

# The entanglement of thrombus formation: systems biology as a novel key

Citation for published version (APA):

de Witt, S. M. (2014). *The entanglement of thrombus formation: systems biology as a novel key*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20141127sw>

## Document status and date:

Published: 01/01/2014

## DOI:

[10.26481/dis.20141127sw](https://doi.org/10.26481/dis.20141127sw)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Samenvatting

Bloedplaatjes spelen een cruciale rol bij de trombose en hemostase. Als de kleinste cellen in het bloed, helpen bloedplaatjes bij de stelping van bloedingen als gevolg van beschadiging van een bloedvat. In geval van ziekte zorgen bloedplaatjes voor trombusvorming, bijvoorbeeld door ruptuur van een atherosclerotische plaque, met als gevolg afsluiting van het bloedvat en een hartinfarct of beroerte. Trombusvorming is een dynamisch proces dat bepaald wordt door adhesie, activatie, secretie, aggregatie en contractie van bloedplaatjes. Daarnaast spelen ook componenten van het bloedplasma (zoals stollingsfactoren) en componenten van de bloedvatwand een modulerende rol bij de vorming van een trombus. In deze thesis is gebruik gemaakt van nieuwe analysetechnieken, ontwikkeld vanuit de systeembioïogie, om het veelzijdige proces van trombusvorming beter te kunnen begrijpen. **Hoofdstuk 1** geeft relevante achtergrondinformatie over het proces van bloedplaatjesactivatie en trombusvorming. Het klassieke model van trombusvorming gaat uit van bloedplaatjes interactie met collageen. Uit de literatuur van de laatste jaren is echter gebleken, dat ook andere adhesieve substraten in de vaatwand een rol kunnen spelen in de trombusvorming. Echter, hier is nog maar weinig over bekend. Verder is het onduidelijk in hoeverre eiwitten, die vrijgemaakt worden uit de opslaggranulae van bloedplaatjes, zoals von Willebrand factor (vWF) en trombospondine-1, kunnen bijdragen aan het proces van trombusvorming. Het eerste hoofdstuk beschrijft verder het gebruik van de flowkamer voor het meten van trombusvorming in geïsoleerd bloed. Tenslotte worden enige principes van systeembioïogische analysetechnieken geïntroduceerd.

In-huis ontwikkelde en commercieel verkrijgbare parallel-plaat flowkamers worden meer en meer gebruikt voor het bestuderen van het proces van trombusvorming en bloedplaatjesactivatie in bloed onder gedefinieerde stromingscondities. **Hoofdstuk 2** beschrijft de vooruitgang die gemaakt is in de ontwikkeling van flowkamers, met name van de zogenaamde *microfluidic devices* gemaakt van polydimethylsiloxaan, waarmee met kleine bloedsamples gewerkt kan worden. Deze techniek maakt het mogelijk om sneller en efficiënter te testen. Echter de veelvormigheid van *microfluidic devices* - ongeveer elk laboratorium heeft zijn eigen flowkamer - maakt het lastig om de techniek te standaardiseren, waarmee deze volbloedtest nog maar zelden preklinisch ingezet wordt. Aspecten waar standaardisatie gewenst is, zijn onder meer de stromingscondities van het bloed, het adhesieve oppervlak voor bloedplaatjes en de manier van analyse van de vele testuitkomsten, waaronder microscopische beeldjes.

Voor het gebruik van de conventionele Maastricht flowkamer, waarmee het grootste deel van het onderzoek beschreven in deze thesis is uitgevoerd, zijn in **hoofdstuk 3** een aantal gestandaardiseerde protocollen beschreven. Dit betreft de uitvoering van een multiparameter volbloedtest voor het bepalen van de trombusvorming op verschillende soorten oppervlakken. Protocollen zijn opgesteld voor het coaten van plaatjesadhesieve oppervlakken, de manier van bloedafname, de experimentele opzet, en de wijze van beeldanalyse. Bijgevoegd is ook een actielijst met wat te doen bij technische problemen. Verder beschreven zijn het gebruik van verschillende (confocale) fluorescentiemicroscopen, evenals methoden voor het opnemen van witlicht- en fluorescentiebeeldjes. Uitkomstmaten van deze microscopiebeelden zijn de mate van stabiele adhesie van bloedplaatjes en eindpuntparameters, zoals de morfologische score, de

