrombozytenprobe	Quelle
BO <i>in vitro</i> (1 h)	5 µg/ml Kollagen	Unverändert	WP - human - gesund	Diese Arbeit
	10 µM TRAP-6	Unverändert		
BO <i>in vitro</i> (24 h)	1,5-5,0 µg/ml Kollagen	Verstärkt	Vollblut - human - gesund	(Klingler, Niklaus et al. 2021)
BO (50 nM, 100 nM) oder MG132 10 µM <i>in vitro</i> (1 h)	0,5-1 µg/ml Kollagen	Gehemmt	PRP und WP - human - gesund	(Colberg, Cammann et al. 2021)
	10 µM TRAP-6	Gehemmt	PRP- human - gesund	
BO <i>in vitro</i> (2 h)	3 µg/ml Kollagen	Unverändert	PRP - human - gesund	(Avcu, Ural et al. 2008)
	1 U/l Thrombin	Unverändert		
Epoxomicin <i>in vitro</i> (15 min)	1, 2 µg/ml Kollagen	Gehemmt	PRP - human - gesund	(Grundler, Rotter et al. 2016)
PSI <i>in vitro</i> (15, 30, 60 min)	5 µg/ml Kollagen	Unverändert	Vollblut - Ratten - gesund bzw. mit renovaskulärer Hypertension (2K1C)	(Ostrowska, Wojtukiewicz et al. 2004)
PSI <i>in vivo</i> (10 min)	5 µg/ml Kollagen	Gehemmt	Vollblut - Ratten mit renovaskulärer Hypertension (2K1C)	(Ostrowska, Wojtukiewicz et al. 2004)
BO <i>in vivo</i> (4, 7, 10 d)	2 µg/ml Kollagen	Gehemmt	PRP - human - Myelom-patienten/- innen	(Rupa-Matysek, Gil et al. 2014)
BO <i>in vivo</i> (1, 4 d)	10 µg/ml Kollagen	Gehemmt	PRP - human - Myelom-patienten/- innen	(Zangari, Guerrero et al. 2008)
BO <i>in vitro</i> (30 min)	0,025 U Thrombin	Gehemmt	WP - human- gesund	(Gupta, Li et al. 2014)
	0,1 U Thrombin	Unverändert		

Avcu et al. zeigten im Rahmen einer *in vitro* Studie, dass Bortezomib in niedrigen μM -Konzentrationen, analog zu den präsentierten Daten, keine Auswirkung auf die induzierte Lichttransmissions-Aggregometrie aufweist. Lediglich bei Bortezomibkonzentrationen von 20 oder 40 μM kam es unter dem schwachen Induktor 5 μM ADP zur Einschränkung der Aggregierbarkeit. Die durch 1 U/ml Thrombin bzw. 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen induzierte Aggregation wurde, konkordant zu den Ergebnissen dieser Studie, nicht gehemmt (vgl. Tab. 4). Jedoch verminderte Bortezomib in allen verwendeten Dosierungen ab 2,5 μM die ATP-Freisetzung unter Kollagenstimulation (Avcu, Ural et al. 2008).

Colberg et al. konnten eine verminderte Thrombozytenaggregation sowohl in WP als auch in PRP unter Proteasomhemmung mit 50 bzw. 100 nM Bortezomib mit niedrig dosiertem Kollagen (0,5 - 1 μM) nachweisen (vgl. Tab. 4) (Colberg, Cammann et al. 2021). In unserer Studie waren beim Einsatz von hohen Kollagendosen (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) die Thrombozytenaggregation unter den gleichen Bortezomibdosen in WP unverändert. Ein möglicher Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse bei verschiedenen Kollagendosierungen ist, dass intrazellulär je nach Dosierung andere Signalwege zur Aggregation führen. Niedrige Kollagendosierungen führen via p38 MAP Kinase-TXA₂ und ERK2 zur Aggregation, wohingegen hohe Dosen Kollagen via P2Y₁₂- und TXA₂-ERK-Signalwegen und unabhängig von p38 MAP Kinase die Aggregation induzieren (vgl. 1.1.4.1) (Saklatvala, Rawlinson et al. 1996, Oury, Toth-Zsomboki et al. 2002, Toth-Zsomboki, Oury et al. 2003).

Eine Vorstudie von Zangari et al. ergab einen signifikanten Abfall der Aggregation *ex vivo*, sowohl durch 10 μM ADP als auch durch 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen induziert, einen Tag nach einer Bortezomibinfusion, die Patienten/-innen mit refraktärem Multiplem Myelom als Singletherapeutikum erhielten (vgl. Tab. 4) (Zangari, Guerrero et al. 2008). Vergleichbare Ergebnisse zeigte eine prospektive Studie mit Myelompatienten/-innen von Rupa-Matysek et al., welche die Wirkung von Bortezomibgaben auf die Lichttransmissions-Aggregometrie *ex vivo* unter Verwendung von 5 μM ADP, 1,25 mg/ml Ristocetin und 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen als Induktoren untersucht. Dabei wurde

im Rahmen eines wiederholten Therapiezyklus eine leichte Abschwächung der Aggregation nachgewiesen, nicht aber bei einer Kombinationstherapie von Bortezomib mit Thalidomid (vgl. Tab. 4). Eine Hemmung der Aggregation, induziert mit 2 µg/ml Kollagen, wurde dabei von initial circa 60 % auf 45 % nach 11 Tagen angegeben (Rupa-Matysek, Gil et al. 2014). Bei der Therapie des Multiplen Myeloms werden bei wiederholter Gabe von Bortezomib bei der standardmäßigen Dosierung von 1,3 mg/m² Körperoberfläche Plasmakonzentrationen von 232 bis 312 nM (entsprechend 89 bis 120 ng/ml) erreicht (Velcade®Fachinformation). In der hier durchgeführten *in vitro* Studie ließ sich im nM-Bereich keine Beeinflussung der Aggregation erkennen.

Ergänzend hierzu gibt es eine tierexperimentelle Studie durchgeführt von Ostrowska et al., die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Gaben des Proteasominhibitors PSI untersucht (Ostrowska, Wojtukiewicz et al. 2004). Das den mit PSI behandelten Ratten entnommene Blut zeigte auch eine verminderte Kollagen-induzierte Aggregation, obwohl keine signifikante Hemmung der 20S Proteasomaktivität nachgewiesen werden konnte. Wurden jedoch Thrombozyten dieser Ratten *in vitro* mit PSI behandelt, wurde die 20S Proteasomaktivität gehemmt, aber die durch Kollagen induzierte Aggregation blieb unbeeinflusst, in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen dieser Studie (vgl. Tab. 4). Klinisch interessant ist, dass sich die Thrombusformation in Ratten mit renovaskulärer Hypertension mit PSI hemmen ließ. (Ostrowska, Wojtukiewicz et al. 2004).

Es ist aber zu beachten, dass die Studien von Rupa-Matysek et al., Colberg et al. und Grundler mit PRP und weniger potenten Induktorkonzentrationen durchgeführt wurden. Außerdem zeigte sich eine relativ starke Streuung der interindividuellen Aggregationswerte und Unterschiede, die eher schwach ausgeprägt waren. Insbesondere die Art der Thrombozytenprobe scheint zu unterschiedlichen Ergebnissen zu führen. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die kürzlich durchgeführte Studie von Ghansah et al. zur Evaluation des Einflusses von Bortezomib auf unterschiedliche Thrombozytenproben (PRP und gel-filtrierte Thrombozyten). Sie konnten einen prokoagulatorischen Thrombozytenphänotyp, durch mitochondriale Membrandepolarisation, Phosphatidylserin-Expression und erhöhte

Thrombinproduktion, in Proben ohne Plasmaproteine ausmachen. Bereits kleine Mengen Humanalbumin waren in der Lage diese Effekte von Bortezomib abzuschwächen (Ghansah, Debrececi et al. 2021). Es ist bekannt, dass Bortezomib in therapeutischen Konzentrationen zu circa 80 % an humanen Plasmaproteinen gebunden ist, somit scheint das die Thrombozyten umgebende Milieu einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von Bortezomib auf Thrombozyten zu haben (Velcade®Fachinformation). Darüber hinaus können bei multimodal behandelten Patientengruppen krankheitsbedingte und begleitmedikamentös-bedingte Effekte auf die Thrombozytenfunktion nie komplett ausgeschlossen werden. Denkbar sind darüber hinaus indirekte Störungen der Thrombozytenintegrität, die *in vivo* über eine Störung des Endothels oder der Megakaryozytenfunktion vermittelt werden können (Rupa-Matysek, Gil et al. 2014).

