

# Dynamic regulation of thrombus stability : focus on platelet receptors and downstream signaling

## Citation for published version (APA):

Cosemans, J. M. E. M. (2009). *Dynamic regulation of thrombus stability : focus on platelet receptors and downstream signaling*. Univeritaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20090129jc>

## Document status and date:

Published: 01/01/2009

## DOI:

[10.26481/dis.20090129jc](https://doi.org/10.26481/dis.20090129jc)

## 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**

## Dynamic regulation of thrombus stability

Atherothrombosis results from rupture of an atherosclerotic plaque, by which plaque-derived constituents are exposed to the blood stream. Platelets adhere to sites of plaque rupture, become activated, and secrete secondary mediators that recruit other circulating platelets to form a multiplatelet aggregate or a thrombus. A growing thrombus can lead to occlusion at the site where the thrombus is formed, or in downstream vessels by emboli. When occlusion occurs in the heart or in the brain, this causes a myocardial infarction or stroke, respectively. Although traditional antiplatelet drugs have been shown to be effective in reducing arterial thrombosis, drawbacks are an increased risk of bleeding and/or a limited protective effect. In the past few years, research has focused both on finding ways to improve existing antiplatelet therapy, and on identifying new target platelet proteins for antithrombotic treatment. For this purpose more precise knowledge of the process of thrombus formation is required. The research described in this thesis has two main goals. The studies in the first part (**chapters 2-4**) are performed to gain a better insight into the signaling pathways that underlie the thrombogenic role of (modified) collagen that is present in or is derived from advanced atherosclerotic plaques. In the second part of this thesis (**chapters 5-7**) the goal was to find platelet receptors and signaling molecules that play a role in the stabilization of a thrombus.

In the first part of **chapter 1** the function of the two main thrombogenic components in plaques, e.g. collagen and tissue factor, is discussed. Collagen type I and III fibers provide tissue stability to both the healthy vessel wall and plaques within the vessel. However, after vessel wall damage or plaque rupture, the collagen fibers become exposed to the circulating blood and act as potent platelet agonists. Collagens in general, and plaque collagens in particular, are continuously processed by matrix metalloproteinases (MMPs). By degrading collagen, MMPs are known to influence plaque stability. Furthermore, the MMP isoforms, MMP-1, MMP-2, and MMP-9, have a direct effect on platelet activation. The literature does not explain how these apparently different functions of MMPs jointly contribute to thrombus formation under flow conditions.

In the second part of **chapter 1** an overview is given of those platelet receptors and downstream signaling pathways that are relevant for this thesis. Collagen activates platelets by interacting with the glycoprotein (GP)VI receptor. Signaling via this receptor activates amongst others the effector enzyme phospholipase C $\gamma$ 2, which results in a rise of intracellular free Ca $^{2+}$  levels, and subsequent exposure of phosphatidyl serine (PS) at the platelet surface. Second, a rise in intracellular Ca $^{2+}$ , together with activation of protein kinase C, leads to the secretion of the autocrine mediators, adenosine diphosphate (ADP), Gas6 and thromboxane A $_2$  (TxA $_2$ ). Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is a key enzyme in platelet activation, as it becomes active following signaling via GPVI, the thrombin receptors, PAR1 and PAR4, the ADP receptor, P2Y $_{12}$ , and the Gas6 receptors, Axl, Sky and Mer. One of the outcomes of PI3K signaling is activation of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, which is a key event for fibrinogen binding and platelet aggregation. While a clearer understanding about the initial events in thrombus formation is emerging,

it is poorly understood which platelet receptors and signaling molecules play a role in the later stages of this process.

In **chapter 2** the thrombogenic properties of collagen in advanced atherosclerotic plaques are compared to those of purified collagens, types I and III. Studies were performed to measure thrombus formation and procoagulant activity during high-shear perfusion of human whole blood over the collagen-containing plaque material or one of the isolated collagens. Plaque material and type I collagen (but not type III collagen) strongly stimulated platelet adhesion and thrombus formation. Blockage of GPVI with the newly developed anti-human GPVI antibody, 9O12, abolished thrombus formation and procoagulant activity, both on plaque material and isolated collagen. In comparison, blockage of the ADP receptors, P2Y<sub>1</sub> and P2Y<sub>12</sub>, was less effective. It was concluded that GPVI interaction with collagen plays a key role in the platelet-activation effect of advanced plaques, while ADP receptor signaling only has a supporting role.

Another thrombogenic component present in atherosclerotic plaques is tissue factor, which triggers the extrinsic coagulation cascade towards thrombin generation and subsequent fibrin formation. In **chapters 2 and 3**, the effect of plaque material and purified collagens on thrombin generation in platelet-containing plasma is measured by use of the thrombogram method. The amount of formed thrombin correlated well with the tissue factor concentration in the different atherosclerotic plaques. In some plaques, GPVI blockage suppressed a substantial part of the thrombin-generating effect, which indicated that the collagen within these plaques contributed to platelet activation and thrombin generation. Detailed investigations in **chapter 3** with isolated type I collagen showed that GPVI signaling to PS exposure is responsible for the stimulating effect of collagen on thrombin generation. Platelet adhesion through integrin  $\alpha_2\beta_1$  or signaling via autocrine produced ADP and TxA<sub>2</sub> facilitated and amplified the GPVI-dependent thrombin generation.

