

# High throughput assessment of platelet signaling, function and inhibition

Citation for published version (APA):

Fernández de la Fuente, D. I. (2023). *High throughput assessment of platelet signaling, function and inhibition*. [Doctoral Thesis, Maastricht University, Universidade of Santiago de Compostela]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20230623df>

## Document status and date:

Published: 01/01/2023

## DOI:

[10.26481/dis.20230623df](https://doi.org/10.26481/dis.20230623df)

## 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.

## **Summary**

Platelets are major contributors in the development of an arterial thrombotic event, and accordingly, antiplatelet drugs form the main therapy against secondary thrombosis. However, current therapies are not fully protective, and a significant number of treated patients develop sub-clinically or clinically relevant bleeding. Therefore, new agents for antithrombotic therapy are needed to target thrombosis whilst preserving hemostasis more effectively. Alternatively, quantitative or qualitative platelet disorders can also result in bleeding episodes of variable severity. Diagnosis of these defects is still difficult due to the limitations of the current platelet function tests. This thesis aimed to use recent high-throughput platelet function assays for the screening and testing of novel antiplatelet compounds and to provide possibilities for improvements in the diagnosis of patients with a hemostatic defect.

**Chapter 1** provides background information on the mechanisms of platelet activation and thrombus formation, emphasizing how current clinically used drugs target these processes. In addition, this chapter describes how microfluidic chambers can be employed to improve the clinical phenotyping and diagnosis of platelet function disorders. Moreover, general information on the use of ultrahigh throughput (UHT) screening methods for drug development is provided. In **Chapter 2**, a detailed literature-based review is given, describing the mechanisms of platelet  $\text{Ca}^{2+}$  signaling induced by G-protein coupled receptors (GPCR) such as for thrombin (via phospholipase  $\text{C}\beta$ ,  $\text{PLC}\beta$ ) and by ITAM-linked receptors such as for collagen (via  $\text{PLC}\gamma 2$ ). Moreover, it features the synergy when both types of receptors are stimulated in terms of supramaximal cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels. This condition triggers the phospholipid scramblase anoctamin-6, thus causing a phenotypic switch from aggregatory to procoagulant platelets. Given the different kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  rises in response to GPCR or ITAM receptors, we conclude that a platelet  $\text{Ca}^{2+}$  flux assay can help to find new platelet inhibitors with a discriminative mode of action.

Protein tyrosine kinase Syk is crucial in the collagen- and glycoprotein (GPVI)-induced signaling pathway, and its activation through phosphorylation, leads to the elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  in platelets. In **Chapter 3**, we studied how several vascular-derived collagens and collagen-related peptides (CPR) were able to trigger this pathway using the Syk inhibitor PRT-060318. We found that especially CRP forms with a GPO motif were strong, Syk-dependent stimuli for platelet responses, such as elevated cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  and accumulation of platelets in a thrombus under flow conditions. However, also weaker CRP forms with a GPP-motif led to (low) thrombus formation through Syk activation. In both assay types, fibrillar collagens were weak activators of platelets in a Syk-dependent way, with the exception of the stronger activating (fibrillar) Horm-type collagen, used as a standard in the diagnostic laboratory in platelet function tests. Together, our results underline the importance of a fibrillar structure of collagens for GPVI- and Syk-dependent platelet activation. This work also shows that immobilized collagens are more effective in the activation of platelets than suspended collagens.

Calcium signaling is a node in platelet responses, and the automated measurement

of this process can reveal drug-induced platelet defects. In **Chapter 4**, we used Calcium-6 loaded platelets for the development of a UHT assay based on the  $\text{Ca}^{2+}$  rises in response to CRP (GPVI agonist) or thrombin (GPCR agonist), which could be performed in 96-, 384- and 1536-well plates. The method showed a different curve shape with CRP (delayed and prolonged) or thrombin (fast and transient), even in the miniature, 1536-well plate. A set of quantitative parameters described the  $\text{Ca}^{2+}$  response in depth. Validation of the assay was done using a robustness compound library and by a small panel of clinically relevant platelet inhibitors. The findings of this chapter presented proof-of-principle evidence that the platelet  $\text{Ca}^{2+}$  responses can be used for the screening to find new inhibitors in a UHT manner.