4.3 Keine wesentliche Beeinflussung der aktivierenden Signalwege durch die Proteasomhemmung

Thrombozyten können über zahlreiche Rezeptorsysteme und Signalwege stimuliert werden (Adam, Kauskot et al. 2008, Senis, Mazharian et al. 2014, Gurbel, Kuliopulos et al. 2015). Aufgrund gegenregulatorischer Mechanismen führt nicht jede Stimulation zwangsläufig zu einer Aggregation. Daher war es besonders wichtig, zusätzlich zu den Aggregationsstudien, den dosisabhängigen Einfluss von Bortezomib auf aktivierende Signalwege zu analysieren.

Die Zunahme der Phosphorylierung von p38 MAP Kinase an Threonin¹⁸⁰ und Tyrosin¹⁸², der ERK1/2 an Threonin²⁰² und Tyrosin²⁰⁴ und der Akt/PKB an Serin⁴⁷³ nach Stimulation mit Kollagen oder TRAP-6 bestätigt, wie bereits in diversen anderen Studien beschrieben, die Beteiligung dieser Kinasen in den aktivierenden Signalwegen der Thrombozyten (Kramer, Roberts et al. 1995, Barry and Gibbins 2002, Toth-Zsomboki, Oury et al. 2003, Mazharian, Roger et al. 2007, Adam, Kauskot et al. 2008)

Bortezomib war in Konzentrationen, die das Proteasomsystem komplett hemmen, nicht in der Lage das basale oder das durch Kollagen bzw. TRAP-6 induzierte Niveau der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung zu verändern. Dies impliziert, dass die

Aktivierung des p38 MAP Kinase Signalwegs in den Thrombozyten unabhängig vom Grad der Proteasom-Aktivität gesteuert wird.

In Zellkulturen von humanen Tenon`s Fibroblasten zeigte sich auch keinen Einfluss von 5 μ M Bortezomib auf die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase (Chung, Moon et al. 2010). Interessanterweise triggerte Bortezomib dagegen die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase in einigen zellkernhaltigen Zellen, wie beispielsweise in Myelom-Zelllinien (Zhou, Fang et al. 2013), in Plattenepithelkarzinomzellen des Ösophagus (Lioni, Noma et al. 2008) und in der humanen leukämischen Zelllinie K562 (Yu, Rahmani et al. 2003).

Die Proteasomhemmung veränderte die basale Phosphorylierung der ERK1/2 nicht, vergleichbar mit der p38 MAP Kinase. Unter Stimulation durch Kollagen oder TRAP-6 zeigten sich nun bei sehr hohen Bortezomibkonzentrationen von 100 μ M oder mehr ein leichter Abfall der Phosphorylierung der ERK1/2. In der Literatur werden variable Effekte der Proteasomhemmung auf Phospho-ERK1/2 für verschiedene Zelltypen beschrieben. Beispielsweise hatte Bortezomib keinen Einfluss auf die basalen Level in der humanen leukämischen Zelllinie K562 (Yu, Rahmani et al. 2003) und in humanen Zellkulturen von Tenon`s Fibroblasten (Chung, Moon et al. 2010). Aber es steigerte die Phosphorylierung wiederum in Myelomzellen (Zhou, Fang et al. 2013).

Analog zu ERK1/2 hatten nur 100 μ M und 200 μ M Bortezomib das Potential den Grad der Phosphorylierung von Akt/PKB in aktivierten Thrombozyten zu reduzieren. Im Vergleich dazu senkte Bortezomib in Zellen des hepatozellulären Karzinoms die basale Akt/PKB-Phosphorylierung zeit- und dosisabhängig (Yu, Hou et al. 2013). In humanen Zellkulturen von Tenon`s Fibroblasten erniedrigte Bortezomib die durch den transforming growth factor β induzierte Phosphorylierung, aber nicht die basalen Level von Akt/PKB (Chung, Moon et al. 2010). Insbesondere für die Aktivierung von Akt/PKB ist bekannt, dass diese direkt mit Prozessen verknüpft ist, die essenziell für den Zellmetabolismus und für die Zellviabilität sind (Edinger and Thompson 2002, Song, Ouyang et al. 2005). Daher unterstreicht der Befund der herabgesetzten Akt/PKB-

Phosphorylierung bei supramaximalen Bortezomibkonzentrationen die verminderte thrombozytäre Viabilität (vgl. 4.1).

Neben den hier betrachteten, klassischen aktivierenden Signalwegen wie ERK1/2 und Akt/PKB wurde in einer anderen Studie von Grundler et al. der Einfluss der Proteasomaktivität auf den NFκB-Signalweg analysiert. Der Proteasominhibitor Epoxomicin war in der Lage, die Kollagen-induzierte Aggregation in PRP partiell zu vermindern (vgl. Tab. 4). Die Proteasominhibition verringerte dabei die Spaltung von NFκB-Inhibitor α (IκB α) und somit die NFκB-Aktivität in Kollagen-stimulierten Thrombozyten. In der Studie bleibt allerdings unklar, wie die ausgewählten Epoxomicinkonzentrationen (1-10 μ M) im Hinblick auf ihre Spezifität für die Proteasomhemmung zu bewerten sind (Grundler, Rotter et al. 2016).

Insgesamt erscheint, ähnlich wie die Aggregation, auch die Stimulierbarkeit von wesentlichen aktivierenden Signalwegen in Thrombozyten durch die Proteasomhemmung nicht beeinflusst zu sein. Aktivierende Signalwege haben vermutlich in zellkernhaltigen, schnell wachsenden Zellen, wie z.B. Tumorzellen, eine andere Rolle als in zellkernlosen, sich nicht teilenden Thrombozyten. Zusätzlich scheint das Proteasomsystem abhängig vom Zelltyp spezifisch in intrazelluläre und metabolische Prozesse involviert zu sein (vgl. Abb. 15).

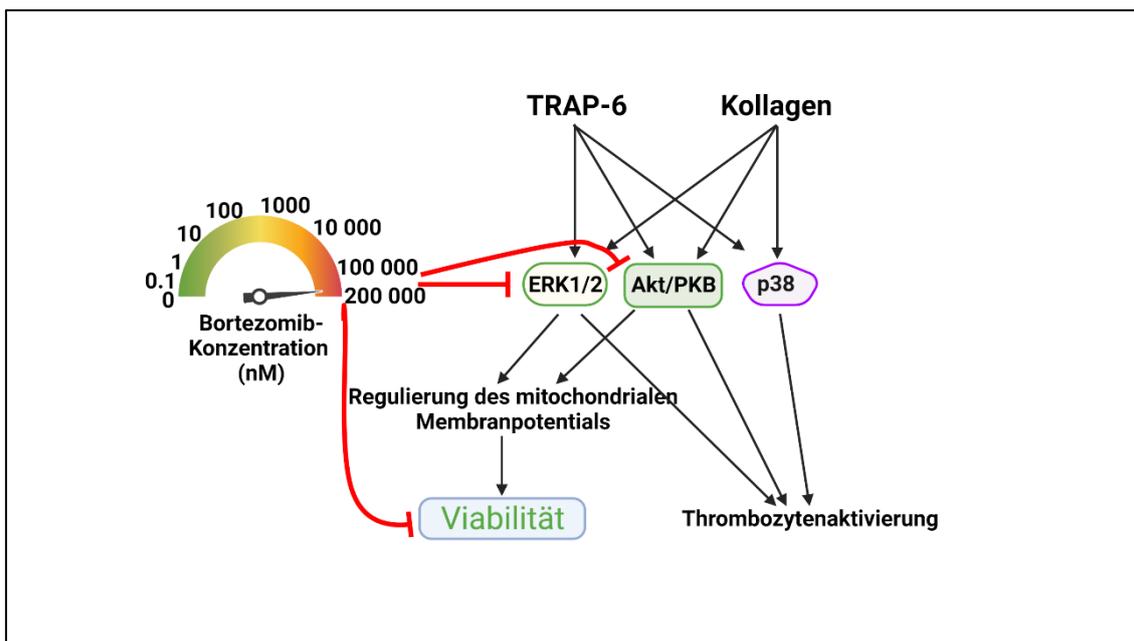


Abb. 15 Schematische Darstellung der Zusammenfassung dieser Arbeit

Hohe Bortezomibkonzentrationen (100 μ M und 200 μ M) führen zu einer reduzierten Viabilität von humanen Thrombozyten sowie zu einer Hemmung der aktivierenden Signalwege, stimuliert durch Kollagen oder TRAP-6, via ERK1/2 und Akt/PKB, welche wiederum durch die Regulierung des mitochondrialen Membranpotentials Einfluss auf die Viabilität nehmen. Der Signalweg via p38 MAP Kinase bleibt auch bei hohen Bortezomibkonzentrationen unbeeinflusst. Created with BioRender. Lizenz liegt vor.