From the literature it was known that the total collagen content of a human plaque only poorly correlates with the platelet-activating potency of that plaque. An explanation for this discrepancy may be the processing of the collagens within the plaque by MMPs. Since plasma and platelets contain significant amounts of MMPs, in **chapter 4** it was investigated whether MMPs from these two sources can degrade collagen that is exposed after vessel wall damage or plaque rupture. By immunohistochemical staining, it was shown that the MMPs present in plasma as well as in platelets destroyed the normal triple helical structure of fibrillar collagen type I within a time period of several hours. Strikingly, the degraded collagen was no longer able to support platelet adhesion and activation in flow-dependent thrombus formation. Furthermore, in this chapter the effect of MMPs on platelet activation was studied. By using mice lacking one of the MMP isoforms present in platelets, MMP-2, MMP-3 or MMP-9, it was demonstrated that MMP-2 has a stimulating effect on platelet deposition and activation under high-shear flow conditions, while MMP-9 acts inhibitory. Deficiency in MMP-3 did not alter thrombus formation. Together, these results demonstrate that plasma- and platelet-derived MMP isoforms have a dual function in collagen-dependent thrombus formation. They appear to have a balancing effect on platelet adhesion to collagen and thrombus formation under

flow, and, on a longer term, they downregulate the thrombogenic property of collagen fibers by proteolytic cleavage.

To prevent occlusion of a vessel, thrombus growth needs to be confined to the site of vascular damage. In **chapter 5** it is investigated which platelet receptors and downstream signaling pathways are involved in the growth and stabilization of a thrombus. By measurements of the active conformation of integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  under both high-shear flow and static conditions, it was concluded that continuous activation of  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  is needed to keep the thrombus together. Blockage of the  $\text{P2Y}_{12}$  receptor for ADP or inhibition of PI3K led to secondary inactivation of previously active  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  and to disintegration of formed thrombi. Inhibition of  $\text{TxA}_2$  formation or the second ADP-receptor,  $\text{P2Y}_1$ , was much less effective. By using newly developed inhibitors of PI3K $\beta$  and PI3K $\gamma$  isoforms and by using mice lacking PI3K $\gamma$ , it was further demonstrated that both these PI3K isoforms are involved in the  $\text{P2Y}_{12}$ -dependent integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activation. Here, activation of PI3K $\beta$  seemed to be more important for establishing individual platelet-platelet contacts, whereas PI3K $\gamma$  was essential for maintaining the integrity of the entire aggregate. From these and other results, it was concluded that continuous signaling via the  $\text{P2Y}_{12}$  receptors through PI3K $\beta$  as well as PI3K $\gamma$  is necessary for persistent  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activation and, hence, for stable thrombus formation.

The results described in **chapter 6** indicate that also Gas6 receptor signaling contributes to  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activation. Interestingly, the contribution of Gas6 was most prominent in later phases of thrombus formation, i.e. when the availability of ADP is diminishing. From perfusion experiments with blood from mice lacking one of the Gas6 receptors, Axl, Sky, or Mer, it was concluded that all three receptors are needed for Gas6 function. In contrast to suggestions in the literature that Gas6 may not contribute to the activation of human platelets, experiments in this chapter showed that the removal of Gas6 from human plasma resulted in thrombi that were unstable (under flow conditions) and platelet aggregates that were smaller (under static conditions). Other data in this thesis and in the literature indicated that PI3K is a key component of signaling via Gas6 receptors (**chapter 6**) and the  $\text{P2Y}_{12}$  receptor (**chapter 5**). It was found that blockage of PI3K $\beta$  suppressed integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activation regardless of the presence or absence of Gas6. This implies that the Gas6 receptor signaling pathway is downstream of  $\text{P2Y}_{12}$  and that this receptor likely is a direct activator of PI3K $\beta$ .

In **chapter 7** the evidence for different and transient activation stages of integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  and  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  is discussed in depth. Platelet activation results in an activating, conformational change of  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  by inside-out signaling. In case of ADP stimulation, this activated state is a transient state and fully reversible. Active  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  binds fibrinogen, which results in outside-in activation and consolidation of the active conformation of  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . Under conditions of prolonged high  $\text{Ca}^{2+}$  levels, such as in PS-exposing platelets,  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  becomes secondarily inactivated and no longer binds fibrinogen. Integrin  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  appears to be activated by a mechanism that is directly linked to  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  activation and it can also adopt different activation states, depending on the type of platelet agonist.

In **chapter 8** the main findings presented in this thesis are discussed, as well as their possible clinical significance. It is argued that thrombus formation is not a unidirectional

sequence of events but, instead, a highly dynamic and multidirectional process. Based on this concept, a summary is given of the events that can positively or negatively regulate the overall rate and progression of thrombus build-up. Taken together, the studies in this thesis add to the current knowledge of the multiple processes in thrombus formation, which will hopefully lead to improved treatments of arterial thrombosis.