In **Chapter 5**, the UHT assay was subsequently used to conduct a screening for antiplatelet compounds with 16,635 small molecules. This included 1280 small organic compounds from the clinically approved Prestwick chemical library, and further a diversity-based (SPCA) compound library of 15,355 small molecules with drug-compatible physicochemical characteristics. Using an adapted algorithm of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  curve profiling, we automatically examined the effects of all compounds on the  $\text{Ca}^{2+}$  responses of CRP- or thrombin-activated platelets loaded with Calcium-6. By filtering for Z-score effects, potential toxicity, expected unfavorable pharmacokinetics, and specific agonist inhibition, we obtained 13 compounds negatively affecting the CRP-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -response and 9 compounds interfering with the thrombin-induced  $\text{Ca}^{2+}$ -response. After additional confirmation measurements, we obtained three hits, *i.e.* AF299 and ethopropazine (specifically inhibitory with CRP) and ANO61 (inhibitory with thrombin). All three hit compounds also selectively inhibited platelet aggregation. Dose-response studies indicated that the phenothiazine compound, ethopropazine, was most effective in the presence of plasma and suppressed collagen-induced thrombus growth under flow conditions. The inhibitory characteristics of these hits need to be improved by structure-activity relationship studies.

Part of the patients with Noonan syndrome present with bleeding symptoms, which are linked to mutations in the *PTPN11* gene, encoding for the tyrosine phosphatase SHP2. The drug SHP099 is an allosteric inhibitor of SHP2, derivatives of which are being tested in clinical trials to treat solid tumors. In platelets, SHP2 is considered as a negative regulator of GPVI signaling. In **Chapter 6**, we studied to which extent SHP2 inhibition by SHP099 can improve platelet functions, such as in collagen-dependent thrombus formation under flow. We found that the treatment with SHP099 resulted in an increased integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  activation and thrombus buildup. These effects were also observed under coagulating conditions. When examining the thrombus formation process with blood from six Noonan patients (with confirmed *PTPN11* mutations), we found that the collagen-induced thrombus formation was moderately impaired. Treatment with SHP099 increased the thrombus size, pointing to the ability of an SHP2-directed drug to restore Noonan-linked impairments of platelet responsiveness.

The binding of von Willebrand factor (VWF) to platelet glycoprotein  $\text{Ib}\alpha$  ( $\text{GPIb}\alpha$ )

is one of the initial stages of thrombus formation under shear, and interference with this binding is expected to be beneficial for patients with immune-mediated thrombotic thrombocytopenic purpura (iTTP). In **Chapter 7**, we used *in silico* designed and chemically synthesized peptides, which were constructed to interfere with the interaction of the VWF A1 domain with GPIb $\alpha$ . Molecular dynamic simulations resulted after selection into two cyclic peptides, *i.e.* mono-ORbIT (26 amino acids) and bi-ORbIT (36 amino acids). Both peptides interfered with the ristocetin- or botrocetin-induced VWF binding to platelets, although the inhibition was weaker than with an antibody directed against the VWF A1 domain. After a second design round, an improved *opt*-mono-ORbIT (28 amino acids) was tested, which performed better in suppressing thrombus formation, but still not to the extent seen with the antibody. Thus, we concluded that the structure-based design of peptides has good potential in affecting VWF-dependent platelet aggregation.

Diagnosis of patients with platelet-related bleeding symptoms is difficult, given the limitations of standard platelet function tests. In **Chapter 8** we used a multiparameter microfluidic assay to aid in the phenotyping of several patients and family members with genetically linked disorders, *i.e.* CalDAG-GEFI deficiency, storage pool disease, Hermansky-Pudlak syndrome or P2Y<sub>12</sub> receptor deficiency. Molecular genetic analysis identified novel pathogenetic mutations of the genes *RASGRP2* (encoding for CalDAG-GEFI) and *P2RY12* (P2Y<sub>12</sub> receptor), and confirmed mutations of the Hermansky-Pudlak genes *HPS1* and *HPS3*. Using the multiparameter assay, providing 48 parameters, the overall pattern of whole-blood thrombus formation was different for the majority of symptomatic patients, but not for their unaffected family members. These findings were combined with diagnostic platelet phenotyping data (light transmission aggregometry and flow cytometry) and hematological values by using k-means cluster analysis. This separated the healthy control subjects plus the (heterozygous) non-affected relatives from the large majority of symptomatic patients. All in all, this indicated that the multiparameter assessment of whole-blood thrombus formation can have an important role in the recognition of genetically linked platelet function disorders.