Proteinkinase B (Akt/PKB), Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), Mol (M), Mitogen-aktiviertes Protein (MAP), Thrombin Receptor-Activating Peptide (TRAP);

4.4 Hämostaseologische Wirkung der Proteasominhibition

Die Ergebnisse, der hier durchgeführten *in vitro* Studie, müssen nicht zwingend die pharmakologische *in vivo* Wirkung widerspiegeln. Ein Grund hierfür ist, dass Thrombozyten über andere Blutzellen und über das Endothel, die durch die Proteasomhemmung verändert werden, indirekt in ihrer Funktion beeinflusst werden können. Den aktivierenden Signalwegen und der Aggregation stehen dabei inhibitorische Gegenregulationsmechanismen gegenüber, die für die Thrombozytenintegrität *in vivo* sehr bedeutsam sind (Smolenski 2012). Bisherige Untersuchungen der inhibitorischen Signalwege unter Proteasomhemmung *in vivo* konnten kein eindeutigen Effekt von Bortezomib auf das venöse Thromboserisiko nachweisen. Konkordant zur höheren Thrombozytenaktivität *in vitro* gibt es in Einzelfällen einige Hinweise auf eine mögliche erhöhte Inzidenz von arteriellen kardiovaskulären Ereignissen und ischämischen Herzinfarkten (Hassan, Palaskas et al. 2018), wenn gleich umfassende, abschließende Daten fehlen. Unter anderem waren

allerdings Patienten/-innen mit entsprechenden Risikoprofilen in den großen klinischen Studien mit Bortezomib ausgeschlossen.

Bei der Therapie mit dem neueren Proteasominhibitor Carfilzomib, mit stärkerer selektiver Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität, traten anders als bei Bortezomib vermehrt Myokardinfarkte auf (Stewart, Rajkumar et al. 2015, Laubach, Moslehi et al. 2017). Weitere Studien, die den Einfluss von Carfilzomib oder anderen neuen Proteasominhibitoren auf die Thrombozytenfunktion untersuchen, wären daher von besonderem Interesse.

4.5 Methodische Herausforderungen und Einschränkungen

Mit der Durchführung dieser Studie waren auch methodische und experimentelle Herausforderungen verbunden. Für die Inkubationszeit mit Bortezomib wurde eine Dauer von 60 Minuten ausgewählt, da proteasomabhängige Prozesse mutmaßlich langsam und protrahiert ablaufen. Die experimentelle Herangehensweise orientierte sich dabei an Vorstudien, die valide und reproduzierbare Ergebnisse bei Untersuchungen zur Proteasomaktivität und Polyubiquitinierung unter Bortezomibinkubation gezeigt hatten (Koessler, Etzel et al. 2016). In anderen Aggregationsstudien wurden Effekte auch nach Inkubationszeiten von 60 oder 120 Minuten nachgewiesen (Avcu, Ural et al. 2008).

Das Waschen der Thrombozyten selbst ist ein kritischer Prozess, verbunden mit dem Risiko einer funktionellen Beeinträchtigung oder einer Präaktivierung der Thrombozyten. Allerdings war es, insbesondere für die Analyse von Signalwegen mittels Western Blot-Analyse notwendig, mögliche Störfaktoren aus dem Plasma zu minimieren. Im Vergleich zu frisch präparierten Proben zeigten sich in den Kontrollansätzen stets auch nach 60-minütiger Inkubation, sowohl bei den Aggregationsstudien wie auch bei der Analyse der Signalwege, keine Änderung der Wertelagen, sodass von zuverlässigen Ergebnissen auszugehen ist. Dabei wurden bei den Aggregationsmessungen Werte erreicht, wie sie bei normaler Thrombozytenfunktion zu erwarten sind.

4.6 Ausblick

In dieser *in vitro* Studie mit einstündiger Inkubationszeit konnten wir keinen wesentlichen Einfluss von Bortezomib auf die Aktivierung und Aggregation von WP über klassische Induktionswege feststellen, sofern Bortezomib in nM-Konzentrationen, die bereits zu einer vollständigen Proteasomhemmung führen (Koessler, Etzel et al. 2016), eingesetzt wird. Supramaximale Konzentrationen von Bortezomib im höheren μM -Bereich führen dagegen zur unspezifischen Beeinträchtigung des Resazurin-abhängigen Metabolismus in Thrombozyten. Diese Dosis-Wirkungs-Verhältnisse sind für die experimentelle Forschung mit Thrombozyten zur weiteren Aufklärung der Proteasomfunktion sehr relevant.

In einer ergänzenden Studie wurde zeitverzögerte Prozesse der Proteasomhemmung in Thrombozyten durch eine eintägige Inkubationszeit von Vollblut mit Bortezomib evaluiert (Klingler, Niklaus et al. 2021). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die ADP-vermittelte Aggregation sowie die Expression und Aktivität der purinergen Rezeptoren P2Y1, P2Y12 und P2X1 unverändert bleibt.

Neben den aktivierenden Signalwegen wird die Thrombozytenintegrität auch über inhibitorische Signalwege reguliert (Smolenski 2012). Hierzu konnten Klingler et al. zeigen, dass trotz unveränderter GPIb Rezeptor Expression auf den Thrombozyten, Thrombozyten unter der langfristigen Proteasomhemmung von 24 Stunden eine verstärkte Adhäsion auf mit Agonisten-beschichteten Oberflächen aufweisen (Klingler, Niklaus et al. 2021). Ebenso wurden inhibitorische Signalwege u.a. die vasodilatator-stimulated phospho-protein (VASP)-Phosphorylierung und die NO-induzierte Inhibition von Fibrinogen leicht reduziert. Diese Ergebnisse unterstützen wiederum die Untersuchungen von Koessler et al., welche daraufhin deuten, dass die cGMP- (cyclisches Guanosinmonophosphat) oder cAMP-abhängigen (cyclisches Adenosinmonophosphat) Signalwege auch bereits durch kürzere Proteasomhemmung attenuiert werden und die Reaktivität von Thrombozyten gegenüber NO oder Prostaglandinen abgeschwächt wird (Koessler, Schuepferling et al. 2019). Diese Botenstoffe spielen aber gerade im Zusammenspiel der Thrombozyten mit dem Endothel eine besondere Rolle. Eine Störung der Thrombozytenregulierung durch

Bortezomib könnte dabei auch zur Triggerung von kardiovaskulären Ereignissen beitragen. In weitere Studien sollten daher auch die neueren Proteasominhibitoren, beispielsweise Carfilzomib, die z.T. ein andere Wirksamkeit gegenüber den Proteasom-Untereinheiten aufweisen, einbezogen werden (Beck, Dubiella et al. 2012).

Wie unter 1.1.3 und 1.2.3 beschrieben, spielen sowohl Thrombozyten aus auch das UPS eine Rolle im Rahmen von Inflammation und Infektion. Bislang wird ein Zusammenhang des Proteasomsystems mit der Expression von MHC-Klasse I-Molekülen an der Thrombozytenoberfläche vermutet. Welche genaue Rolle das Proteasomsystem von Thrombozyten bei inflammatorischen Reaktionen spielt, ist bislang weitestgehend unerforscht (Trugilho, Hottz et al. 2017, Colberg, Cammann et al. 2020).

Ein anderer Ansatz ergibt sich auch für die Transfusionsmedizin. Die Lagerung von Thrombozytenkonzentraten führt zum Abbau von funktionell relevanten Proteinen, wie z.B. für die Abnahme der Phosphodiesterase 5A-Aktivität gezeigt (Kobsar, Putz et al. 2014). Damit gehen funktionelle Defizite der Thrombozyten einher, als storage lesion bezeichnet. Eine Studie von Colberg et al. konnte eine gleichbleibende Expression von allen katalytischen Untereinheiten des Standard- und des Immunoproteasoms in Thrombozytenkonzentraten während einer Lagerung von sieben Tagen nachweisen. Ebenso zeigte sich die Proteasomaktivität an Tag eins und sieben der Lagerung unverändert (Colberg, Cammann et al. 2021). Fügt man Bortezomib zum Thrombozytenkonzentrat hinzu, so blieb die Ubiquitinierung von Proteinen nach 24 Stunden konstant. Colberg et al. vermuten, dass alternative Degenerationswege als Kompensationsmechanismus aktiviert werden (Colberg, Cammann et al. 2021). Auch wenn sich Fragen nach Toxizität und Praktikabilität stellen, könnten sich durch einen Proteasomhemmstoff als Additivum in Thrombozytenkonzentraten möglicherweise proteindegenerative Prozesse durch das UPS bei gleichzeitiger Erhaltung der Thrombozytenfunktion unterdrücken lassen. Wie Colberg et al. gezeigt haben, lassen sich auf diese Weise auch Langzeitwirkungen der Proteasomhemmung in Thrombozyten weiter untersuchen, da Thrombozytenkonzentrate über eine Zeitdauer von mehreren Tagen gelagert werden.