grootte van een trombus en de depositie van bloedplaatjes. Andere uitkomstmaten geven informatie over de mate van bloedplaatjesactivatie, te weten granulaire secretie, fibrinogeenbinding en procoagulante activiteit. Tenslotte zijn enige details vermeld van software-toepassingen en protocollen voor beeldverwerking.

In het klassieke model van trombusvorming op collageen zijn slechts een beperkt aantal bloedplaatjesreceptoren actief. Bij arteriële stromingscondities (hoge afschuifsnelheden) vindt initiële bloedplaatjesadhesie plaats via glycoproteïne Ib-V-IX (GPIb) met vWF, dat gebonden is aan collageen. De bloedplaatjes worden vervolgens geactiveerd door samenspel van de twee collageenreceptoren glycoproteïne VI (GPVI) en integrine  $\alpha_2\beta_1$ . Aggregatie van bloedplaatjes vanuit het bloed vindt plaats via de fibrinogeenreceptor integrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . Bloedplaatjes hebben echter ook verschillende andere receptoren die een rol kunnen spelen bij de trombusvorming. **Hoofdstuk 4** beschrijft de ontwikkeling van een multiparameter volbloedtest, waarbij de trombusvorming gemeten wordt op meerdere adhesieve oppervlakken, die tezamen alle belangrijke bloedplaatjesreceptoren omvatten. Deze test is uitgevoerd met bloedmonsters van gezonde vrijwilligers en van een aantal patiënten met een zeldzame bloedingsziekte. In totaal zijn 52 adhesieve oppervlakken (met bekende receptorinteracties) met elkaar vergeleken, en daarnaast acht uitkomst-parameters, representatief voor verschillende fasen van trombusvorming. Vervolgens hebben we bekende systeembioïologische technieken gehanteerd om patronen te ontdekken in de trombusvorming voor de verschillende uitkomst-parameters en de soorten van oppervlak.

Clusteranalyse leidde tot een driedeling van de oppervlakken, elk resulterend in een bepaald type van trombus. Oppervlakken waarop type I trombi gevormd werden, lieten alleen adhesie zien van losse bloedplaatjes. Type II trombi werden gevormd op oppervlakken, die meestal bestonden uit vWF in combinatie met een ander eiwit; dit resulteerde in de depositie van vele losse bloedplaatjes of van kleine aggregaten met beperkte plaatjesactivatie. Type III trombi werden gevormd op oppervlakken met bepaalde combinaties van eiwitten; deze gaven grote aggregaten bestaande uit sterk geactiveerde bloedplaatjes. Componentanalyse stelde ons in staat om een schatting te maken van de relatieve bijdrage van de afzonderlijke bloedplaatjesreceptoren aan de vorming van een type III trombus. In afnemende volgorde was deze: GPVI, CLEC-2 > GPIb >  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$  >  $\alpha_2\beta_1$ . Bij arteriële stromingscondities (hoge afschuifsnelheden) was de bijdrage van de receptoren CD36,  $\alpha_v\beta_3$  en  $\alpha_5\beta_1$  verwaarloosbaar klein.

Regressie-analyse leerde dat alle acht parameters bijdroegen aan de groepering in type I-III trombi, althans bij gezonde proefpersonen. Zes van deze parameters bleken voldoende voor een volledige kwantificering van dit proces. Op basis van deze analyse zijn negen van de meest relevante oppervlakken (met gecoat vWF) geselecteerd voor de bepaling van referentiewaarden betreffende zes parameters. Bloedsamples van verschillende patiënten met zeldzame plaatjesgebonden bloedingsaandoeningen werden geanalyseerd op trombusvorming en vergeleken met de controle-data. Zogenaemde *heatmaps* werden gemaakt voor elk van de patiënten, om inzicht te krijgen in het patroon van afwijkingen per oppervlak en parameter. Bij alle patiëntenmonsters waren er veranderingen in trombusvorming op oppervlakken voor GPIb-adhesie (vWF) in combinatie met CLEC, GPVI en/of  $\alpha_2\beta_1$ . Met name parameters van secretie waren verlaagd in bloed van patiënten met partieel granulaire defecten. Anderszins waren