The conclusive **Chapter 9** discusses the most important findings of my thesis in relation to the current literature. The advantages and disadvantages of the applied UHT methods - well plates and microfluidic assays - are discussed, as well as the possibility of using bioinformatic tools to assess platelet inhibition or dysfunction in the clinic.

## **Resumen**

Las plaquetas contribuyen en gran medida al desarrollo de trombos arteriales. Por ello, los antiagregantes plaquetarios constituyen el principal tratamiento para prevenir un nuevo evento trombótico. Sin embargo, como el uso de los antiagregantes plaquetarios está condicionado por el riesgo de sangrado y hay un número significativo de pacientes que desarrolla hemorragias subclínicas o clínicamente relevantes, se necesitan fármacos antitrombóticos más eficaces que no desregulen los procesos hemostáticos. Por otra parte, los trastornos plaquetarios tanto cuantitativos como cualitativos también pueden dar lugar a episodios hemorrágicos de gravedad variable, aunque de difícil diagnóstico por las limitaciones de las pruebas de función plaquetaria. El objetivo de esta tesis fue utilizar ensayos recientes de alto rendimiento de la función plaquetaria para el cribado y ensayo de nuevos compuestos antiplaquetarios, y ofrecer posibilidades de mejora del diagnóstico de pacientes con un defecto hemostático.

El **Capítulo 1** aporta información sobre los mecanismos de activación plaquetaria y formación de trombos, haciendo hincapié en cómo los fármacos de uso clínico actual se dirigen a estos procesos. Este capítulo también describe como pueden emplearse las cámaras de microfluídica para mejorar el fenotipado clínico y el diagnóstico de los trastornos de la función plaquetaria. Además, se ofrece información general sobre el uso de métodos de cribado de ultra alto rendimiento (UHT, del inglés, *ultra high throughput*) para el descubrimiento de fármacos. En el **Capítulo 2**, se ofrece una revisión detallada basada en la literatura, donde se describen los mecanismos de señalización plaquetaria mediados por calcio citosólico ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que pueden estar inducidos por receptores acoplados a proteínas G (GPCR) como por la trombina (vía fosfolipasa  $\text{C}\beta$ ,  $\text{PLC}\beta$ ) y por receptores vinculados a ITAM como por el colágeno (vía  $\text{PLC}\gamma 2$ ). Al mismo tiempo se destaca la sinergia cuando tanto los receptores GPCRs y los ITAM son estimulados y causan niveles supra-máximos de  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta condición desencadena la actividad fosfolipídica de la anoctamina-6, provocando así un cambio fenotípico de plaquetas con función agregante a plaquetas procoagulantes. Dada la diferente cinética de las elevaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a receptores GPCR o ITAM, concluimos que un ensayo de flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  plaquetario puede ayudar a encontrar nuevos inhibidores plaquetarios con un modo de acción distintivo.

La proteína tirosina quinasa Syk es crucial en la vía de señalización inducida por el colágeno y su receptor la glicoproteína VI (GPVI). La activación de esta vía mediante una cascada de fosforilación conduce a la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  en las plaquetas. En el **Capítulo 3**, estudiamos como varios tipos de colágenos y péptidos relacionados con el colágeno (CRP, del inglés *collagen-related peptide*) de origen vascular eran capaces de desencadenar esta vía utilizando el inhibidor de Syk, PRT-060318. Descubrimos que principalmente las formas de CRP con un motivo GPO proporcionaron estímulos fuertes dependientes de Syk para las respuestas plaquetarias, como la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  y la acumulación de plaquetas en un trombo en condiciones de flujo. Sin embargo, también formas más débiles de CRP con un motivo GPP condujeron a la formación reducida de trombos a través de la activación de Syk. En ambos tipos de ensayo, los colágenos fibrilares fueron activadores débiles de las plaquetas