5 Zusammenfassung

Bortezomib, ein selektiver und potenter Proteasominhibitor, wird experimentell in der Tumorzellforschung sowie therapeutisch in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt. Die Wirkung auf die Thrombozytenfunktion war bislang unzureichend untersucht. Daher evaluiert diese Studie die dosisabhängige Wirkung von Bortezomib auf die Viabilität, die Aggregation von gewaschenen Thrombozyten und auf aktivierende Signalwege in gewaschenen Thrombozyten.

Die Thrombozytenviabilität war bei hohen Bortezomibkonzentrationen von 100 - 200 μM vermindert. Passend dazu verminderten 100 - 200 μM Bortezomib die Phosphorylierung der ERK1/2 und der Akt/PKB in humanen Thrombozyten. Im Gegensatz dazu hatten diese hohen Bortezomibkonzentrationen keinen Einfluss auf das Niveau der p38 MAP Kinase-Phosphorylierung in aktivierten Thrombozyten. Die Thrombozytenaggregation, induziert durch hohe Konzentrationen von Kollagen oder TRAP-6, blieb unter 0,1 nM - 200 μM Bortezomib unverändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bortezomib weder die essenziellen, aktivierenden Signalwege noch die Initialisierung der Aggregation relevant beeinflusst. Das zeigt, dass diese Prozesse in Thrombozyten nicht abhängig von der Proteasomaktivität sind. Supramaximale Inhibierung des Proteasomsystems mit Bortezomibkonzentrationen von 100 μM oder mehr führen möglicherweise zu veränderter Thrombozytenreaktionsfähigkeit, welche unter Umständen durch unspezifische und potenziell toxische Effekte mit erniedrigter Zellviabilität verursacht werden (vgl. Abb. 15).

6 Literaturverzeichnis

Adam, F., A. Kauskot, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2008). "Mitogen-activated protein kinases in hemostasis and thrombosis." J Thromb Haemost **6**(12): 2007-2016.

Adams, J. (2003). "The proteasome: structure, function, and role in the cell." Cancer Treat Rev **29 Suppl 1**: 3-9.

Adams, J., M. Behnke, S. Chen, A. A. Cruickshank, L. R. Dick, L. Grenier, J. M. Klunder, Y. T. Ma, L. Plamondon and R. L. Stein (1998). "Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids." Bioorg Med Chem Lett **8**(4): 333-338.

Aggrey, A. A., K. Srivastava, S. Ture, D. J. Field and C. N. Morrell (2013). "Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria." J Immunol **190**(9): 4685-4691.

Akiyama, K., K. Yokota, S. Kagawa, N. Shimbara, T. Tamura, H. Akioka, H. G. Nothwang, C. Noda, K. Tanaka and A. Ichihara (1994). "cDNA cloning and interferon gamma down-regulation of proteasomal subunits X and Y." Science **265**(5176): 1231-1234.

Aslam, R., E. R. Speck, M. Kim, A. R. Crow, K. W. Bang, F. P. Nestel, H. Ni, A. H. Lazarus, J. Freedman and J. W. Semple (2006). "Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo." Blood **107**(2): 637-641.

Avcu, F., A. U. Ural, T. Cetin and O. Nevruz (2008). "Effects of bortezomib on platelet aggregation and ATP release in human platelets, in vitro." Thromb Res **121**(4): 567-571.

Bard, J. A. M., E. A. Goodall, E. R. Greene, E. Jonsson, K. C. Dong and A. Martin (2018). "Structure and Function of the 26S Proteasome." Annu Rev Biochem **87**: 697-724.

Barry, F. A. and J. M. Gibbins (2002). "Protein kinase B is regulated in platelets by the collagen receptor glycoprotein VI." J Biol Chem **277**(15): 12874-12878.

Barry, F. A., G. J. Graham, M. J. Fry and J. M. Gibbins (2003). "Regulation of glycogen synthase kinase 3 in human platelets: a possible role in platelet function?" FEBS Lett **553**(1-2): 173-178.

Beck, P., C. Dubiella and M. Groll (2012). "Covalent and non-covalent reversible proteasome inhibition." Biol Chem **393**(10): 1101-1120.

Begonja, A. J., J. Geiger, N. Rukoyatkina, S. Rauchfuss, S. Gambaryan and U. Walter (2007). "Thrombin stimulation of p38 MAP kinase in human platelets is mediated by ADP and thromboxane A2 and inhibited by cGMP/cGMP-dependent protein kinase." Blood **109**(2): 616-618.

Blair, P. and R. Flaumenhaft (2009). "Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates." Blood Rev **23**(4): 177-189.

Blair, P., S. Rex, O. Vitseva, L. Beaulieu, K. Tanriverdi, S. Chakrabarti, C. Hayashi, C. A. Genco, M. Iafrazi and J. E. Freedman (2009). "Stimulation of Toll-like receptor 2 in human platelets

induces a thromboinflammatory response through activation of phosphoinositide 3-kinase." Circ Res **104**(3): 346-354.

Born, G. V. (1962). "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal." Nature **194**(4832): 927-929.

Borsch-Haubold, A. G., R. M. Kramer and S. P. Watson (1995). "Cytosolic phospholipase A2 is phosphorylated in collagen- and thrombin-stimulated human platelets independent of protein kinase C and mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **270**(43): 25885-25892.

Borsch-Haubold, A. G., R. M. Kramer and S. P. Watson (1997). "Phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A2 by 38-kDa mitogen-activated protein kinase in collagen-stimulated human platelets." Eur J Biochem **245**(3): 751-759.

Brophy, T. M., M. Raab, H. Daxecker, K. G. Culligan, I. Lehmann, A. J. Chubb, A. Treumann and N. Moran (2008). "RN181, a novel ubiquitin E3 ligase that interacts with the KVGFFKR motif of platelet integrin alpha(IIb)beta3." Biochem Biophys Res Commun **369**(4): 1088-1093.

Canobbio, I., S. Reineri, F. Sinigaglia, C. Balduini and M. Torti (2004). "A role for p38 MAP kinase in platelet activation by von Willebrand factor." Thromb Haemost **91**(1): 102-110.

Chapman, L. M., A. A. Aggrey, D. J. Field, K. Srivastava, S. Ture, K. Yui, D. J. Topham, W. M. Baldwin, 3rd and C. N. Morrell (2012). "Platelets present antigen in the context of MHC class I." J Immunol **189**(2): 916-923.

Chauhan, D., T. Hideshima, C. Mitsiades, P. Richardson and K. C. Anderson (2005). "Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma." Mol Cancer Ther **4**(4): 686-692.

Chen, J., S. De, D. S. Damron, W. S. Chen, N. Hay and T. V. Byzova (2004). "Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice." Blood **104**(6): 1703-1710.

Christie, D. J., T. Avari, L. R. Carrington, E. Cohen, B. A. DeBiase, P. Harrison, T. S. Kickler, K. Kottke-Marchant, M. Ledford-Kraemer, M. L. Rand, A. Schmaier and M. McCabe White (2008). "Platelet Function Testing by Aggregometry; Approved Guideline." Platelet Function Testing by Aggregometry: Approved Guideline **28**: 1-45.

Chung, E. J., S. W. Moon, S. A. Jung, Y. J. Cho, S. W. Kim and J. H. Lee (2010). "Potentiation of bortezomib-induced apoptosis by TGF-beta in cultured human Tenon's fibroblasts: contribution of the PI3K/Akt signaling pathway." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(12): 6232-6237.

Clark, S. R., A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green and P. Kubersky (2007). "Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood." Nat Med **13**(4): 463-469.

Colberg, L., C. Cammann, A. Greinacher and U. Seifert (2020). "Structure and function of the ubiquitin-proteasome system in platelets." J Thromb Haemost **18**(4): 771-780.

Colberg, L., C. Cammann, J. Wesche, E. Topfstedt, U. Seifert and A. Greinacher (2021). "The platelet proteasome and immunoproteasome are stable in buffy-coat derived platelet concentrates for up to 7 days." Transfusion **61**(9): 2746-2755.