parameters van bloedplaatjesaggregatie verlaagd in bloed van een patiënt met integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  deficiëntie en een patiënt met een myosine-celskelet defect. De *heatmap* van een patiënt met gecombineerd immuundeficiëntie-syndroom toonde daarentegen een toename in sommige activatie-parameters. Samengevat laten deze bevindingen zien dat de *fingerprints*, verkregen door multiparameter en multi-oppervlakmetingen van trombusvorming, waardevol kunnen zijn bij het klinisch voorspellen van een trombotische of bloedingsneiging.

In **hoofdstuk 4** is tevens beschreven dat combinaties van oppervlakken met daarin vWF een sterkere trombusvorming laten zien bij hoge afschuifsnelheden dan bij lage afschuifsnelheden. Dit is in overeenstemming met berekeningen dat GPIb een grote bijdrage levert tot de vorming van type III trombi, doch alleen bij hoge afschuifsnelheden. Daarmee hebben we kunnen aantonen de vWF-GPIb interactie de meest belangrijke is voor bloedplaatjesadhesie en trombusvorming onder arteriële stromingscondities.

Het eiwit vWF komt voor als zeer grote multimeren in de Weibel-Palade lichaampjes van endotheelcellen en in de  $\alpha$ -granulae van bloedplaatjes. Na vrijzetting in de bloedstroom knipt het matrixmetalloprotease ADAMTS-13 deze grote multimeren in kleinere en daarmee minder actieve multimeren. Deze proteolyse gebeurt op asymmetrische wijze, wat resulteert in zogenaamde tripletvormen van vWF multimeren met kleine verschillen in molecuulgewicht. De grotere tripletvormen hebben een langere *N*-terminale zijde met daarin een extra GPIb-bindingsplaats. In **hoofdstuk 5** zijn twee vWF-preparaten die verschilden in samenstelling van tripletten, en die functioneel zijn gekarakteriseerd. Uitvoerige analyse toonde aan dat het vWF-preparaat met extra *N*-terminus een hogere bindingsaffiniteit voor GPIb had dan het andere preparaat. Verhoogde plaatjesadhesieve werking het eerste preparaat werd bevestigd middels flowkamerexperimenten over collageen onder arteriële stromingscondities, evenals met bloed van patiënten met de ziekte van von Willebrand. Met deze resultaten tonen we aan dat een veranderde tripletsamenstelling, zoals soms aanwezig in deze patiënten, kan resulteren in veranderde bloedplaatjesadhesie onder stromingscondities.

Het glycoproteïne CD36 wordt gezien als dé receptor van een eiwit dat sterk tot expressie komt in de  $\alpha$ -granulae van bloedplaatjes, namelijk trombospondine-1 (TSP1). De precieze rol van CD36 en TSP1 bij de trombusvorming onder stromingscondities is echter onduidelijk. **Hoofdstuk 6** beschrijft experimenten om hierin opheldering te brengen, gebruik makend van bloed van muizen met een deficiëntie in ofwel CD36 ofwel TSP1. Aangetoond is dat het secretieproduct van normale bloedplaatjes, maar niet van bloedplaatjes zonder TSP1, de adhesie en fosfatidylserine-expressie verhoogt van bloedplaatjes mits deze ook CD36 bevatten. Bovendien verhoogde het secretieproduct van normale bloedplaatjes de collageengestimuleerde integrine-activatie en fosfatidylserine-expositie tijdens de trombusvorming onder stromingscondities. In overeenstemming hiermee bleken er *in vivo* minder stabiele trombi gevormd te worden met meer embolisatie in muizen met een CD36-deficiëntie. Tesamen duiden deze resultaten op een verankerende rol van plaatjesgesecreteerd TSP1 via CD36 bij de adhesie van bloedplaatjes en de collageenafhankelijke trombusstabilisatie. Daarmee wordt de TSP1-CD36 interactie gezien als een volgende bloedplaatjes ligand-receptor as, die kan bijdragen tot de stabiliteit van een trombus.