de forma dependiente de Syk, con la excepción de la mayor activación por el colágeno (fibrilar) tipo Horm, utilizado como agonista estándar en las pruebas de diagnóstico de función plaquetaria. En conjunto, estos resultados recalcan la importancia de la estructura fibrilar de los colágenos para la activación plaquetaria dependiente de GPVI y Syk. Este trabajo también demuestra que los diferentes tipos de colágenos inmovilizados son más eficaces en la activación de las plaquetas que cuando se usan en suspensión.

La señalización del calcio es central en la respuesta plaquetaria y la medición automatizada de este proceso tiene la capacidad de revelar defectos plaquetarios inducidos por fármacos. En el **Capítulo 4**, se utilizaron plaquetas cargadas con el marcador fluorescente, Calcium-6, para el desarrollo de un ensayo de alto rendimiento basado en las subidas de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta a CRP (agonista del receptor GPVI) o a la trombina (agonista de receptores GPCR), en placas de 96, 384 y 1536 pocillos. El método mostró un tipo de curva diferente con CRP (retardada y prolongada) que con trombina (rápida y transitoria), incluso en la placa miniaturizada de 1536 pocillos. Usando un conjunto de parámetros cuantitativos se pudo describir la respuesta del  $\text{Ca}^{2+}$  en detalle. La validación del ensayo se realizó mediante una biblioteca de compuestos robustos y mediante un panel pequeño de inhibidores plaquetarios clínicamente relevantes. Los hallazgos de este capítulo indican que las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  de las plaquetas pueden utilizarse para el cribado de compuestos de alto rendimiento con el fin de encontrar nuevos inhibidores plaquetarios.

En el **Capítulo 5**, el ensayo de medición de calcio de alto rendimiento se utilizó para realizar un cribado de compuestos antiplaquetarios con 16635 pequeñas moléculas. Esto incluyó 1280 compuestos orgánicos pequeños de la biblioteca química Prestwick, clínicamente aprobada junto con una biblioteca con diversidad de estructuras químicas (SPCA) que contiene 15355 moléculas pequeñas con características fisicoquímicas compatibles con la generación de fármacos. Utilizando un algoritmo para caracterizar las curvas de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , se examinaron automáticamente los efectos de todos los compuestos sobre las respuestas de  $\text{Ca}^{2+}$  de plaquetas cargadas con Calcium-6 y posteriormente activadas con CRP o trombina. Al filtrar por el efecto del Z-score, la toxicidad y farmacocinética potencialmente desfavorable y la inhibición específica de un agonista, obtuvimos 13 compuestos que afectaban negativamente a la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por CRP y 9 compuestos que interferían con la respuesta de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por trombina. Tras realizar ensayos de confirmación adicionales, se obtuvieron tres compuestos, esto es, AF299 y etopropazina (inhibidores específicos de la vía activada por CRP) y ANO61 (inhibidor de la vía activada con trombina). Los tres compuestos también inhibieron selectivamente la agregación plaquetaria. Los estudios dosis-respuesta indicaron que la fenotiazina, etopropazina, era la más eficaz en presencia de plasma y suprimía el crecimiento del trombo inducido por colágeno en condiciones de flujo. Sin embargo, las características inhibitorias de estos compuestos deben mejorarse mediante estudios de relación estructura-función.