- Collins, G. A. and A. L. Goldberg (2017). "The Logic of the 26S Proteasome." Cell **169**(5): 792-806.
- Cook, S. J., K. Stuart, R. Gilley and M. J. Sale (2017). "Control of cell death and mitochondrial fission by ERK1/2 MAP kinase signalling." FEBS J **284**(24): 4177-4195.
- D' Atri, L. P. and M. Schattner (2017). "Platelet toll-like receptors in thromboinflammation." Front Biosci (Landmark Ed) **22**(11): 1867-1883.
- Danese, S., C. de la Motte, B. M. Reyes, M. Sans, A. D. Levine and C. Focchi (2004). "Cutting edge: T cells trigger CD40-dependent platelet activation and granular RANTES release: a novel pathway for immune response amplification." J Immunol **172**(4): 2011-2015.
- Dangelmaier, C. A., P. G. Quinter, J. Jin, A. Y. Tsygankov, S. P. Kunapuli and J. L. Daniel (2005). "Rapid ubiquitination of Syk following GPVI activation in platelets." Blood **105**(10): 3918-3924.
- Demo, S. D., C. J. Kirk, M. A. Aujay, T. J. Buchholz, M. Dajee, M. N. Ho, J. Jiang, G. J. Laidig, E. R. Lewis, F. Parlati, K. D. Shenk, M. S. Smyth, C. M. Sun, M. K. Vallone, T. M. Woo, C. J. Molineaux and M. K. Bennett (2007). "Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome." Cancer Res **67**(13): 6383-6391.
- Deutsch, V. R. and A. Tomer (2006). "Megakaryocyte development and platelet production." Br J Haematol **134**(5): 453-466.
- Edinger, A. L. and C. B. Thompson (2002). "Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake." Mol Biol Cell **13**(7): 2276-2288.
- Egger, D. and K. Bienz (1994). "Protein (western) blotting." Mol Biotechnol **1**(3): 289-305.
- Elzey, B. D., N. W. Schmidt, S. A. Crist, T. P. Kresowik, J. T. Harty, B. Nieswandt and T. L. Ratliff (2008). "Platelet-derived CD154 enables T-cell priming and protection against *Listeria monocytogenes* challenge." Blood **111**(7): 3684-3691.
- Elzey, B. D., J. Tian, R. J. Jensen, A. K. Swanson, J. R. Lees, S. R. Lentz, C. S. Stein, B. Nieswandt, Y. Wang, B. L. Davidson and T. L. Ratliff (2003). "Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments." Immunity **19**(1): 9-19.
- Fishbain, S., S. Prakash, A. Herrig, S. Elsasser and A. Matouschek (2011). "Rad23 escapes degradation because it lacks a proteasome initiation region." Nat Commun **2**: 192.
- Garcia, A., H. Shankar, S. Murugappan, S. Kim and S. P. Kunapuli (2007). "Regulation and functional consequences of ADP receptor-mediated ERK2 activation in platelets." Biochem J **404**(2): 299-308.
- Ghansah, H., I. B. Debreceni, Z. Fejes, B. Nagy, Jr. and J. Kappelmayer (2021). "The Proteasome Inhibitor Bortezomib Induces Apoptosis and Activation in Gel-Filtered Human Platelets." Int J Mol Sci **22**(16).
- Gibbins, J. M. (2004). "Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus formation." J Cell Sci **117**(Pt 16): 3415-3425.

- Glickman, M. H., D. M. Rubin, V. A. Fried and D. Finley (1998). "The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome." Mol Cell Biol **18**(6): 3149-3162.
- Golebiewska, E. M. and A. W. Poole (2015). "Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond." Blood Rev **29**(3): 153-162.
- Gomes, A. V. (2013). "Genetics of proteasome diseases." Scientifica (Cairo) **2013**: 637629.
- Grantcharova, V., E. J. Alm, D. Baker and A. L. Horwich (2001). "Mechanisms of protein folding." Curr Opin Struct Biol **11**(1): 70-82.
- Grewal, I. S. and R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." Annu Rev Immunol **16**: 111-135.
- Groll, M., M. Bajorek, A. Kohler, L. Moroder, D. M. Rubin, R. Huber, M. H. Glickman and D. Finley (2000). "A gated channel into the proteasome core particle." Nat Struct Biol **7**(11): 1062-1067.
- Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik and R. Huber (1997). "Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution." Nature **386**(6624): 463-471.
- Groll, M., W. Heinemeyer, S. Jager, T. Ullrich, M. Bochtler, D. H. Wolf and R. Huber (1999). "The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(20): 10976-10983.
- Grundler, K., R. Rotter, S. Tilley, J. Pircher, T. Czermak, M. Yakac, E. Gaitzsch, S. Massberg, F. Krotz, H. Y. Sohn, U. Pohl, H. Mannell and B. F. Kraemer (2016). "The proteasome regulates collagen-induced platelet aggregation via nuclear-factor-kappa-B (NFκB) activation." Thromb Res **148**: 15-22.
- Gupta, N., W. Li, B. Willard, R. L. Silverstein and T. M. McIntyre (2014). "Proteasome proteolysis supports stimulated platelet function and thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(1): 160-168.
- Gurbel, P. A., A. Kuliopulos and U. S. Tantry (2015). "G-protein-coupled receptors signaling pathways in new antiplatelet drug development." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(3): 500-512.
- Harrison, P. and E. M. Cramer (1993). "Platelet alpha-granules." Blood Rev **7**(1): 52-62.
- Hassan, S. A., N. Palaskas, P. Kim, C. Iliescu, J. Lopez-Mattei, E. Mouhayar, R. Mougdil, K. Thompson, J. Banchs and S. W. Yusuf (2018). "Chemotherapeutic Agents and the Risk of Ischemia and Arterial Thrombosis." Curr Atheroscler Rep **20**(2): 10.
- Heinemeyer, W., M. Fischer, T. Krimmer, U. Stachon and D. H. Wolf (1997). "The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing." J Biol Chem **272**(40): 25200-25209.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." Annu Rev Biochem **67**: 425-479.

Hershko, A., E. Eytan, A. Ciechanover and A. L. Haas (1982). "Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins." J Biol Chem **257**(23): 13964-13970.

Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V. J. Palombella, P. J. Elliott, J. Adams and K. C. Anderson (2001). "The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells." Cancer Res **61**(7): 3071-3076.

Hisamatsu, H., N. Shimbara, Y. Saito, P. Kristensen, K. B. Hendil, T. Fujiwara, E. Takahashi, N. Tanahashi, T. Tamura, A. Ichihara and K. Tanaka (1996). "Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma." J Exp Med **183**(4): 1807-1816.

Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H. D. Ulrich and S. Jentsch (2000). "Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing." Cell **102**(5): 577-586.

Horiuchi, H. (2006). "Recent advance in antiplatelet therapy: the mechanisms, evidence and approach to the problems." Ann Med **38**(3): 162-172.

Husnjak, K., S. Elsasser, N. Zhang, X. Chen, L. Randles, Y. Shi, K. Hofmann, K. J. Walters, D. Finley and I. Dikic (2008). "Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor." Nature **453**(7194): 481-488.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216.

Karim, Z. A., H. P. Vemana and F. T. Khasawneh (2015). "MALT1-ubiquitination triggers non-genomic NF-kappaB/IKK signaling upon platelet activation." PLoS One **10**(3): e0119363.

Karin, M. and Y. Ben-Neriah (2000). "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity." Annu Rev Immunol **18**: 621-663.

Kennedy, S. G., E. S. Kandel, T. K. Cross and N. Hay (1999). "Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria." Mol Cell Biol **19**(8): 5800-5810.

Kim, S., J. Jin and S. P. Kunapuli (2004). "Akt activation in platelets depends on Gi signaling pathways." J Biol Chem **279**(6): 4186-4195.

Kissel, K., S. Berber, A. Nockher, S. Santoso, G. Bein and H. Hackstein (2006). "Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines." Transfusion **46**(5): 818-827.

Klingler, P., M. Niklaus, J. Koessler, K. Weber, A. Koessler, M. Boeck and A. Kobsar (2021). "Influence of long-term proteasome inhibition on platelet responsiveness mediated by bortezomib." Vascul Pharmacol **138**: 106830.

Klockenbusch, C., G. M. Walsh, L. M. Brown, M. D. Hoffman, V. Ignatchenko, T. Kislinger and J. Kast (2014). "Global proteome analysis identifies active immunoproteasome subunits in human platelets." Mol Cell Proteomics **13**(12): 3308-3319.