**Hoofdstuk 7** beoogt meer inzicht te geven in de rol van bloedplaatjes bij de bloedstolling. Op basis van analyse van gepubliceerde studies, uitgevoerd met genetisch gemodificeerde muizen en met farmacologische remmers, laten we zien dat de fosfatidylserine-expositie van bloedplaatjes gestimuleerd met collageen gereguleerd wordt door een veelvoud aan signaleringseiwitten en membraanreceptoren, merendeels direct of indirect betrokken bij de calciumsignaalgeneratie. Verder blijken ook regulerende eiwitten van de secretie van  $\alpha$ - and  $\delta$ -granulae alsmede diverse granulaire eiwitten van belang te zijn voor de fosfatidylserine-expositie. Het fosfatidylserine-exponerend membraan biedt een functioneel oppervlak voor trombine- en fibrinevorming, en daarmee voor de fibrine-afhankelijke retractie van een trombus. Onze data-analyse toont verder een opmerkelijke overeenkomst tussen de plaatjeseiwitten betrokken bij ogenschijnlijk zo uiteenlopende processen als stolselretractie, integrine-signalering, vorming van homotypische plaatjes-plaatjes interacties en actine-celskelet organisatie. Samengevat laat deze *review* zien dat, bij de collageen-adhesie van bloedplaatjes, ten dele gemeenschappelijke signaleringseiwitten en gezamenlijke activeringpaden zorgen voor de drie kenmerken van de bloedplaatjesafhankelijke stolling, te weten fosfatidylserine-expositie, vorming van trombine en fibrine, en retractie van het stolsel.

Een uitgebreid overzicht over muizenstudies is opgenomen in **hoofdstuk 8**. Uitgewerkt hierin is een meta-analyse van gepubliceerde effecten van genetische modificatie op arteriële trombusvorming *in vivo* en *in vitro*, dit in vergelijking met effecten op de staartbloeding. In deze meta-analyse zijn 1080 studies opgenomen, resulterend in een database van 315 muizengenen, die onderzocht zijn op een rol in arteriële trombose en/of hemostase. Gebruik makend van een gecalibreerde driepunts- en vijfpuntsschaal, hebben wij de effecten van genetische modificatie zo goed en volledig mogelijk in kaart gebracht. Daarbij blijkt dat de manier van vasculaire beschadiging een sterker variante parameter is voor het gen-effect op de trombusvorming dan het vaatbed van beschadiging. Verder vinden wij een sterke correlatie tussen de uitkomst van *in vivo* trombosestudies en die van *in vitro* studies met flowkamers, met name bij de collageen-afhankelijke trombosemodellen. De scores laten verder zien dat er in totaal 44 genen zijn, waarbij een positieve bijdrage aan de trombusvorming niet gepaard gaat met een veranderde staartbloeding. Door gebruik te maken van systeembioologische technieken konden wij een netwerk construeren van overeenkomstige humane genen, met daarin diverse nieuwe genen en eiwitten die een doel kunnen zijn voor antitrombotische therapie. Deze meta-analyse bevestigt de hoge mate van homologie tussen muis en mens van de processen en eiwitten betrokken bij de trombusvorming. Verder kan deze systematische vergelijking van *in vivo* en *in vitro* studies bijdragen tot de 3V alternatieven van proefdieronderzoek (vervanging, vermindering, verfijning).

In het afsluitend **hoofdstuk 9** zijn de meest belangrijke bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd in het licht van de huidige literatuur en de mogelijke klinische relevantie. Toegelicht wordt hoe zowel de muizenstudies als de toegepaste systeembioologische analysemethoden meer inzicht bieden in de complexiteit van de trombusvorming.