Parte de los pacientes con síndrome de Noonan presentan síntomas hemorrágicos,



vinculados a mutaciones en el gen *PTPN11*, que codifica la tirosina fosfatasa SHP2. El fármaco SHP099 es un inhibidor alostérico de la SHP2, cuyos derivados se están probando en ensayos clínicos para tratar tumores sólidos. En las plaquetas, SHP2 se considera un regulador negativo de la señalización de GPVI. En el **Capítulo 6**, se estudió hasta qué punto la inhibición de SHP2 mediante SHP099 puede mejorar las funciones plaquetarias, usando, entre otros, ensayos microfluídicos de formación de trombos dependientes de colágeno. Descubrimos que el tratamiento con SHP099 producía un aumento de la activación de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  y del volumen del trombo. Resultados similares se observaron en condiciones de coagulación. Al examinar el proceso de formación de trombos con sangre de seis pacientes con síndrome de Noonan (con mutaciones confirmadas en el gen *PTPN11*), descubrimos que la formación de trombos inducida por colágeno estaba moderadamente alterada. El tratamiento con SHP099 aumentó el tamaño del trombo, lo que indica que fármacos dirigidos a SHP2 podrían utilizarse para restaurar las alteraciones de la capacidad de respuesta plaquetaria vinculadas a pacientes con síndrome de Noonan.

La unión del factor von Willebrand (VWF) a la glicoproteína  $\text{Ib}\alpha$  ( $\text{GPIb}\alpha$ ) es una de las etapas iniciales de la formación de trombos en condiciones de flujo y se presume que interferir con esta unión es beneficioso para los pacientes que sufren de púrpura trombocitopénica inmunitaria (iTTP, del inglés *immune thrombocytopenic purpura*). En el **Capítulo 7**, se diseñaron péptidos cíclicos *in silico* para interferir con la interacción del dominio A1 de VWF con la  $\text{GPIb}\alpha$ . Las simulaciones de dinámica molecular resultaron en la selección de dos péptidos, mono-ORbIT (26 aminoácidos) y bi-ORbIT (36 aminoácidos). Ambos péptidos interfirieron en la unión de VWF a las plaquetas inducida por la ristocetina o la botrocetina, aunque la inhibición fue más débil que con un anticuerpo dirigido contra el dominio A1 del VWF. Tras una segunda ronda de diseño, se evaluó un péptido mejorado denominado *opt-mono-ORbIT* (28 aminoácidos), que funcionó mejor en la supresión de la formación de trombos, pero aún no alcanzó la inhibición observada con el anticuerpo. Por todo lo anterior, el diseño de péptidos basado en la estructura de proteínas tiene un buen potencial para afectar a la agregación plaquetaria dependiente de VWF.

El diagnóstico en pacientes con síntomas hemorrágicos relacionados con las plaquetas es difícil, dadas las limitaciones de las pruebas estándar de función plaquetaria. En el **Capítulo 8**, utilizamos un ensayo de microfluídica de forma multiparamétrica para ayudar en el fenotipado de varios pacientes y familiares con trastornos relacionados genéticamente, es decir, deficiencia de CalDAG-GEFI, enfermedad de deficiencia de almacenamiento del pool plaquetario, síndrome de Hermansky-Pudlak o deficiencia del receptor  $\text{P2Y}_{12}$ . El análisis genético molecular identificó nuevas mutaciones patogénicas de los genes *RASGRP2*, que codifica para CalDAG-GEFI, y *P2RY12*, que codifica para el receptor  $\text{P2Y}_{12}$ , y confirmó mutaciones de los genes Hermansky-Pudlak *HPS1* y *HPS3*. Mediante el ensayo multiparamétrico de 48 parámetros, el patrón general de formación de trombos en sangre total fue deficiente en la mayoría de los pacientes sintomáticos, pero no en sus familiares asintomáticos. Estos resultados en combinación con datos de fenotipado plaquetario

## Chapter 10

(agregación plaquetaria y citometría de flujo) y valores hematológicos, se estudiaron usando un análisis de conglomerados *k-means*, que separaron los sujetos control y los familiares (heterocigotos) no afectados de la gran mayoría de pacientes sintomáticos. En conjunto, esto indica que la evaluación multiparamétrica de la formación de trombos en sangre total puede desempeñar un papel importante en el reconocimiento de los trastornos de la función plaquetaria relacionados genéticamente.

El **Capítulo 9** analiza los hallazgos más importantes de esta tesis en relación con la bibliografía actual. Se discuten las ventajas e inconvenientes de los métodos de alto rendimiento aplicados en esta tesis, tales como las placas de pocillos y ensayos microfluídicos, así como el posible uso de herramientas bioinformáticas para evaluar la inhibición o disfunción plaquetaria en la clínica.