- Kloetzel, P. M. (2004). "The proteasome and MHC class I antigen processing." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 225-233.
- Kobsar, A., E. Putz, P. Yilmaz, E. Weinig, M. Boeck and J. Koessler (2014). "Decreasing phosphodiesterase 5A activity contributes to platelet cGMP accumulation during storage of apheresis-derived platelet concentrates." Transfusion **54**(4): 1008-1014.
- Koessler, J., J. Etzel, K. Weber, M. Boeck and A. Kobsar (2016). "Evaluation of dose-dependent effects of the proteasome inhibitor bortezomib in human platelets." European journal of pharmacology **791**: 99-104.
- Koessler, J., M. Niklaus, K. Weber, A. Koessler, S. Kuhn, M. Boeck and A. Kobsar (2019). "The Role of Human Platelet Preparation for Toll-Like Receptors 2 and 4 Related Platelet Responsiveness." TH Open **3**(2): e94-e102.
- Koessler, J., A. Schuepferling, P. Klingler, A. Koessler, K. Weber, M. Boeck and A. Kobsar (2019). "The role of proteasome activity for activating and inhibitory signalling in human platelets." Cell Signal **62**: 109351.
- Komander, D. and M. Rape (2012). "The ubiquitin code." Annu Rev Biochem **81**: 203-229.
- Kraemer, B. F., A. S. Weyrich and S. Lindemann (2013). "Protein degradation systems in platelets." Thromb Haemost **110**(5): 920-924.
- Kramer, R. M., E. F. Roberts, B. A. Strifler and E. M. Johnstone (1995). "Thrombin induces activation of p38 MAP kinase in human platelets." J Biol Chem **270**(46): 27395-27398.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." J Biochem Biophys Methods **10**(3-4): 203-209.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lam, F. W., K. V. Vijayan and R. E. Rumbaut (2015). "Platelets and Their Interactions with Other Immune Cells." Compr Physiol **5**(3): 1265-1280.
- Laubach, J. P., J. J. Moslehi, S. A. Francis, J. F. San Miguel, P. Sonneveld, R. Z. Orlowski, P. Moreau, L. Rosinol, E. A. Faber, Jr., P. Voorhees, M. V. Mateos, L. Marquez, H. Feng, A. Desai, H. van de Velde, J. Elliott, H. Shi, E. Dow, N. Jobanputra, D. L. Esseltine, L. Niculescu, K. C. Anderson, S. Lonial and P. G. Richardson (2017). "A retrospective analysis of 3954 patients in phase 2/3 trials of bortezomib for the treatment of multiple myeloma: towards providing a benchmark for the cardiac safety profile of proteasome inhibition in multiple myeloma." Br J Haematol **178**(4): 547-560.
- Lee, C., M. P. Schwartz, S. Prakash, M. Iwakura and A. Matouschek (2001). "ATP-dependent proteases degrade their substrates by processively unraveling them from the degradation signal." Mol Cell **7**(3): 627-637.
- Leger, A. J., L. Covic and A. Kuliopulos (2006). "Protease-activated receptors in cardiovascular diseases." Circulation **114**(10): 1070-1077.

- Leytin, V., D. J. Allen, A. Mutlu, A. V. Gyulkhandanyan, S. Mykhaylov and J. Freedman (2009). "Mitochondrial control of platelet apoptosis: effect of cyclosporin A, an inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore." Lab Invest **89**(4): 374-384.
- Li, Z., G. Zhang, R. Feil, J. Han and X. Du (2006). "Sequential activation of p38 and ERK pathways by cGMP-dependent protein kinase leading to activation of the platelet integrin α IIb β 3." Blood **107**(3): 965-972.
- Lindemann, S., N. D. Tolley, D. A. Dixon, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, G. A. Zimmerman and A. S. Weyrich (2001). "Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 β synthesis." J Cell Biol **154**(3): 485-490.
- Lioni, M., K. Noma, A. Snyder, A. Klein-Szanto, J. A. Diehl, A. K. Rustgi, M. Herlyn and K. S. Smalley (2008). "Bortezomib induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway." Mol Cancer Ther **7**(9): 2866-2875.
- Liu, C. W., M. J. Corboy, G. N. DeMartino and P. J. Thomas (2003). "Endoproteolytic activity of the proteasome." Science **299**(5605): 408-411.
- Lopes Pires, M. E., S. R. Clarke, S. Marcondes and J. M. Gibbins (2017). "Lipopolysaccharide potentiates platelet responses via toll-like receptor 4-stimulated Akt-Erk-PLA2 signalling." PLoS One **12**(11): e0186981.
- Lupas, A., J. M. Flanagan, T. Tamura and W. Baumeister (1997). "Self-compartmentalizing proteases." Trends Biochem Sci **22**(10): 399-404.
- Marques, A. J., R. Palanimurugan, A. C. Matias, P. C. Ramos and R. J. Dohmen (2009). "Catalytic mechanism and assembly of the proteasome." Chem Rev **109**(4): 1509-1536.
- Mazharian, A., S. Roger, E. Berrou, F. Adam, A. Kauskot, P. Nurden, M. Jandrot-Perrus and M. Bryckaert (2007). "Protease-activating receptor-4 induces full platelet spreading on a fibrinogen matrix: involvement of ERK2 and p38 and Ca²⁺ mobilization." J Biol Chem **282**(8): 5478-5487.
- Mazharian, A., S. Roger, P. Maurice, E. Berrou, M. R. Popoff, M. F. Hoylaerts, F. Fauvel-Lafeve, A. Bonnefoy and M. Bryckaert (2005). "Differential Involvement of ERK2 and p38 in platelet adhesion to collagen." J Biol Chem **280**(28): 26002-26010.
- McNicol, A. and S. J. Israels (1999). "Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis." Thromb Res **95**(1): 1-18.
- Michelson, A. D. (2010). "Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease." Nat Rev Drug Discov **9**(2): 154-169.
- Mitchell, W. B., J. Li, D. L. French and B. S. Coller (2006). "alphaIIb beta3 biogenesis is controlled by engagement of alphaIIb in the calnexin cycle via the N15-linked glycan." Blood **107**(7): 2713-2719.
- Mitsiades, N., C. S. Mitsiades, P. G. Richardson, V. Poulaki, Y. T. Tai, D. Chauhan, G. Fanourakis, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T. A. Libermann, R. Schlossman, N. C. Munshi, T. Hideshima and K.

- C. Anderson (2003). "The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications." Blood **101**(6): 2377-2380.
- Morrell, C. N., A. A. Aggrey, L. M. Chapman and K. L. Modjeski (2014). "Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells." Blood **123**(18): 2759-2767.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." Cell **116**(2): 221-234.
- Nadal-Wollbold, F., M. Pawlowski, S. Levy-Toledano, E. Berrou, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2002). "Platelet ERK2 activation by thrombin is dependent on calcium and conventional protein kinases C but not Raf-1 or B-Raf." FEBS Lett **531**(3): 475-482.
- Nandi, D., P. Tahiliani, A. Kumar and D. Chandu (2006). "The ubiquitin-proteasome system." J Biosci **31**(1): 137-155.
- Nayak, M. K., P. P. Kulkarni and D. Dash (2013). "Regulatory role of proteasome in determination of platelet life span." J Biol Chem **288**(10): 6826-6834.
- Nayak, M. K., K. Kumar and D. Dash (2011). "Regulation of proteasome activity in activated human platelets." Cell Calcium **49**(4): 226-232.
- Niklaus, M., P. Klingler, K. Weber, A. Koessler, S. Kuhn, M. Boeck, A. Kobsar and J. Koessler (2022). "Platelet Toll-Like-Receptor-2 and -4 Mediate Different Immune-Related Responses to Bacterial Ligands." TH Open **6**(3): e156-e167.
- Nussbaum, A. K., T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanovic, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee and H. Schild (1998). "Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12504-12509.
- Ostrowska, H., J. K. Ostrowska, K. Worowski and P. Radziwon (2003). "Human platelet 20S proteasome: inhibition of its chymotrypsin-like activity and identification of the proteasome activator PA28. A preliminary report." Platelets **14**(3): 151-157.
- Ostrowska, J. K., M. Z. Wojtukiewicz, E. Chabielska, W. Buczek and H. Ostrowska (2004). "Proteasome inhibitor prevents experimental arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats." Thromb Haemost **92**(1): 171-177.
- Oury, C., E. Toth-Zsamboki, J. Vermylen and M. F. Hoylaerts (2002). "P2X(1)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen." Blood **100**(7): 2499-2505.
- Page, B., M. Page and C. Noel (1993). "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro." Int J Oncol **3**(3): 473-476.
- Peters, J. M. (1994). "Proteasomes: protein degradation machines of the cell." Trends Biochem Sci **19**(9): 377-382.
- Peth, A., T. Uchiki and A. L. Goldberg (2010). "ATP-dependent steps in the binding of ubiquitin conjugates to the 26S proteasome that commit to degradation." Mol Cell **40**(4): 671-681.

- Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." Annu Rev Biochem **70**: 503-533.
- Pickart, C. M. and R. E. Cohen (2004). "Proteasomes and their kin: proteases in the machine age." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(3): 177-187.
- Piva, R., B. Ruggeri, M. Williams, G. Costa, I. Tamagno, D. Ferrero, V. Giai, M. Coscia, S. Peola, M. Massaia, G. Pezzoni, C. Allievi, N. Pescalli, M. Cassin, S. di Giovine, P. Nicoli, P. de Feudis, I. Strepponi, I. Roato, R. Ferracini, B. Bussolati, G. Camussi, S. Jones-Bolin, K. Hunter, H. Zhao, A. Neri, A. Palumbo, C. Berkers, H. Ovaa, A. Bernareggi and G. Inghirami (2008). "CEP-18770: A novel, orally active proteasome inhibitor with a tumor-selective pharmacologic profile competitive with bortezomib." Blood **111**(5): 2765-2775.
- Prakash, S., L. Tian, K. S. Ratliff, R. E. Lehotzky and A. Matouschek (2004). "An unstructured initiation site is required for efficient proteasome-mediated degradation." Nat Struct Mol Biol **11**(9): 830-837.
- Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(7): 3116-3120.
- Resendiz, J. C., M. H. Kroll and R. Lassila (2007). "Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function." J Thromb Haemost **5**(12): 2484-2493.
- Riss, T., R. Moravec, A. Niles, S. Duellman, H. Benink, T. Worzella and L. Minor (2013). Assay Guidance Manual: Cell Viability Assays.
- Rivera, J., M. L. Lozano, L. Navarro-Nunez and V. Vicente (2009). "Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation." Haematologica **94**(5): 700-711.
- Roger, S., M. Pawlowski, A. Habib, M. Jandrot-Perrus, J. P. Rosa and M. Bryckaert (2004). "Costimulation of the Gi-coupled ADP receptor and the Gq-coupled TXA2 receptor is required for ERK2 activation in collagen-induced platelet aggregation." FEBS Lett **556**(1-3): 227-235.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature **401**(6748): 86-90.
- Romero-Calvo, I., B. Ocon, P. Martinez-Moya, M. D. Suarez, A. Zarzuelo, O. Martinez-Augustin and F. S. de Medina (2010). "Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots." Anal Biochem **401**(2): 318-320.
- Rowley, J. W., A. J. Oler, N. D. Tolley, B. N. Hunter, E. N. Low, D. A. Nix, C. C. Yost, G. A. Zimmerman and A. S. Weyrich (2011). "Genome-wide RNA-seq analysis of human and mouse platelet transcriptomes." Blood **118**(14): e101-111.
- Rubin, D. M., M. H. Glickman, C. N. Larsen, S. Dhruvakumar and D. Finley (1998). "Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome." EMBO J **17**(17): 4909-4919.
- Rüchel, R., R. L. Steere and E. F. Erbe (1978). "Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels." Journal of Chromatography A **166**(2): 563-575.

- Rupa-Matysek, J., L. Gil, E. Wojtasinska, A. Nowicki, D. Dytfeld, M. Kazmierczak and M. Komarnicki (2014). "Inhibitory effects of bortezomib on platelet aggregation in patients with multiple myeloma." Thromb Res **134**(2): 404-411.
- Saklatvala, J., L. Rawlinson, R. J. Waller, S. Sarsfield, J. C. Lee, L. F. Morton, M. J. Barnes and R. W. Farndale (1996). "Role for p38 mitogen-activated protein kinase in platelet aggregation caused by collagen or a thromboxane analogue." J Biol Chem **271**(12): 6586-6589.
- Salem, K., M. L. McCormick, E. Wendlandt, F. Zhan and A. Goel (2015). "Copper-zinc superoxide dismutase-mediated redox regulation of bortezomib resistance in multiple myeloma." Redox Biol **4**: 23-33.
- Schreiner, P., X. Chen, K. Husnjak, L. Randles, N. Zhang, S. Elsasser, D. Finley, I. Dikic, K. J. Walters and M. Groll (2008). "Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction." Nature **453**(7194): 548-552.
- Schwarz, U. R., J. Geiger, U. Walter and M. Eigenthaler (1999). "Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects." Thromb Haemost **82**(3): 1145-1152.
- Scott, K., P. J. Hayden, A. Will, K. Wheatley and I. Coyne (2016). "Bortezomib for the treatment of multiple myeloma." Cochrane Database Syst Rev **4**: CD010816.
- Seifert, U., L. P. Bialy, F. Ebstein, D. Bech-Otschir, A. Voigt, F. Schroter, T. Prozorovski, N. Lange, J. Steffen, M. Rieger, U. Kuckelkorn, O. Aktas, P. M. Kloetzel and E. Kruger (2010). "Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon interferon-induced oxidative stress." Cell **142**(4): 613-624.
- Semple, J. W., J. E. Italiano, Jr. and J. Freedman (2011). "Platelets and the immune continuum." Nat Rev Immunol **11**(4): 264-274.
- Senis, Y. A., A. Mazharian and J. Mori (2014). "Src family kinases: at the forefront of platelet activation." Blood **124**(13): 2013-2024.
- Shankar, H., A. Garcia, J. Prabhakar, S. Kim and S. P. Kunapuli (2006). "P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation." Journal of Thrombosis and Haemostasis **4**(3): 638-647.
- Shattil, S. J., J. A. Hoxie, M. Cunningham and L. F. Brass (1985). "Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation." J Biol Chem **260**(20): 11107-11114.
- Smolenski, A. (2012). "Novel roles of cAMP/cGMP-dependent signaling in platelets." J Thromb Haemost **10**(2): 167-176.
- Song, G., G. Ouyang and S. Bao (2005). "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival." J Cell Mol Med **9**(1): 59-71.

Stewart, A. K., S. V. Rajkumar, M. A. Dimopoulos, T. Masszi, I. Spicka, A. Oriol, R. Hajek, L. Rosinol, D. S. Siegel, G. G. Mihaylov, V. Goranova-Marinova, P. Rajnics, A. Suvorov, R. Niesvizky, A. J. Jakubowiak, J. F. San-Miguel, H. Ludwig, M. Wang, V. Maisnar, J. Minarik, W. I. Bensinger, M. V. Mateos, D. Ben-Yehuda, V. Kukreti, N. Zojwalla, M. E. Tonda, X. Yang, B. Xing, P. Moreau, A. Palumbo and A. Investigators (2015). "Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma." N Engl J Med **372**(2): 142-152.

Teicher, B. A. and J. E. Tomaszewski (2015). "Proteasome inhibitors." Biochem Pharmacol **96**(1): 1-9.

Thon, J. N. and D. V. Devine (2007). "Translation of glycoprotein IIIa in stored blood platelets." Transfusion **47**(12): 2260-2270.

Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner and C. M. Pickart (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." EMBO J **19**(1): 94-102.

Toth-Zsomboki, E., C. Oury, H. Cornelissen, R. De Vos, J. Vermynen and M. F. Hoylaerts (2003). "P2X1-mediated ERK2 activation amplifies the collagen-induced platelet secretion by enhancing myosin light chain kinase activation." J Biol Chem **278**(47): 46661-46667.

Trugilho, M. R. O., E. D. Hottz, G. V. F. Brunoro, A. Teixeira-Ferreira, P. C. Carvalho, G. A. Salazar, G. A. Zimmerman, F. A. Bozza, P. T. Bozza and J. Perales (2017). "Platelet proteome reveals novel pathways of platelet activation and platelet-mediated immunoregulation in dengue." PLoS Pathog **13**(5): e1006385.

Urbani, A., E. Prosdoci, A. Carrer, V. Checchetto and I. Szabo (2020). "Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling." Front Cell Dev Biol **8**: 620081.

Velcade®Fachinformation. (07.07.2022). Retrieved 16.03.2023, from https://www.gelbeliste.de/produkte/VELCADE-3-5-mg-Pulver-zur-Herstellung-einer-Injektionsloesung_371401/fachinformation.

Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W. H. McDonald, J. R. Yates, 3rd, E. V. Koonin and R. J. Deshaies (2002). "Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." Science **298**(5593): 611-615.

Verma, R., H. McDonald, J. R. Yates, 3rd and R. J. Deshaies (2001). "Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk." Mol Cell **8**(2): 439-448.

Wang, B. and J. Zheng (2016). "Platelet generation in vivo and in vitro." Springerplus **5**(1): 787.

Weyrich, A. S., H. Schwertz, L. W. Kraiss and G. A. Zimmerman (2009). "Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives." J Thromb Haemost **7**(2): 241-246.

Whitehead, T. P., L. J. Kricka, T. J. Carter and G. H. Thorpe (1979). "Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory." Clin Chem **25**(9): 1531-1546.

Wojcik, C. and G. N. DeMartino (2003). "Intracellular localization of proteasomes." Int J Biochem Cell Biol **35**(5): 579-589.

- Wolf, D. H. and W. Hilt (2004). "The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal." Biochim Biophys Acta **1695**(1-3): 19-31.
- Woulfe, D., H. Jiang, A. Morgans, R. Monks, M. Birnbaum and L. F. Brass (2004). "Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2." J Clin Invest **113**(3): 441-450.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." Nature **419**(6905): 403-407.
- Yu, C., M. Rahmani, D. Conrad, M. Subler, P. Dent and S. Grant (2003). "The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571." Blood **102**(10): 3765-3774.
- Yu, H. C., D. R. Hou, C. Y. Liu, C. S. Lin, C. W. Shiau, A. L. Cheng and K. F. Chen (2013). "Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A mediates bortezomib-induced autophagy in hepatocellular carcinoma independent of proteasome." PLoS One **8**(2): e55705.
- Yu, Y., D. M. Smith, H. M. Kim, V. Rodriguez, A. L. Goldberg and Y. Cheng (2010). "Interactions of PAN's C-termini with archaeal 20S proteasome and implications for the eukaryotic proteasome-ATPase interactions." EMBO J **29**(3): 692-702.
- Yukawa, M., M. Sakon, J. Kambayashi, E. Shiba, T. Kawasaki, H. Ariyoshi and T. Mori (1991). "Proteasome and its novel endogeneous activator in human platelets." Biochem Biophys Res Commun **178**(1): 256-262.
- Yukawa, M., M. Sakon, J. Kambayashi, E. Shiba, T. Kawasaki, Y. Uemura, K. Murata, T. Tanaka, T. Nakayama, H. Shibata and et al. (1993). "Purification and characterization of endogenous protein activator of human platelet proteasome." J Biochem **114**(3): 317-323.
- Zangari, M., J. Guerrero, F. Cavallo, H. K. Prasad, D. Esseltine and L. Fink (2008). "Hemostatic effects of bortezomib treatment in patients with relapsed or refractory multiple myeloma." Haematologica **93**(6): 953-954.
- Zhang, C. C., J. C. Rogalski, D. M. Evans, C. Klockenbusch, R. C. Beavis and J. Kast (2011). "In silico protein interaction analysis using the global proteome machine database." J Proteome Res **10**(2): 656-668.
- Zhou, X., Y. Fang, H. Jing, L. Zhong, P. Luo, H. Song, B. Yang and Q. He (2013). "Involvement of mitogen-activated protein kinase in signal transducer and activator of transcription-1 mediated differentiation induced by bortezomib in acute myeloid leukemia cells." Mol Carcinog **52**(1): 18-28.

I Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A, mA	Ampere, Milliampere
Ab	Antibody, Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
Akt/PKB	Proteinkinase B
APS	Ammonium Peroxdisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units
BAD	BCL-XL/BCL-2 Assotiated Death Promotor
BO	Bortezomib
BSA	Bovin serum albumin/Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
CD	Cluster of Differentiation (z.B. CD40)
CGS	120 mM Sodium Chloride, 30 mM D-Glucose, 12,9 mM Trisodium Citrate
Cl	Chlorid
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
g	Gramm, Einheit für die mittlere Erdschwerebeschleunigung
GP	Glykoprotein

G _q	Phospholipase C stimulierende G-Proteine
GSK	Glykogen Synthase Kinase
h	Stunde(n)
H	Wasserstoff
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin (z.B. IL-1 α)
INF	Interferon (z.B. INF γ)
L	Ligand (z.B. CD40L)
l, ml, μ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LPS	Lipopolysaccharid
M, μ M, nM	Mol, Mikromol, Nanomol
m, mm, μ m, nm	Meter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mAb	Monoclonal Antibody/monoklonaler Antikörper
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonucleic Acid/messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl/Nummer
Na	Natrium
NF κ B	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
P	Phospho-
PA	Proteasome activator (z.B. PA28 γ)
pAb	Polyclonal Antibody/polyklonaler Antikörper
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase

PK	Proteinkinase (z.B. Proteinkinase B)
PL	Phospholipase (z.B. Phospholipase A)
PRP	Platelet Rich Plasma
RANTES	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RFU	Resorufin Fluoreszenz Unit
RNA	Ribonucleic Acid/Ribonukleinsäure
Rpn	regulatory particle non-ATPase
Rpt	regulatory particle ATPase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S.E.M.	Standard Error of the Mean/Standardfehler
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyarylamid Gel Electrophoresis
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like receptor
TRAP-6	Thrombin Receptor-Activating Peptide 6
TSS	Tyrode`s Salt Solution
TX	Thromboxan (z.B. TXA)
U	Unit
u.a.	unter anderem
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vWF	von-Willebrand-Faktor
WP	washed platelets/gewaschene Thrombozyten
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Modell der p38 MAP Kinase-Aktivierung durch Thrombin	8
Abb. 2	Modell der ERK2-Aktivierung durch Kollagen	9
Abb. 3	Modell der ERK2-Aktivierung durch Thrombin	11
Abb. 4	Schematische Darstellung des 26S Proteasoms	13
Abb. 5	Schematische Darstellung der Funktionsweise des Ubiquitin-Proteasom-Systems	15
Abb. 6	Schematische Darstellung der Zielsetzung dieser Arbeit	23
Abb. 7	Workflow für die Viabilitätsmessung mittels VisionBlue Quick Cell Viability Kit	34
Abb. 8	Einfluss von BO auf die Viabilität von unstimulierten WP	40
Abb. 9	Einfluss von Bortezomib auf die Aggregation von unstimulierten WP	42
Abb. 10	Einfluss von Bortezomib auf die mit 5 µg/ml Kollagen induzierte Aggregation	43
Abb. 11	Einfluss von Bortezomib auf die mit 10 µM TRAP-6 induzierte Aggregation	44
Abb. 12	Phosphorylierung der p38 MAP Kinase in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen	46
Abb. 13	Phosphorylierung der ERK1/2 in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen	48
Abb. 14	Phosphorylierung von Akt/PKB in WP nach Inkubation mit verschiedenen BO-Konzentrationen	50
Abb. 15	Schematische Darstellung der Zusammenfassung dieser Arbeit	63

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Für den Western Blot verwendete Primär- und Sekundärantikörper	27
Tab. 2	Bortezomibverdünnungsreihe.....	33
Tab. 3	Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.....	37
Tab. 4	Übersicht über Studien zur Aggregationsfähigkeit unter Proteasomhemmung	57

IV Danksagung

Last but not least bedanke ich mich bei allen, die mir bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen haben.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Professor Dr. med. Böck, der als Direktor des Institutes für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie mir die Möglichkeit gab, zu forschen und diese Promotionsarbeit zu erstellen.

Herzlichen Dank an PD Dr. med. Jürgen Kößler, der mir während der Promotionsarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Vielen Dank an PD Dr. Anna Kobsar, die mir vom Pipettieren bis zur Gestaltung der Experimente alles erklärte. Und auch bei der statistischen Auswertung war sie eine große Hilfe.

Herzlichen Dank an Katja Weber, die mich technisch und auch emotional im Labor unterstützt hat.

Vielen lieben Dank an alle Mitarbeiter/innen des Institutes, die nicht nur meine Proben gewonnen haben, sondern mich während meiner Famulatur und der Promotion begleitet haben.

Vielen lieben Dank an meine Familie, die mich auf dem Entstehungsweg dieser Arbeit begleitet hat, nie den Glauben an mich verloren und mich stets ermutigt habt.

Patrick und Julia, euch danke ich von Herzen, dass ihr mich durch die Höhen und Tiefen dieses Projektes begleitet habt. Euch habe ich dieses Werk zu verdanken.

V Persönliche Publikation

Koessler, J., Schuepferling, A., Klingler, P., Koessler, A., Weber, K., Boeck, M. and Kobsar, A. (2019). "The role of proteasome activity for activating and inhibitory signalling in human platelets." Cell Signal 62: 109351.