## **Samenvatting**



## Dynamische regulatie van trombusstabiliteit

Atherotrombose wordt gekarakteriseerd door het scheuren van een atherosclerotische plaque in de arteriële vaatwand, als gevolg waarvan activerende componenten van die plaque, zoals collageen en weefselfactor, aan de bloedstroom worden blootgesteld. Bloedplaatjes hechten aan een gescheurde plaque en raken daardoor geactiveerd. Geactiveerde plaatjes scheiden diverse stoffen uit, waardoor plaatjes in de circulatie worden aangetrokken en zo een plaatjesaggregaat oftewel trombus vormen. Een groeiende trombus kan leiden tot afsluiting van een bloedvat, zowel op de plaats van de ruptuur als stroomafwaarts door losgeraakte stukken van de trombus. Gebeurt dit in de hartstreek, dan leidt dit tot een hartinfarct en als het in de hersenen plaatsvindt, tot een beroerte. De huidige behandeling van arteriële trombose richt zich vooral op het remmen van de plaatjesactivering. Hoewel antiplaatjesmedicatie effectief is gebleken in het reduceren van arteriële trombose, zijn belangrijke nadelen van de huidige medicijnen aan de ene kant het niet volledige effectief zijn en aan de andere kant een verhoogd risico op bloedingen. De laatste jaren heeft het onderzoek zich gericht op het verbeteren van de medicatie tegen bekende doeleiwitten, maar ook op het identificeren van nieuwe doeleiwitten voor antiplaatjesmedicatie. Duidelijk is daarbij geworden dat er meer kennis over het ontstaan, de groei en stabilisatie van een trombus vereist is. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft een tweeledig doel. Het eerste deel (**hoofdstukken 2-4**) beoogt een beter inzicht te geven in de signaleringspaden in plaatjes, die optreden na interactie met (gemodificeerd) collageen in plaques. In het tweede deel van dit proefschrift (**hoofdstukken 5-7**) is onderzocht welke plaatjesreceptoren en signaleringsmoleculen een rol spelen bij het in stand houden oftewel de stabilisatie van een groeiende trombus.

In het inleidende **hoofdstuk 1** is allereerst ingegaan op de precieze functie van de twee belangrijkste trombogene componenten van een plaque, namelijk collageen en weefselfactor. Collageen van type I en III zorgt voor stevigheid van zowel de gezonde vaatwand als van plaques in de vaatwand. Echter bij beschadiging komen deze collagenen in contact met het stromend bloed, en worden daarmee een sterke plaatjesactivator. De collagenen in plaques zijn onderhevig aan continue afbraak door matrix metalloproteinases (MMPs). Door deze afbraak verminderen de MMPs de stabiliteit van een plaque. Daarnaast hebben specifieke MMP isovormen (namelijk MMP-1, MMP-2 en MMP-9) ook een effect op de plaatjesactivering. Echter in de literatuur wordt niet ingegaan op de bijdrage van deze ogenschijnlijk verschillende functies van MMPs aan de trombusvorming onder stromingscondities.

Ten tweede is in **hoofdstuk 1** een overzicht gegeven van bekende plaatjesreceptoren en signaleringsroutes, voor zover die relevant zijn voor dit proefschrift. Collageen activeert plaatjes door interactie met de glycoproteïne (GP)VI receptor. Signalering via deze collageenreceptor activeert onder andere het enzym fosfolipase C $\alpha$ 2, dat ervoor zorgt dat het intracellulaire calciumniveau stijgt. Een langdurig verhoogd calciumniveau resulteert in het verschijnen van stollingsactief fosfatidylserine (PS) op het plaatjesoppervlak. Daarnaast zorgt een verhoogd calciumniveau samen met proteïne kinase C ook voor de secretie van

adenosinedifosfaat (ADP), Gas6, en tromboxaan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>), die op hun beurt weer andere plaatjes kunnen activeren. Aangegeven is dat fosfoinositide 3-kinase (PI3K) een sleutelenzym is in de plaatjesactivering, aangezien het betrokken is bij de signalering door GPVI, door de trombinereceptoren, PAR1 en PAR4, de ADP-receptor, P2Y<sub>12</sub>, en de Gas6-receptoren, Axl, Sky en Mer. Het PI3K zorgt onder meer via activering van de eiwitten Akt en Rap 1b voor het actief maken van integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Via interactie van actief  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 met fibrinogeen kunnen plaatjes aan elkaar hechten, hetgeen bekend staat als plaatjesaggregatie. Hoewel er steeds meer bekend wordt over deze initiële gebeurtenissen in trombusvorming, is het onduidelijk welke plaatjesreceptoren en signaleringsmoleculen een rol spelen in de latere fasen van trombusvorming en stabilisatie.

In **hoofdstuk 2** zijn de trombogene eigenschappen van gevorderde atherosclerotische plaques vergeleken met die van gezuiverd collageen type I of III. Het trombusvormende proces is gemeten met behulp van een stromingskamer tijdens de perfusie van humaan bloed over plaquemateriaal of een oppervlak van gezuiverd collageen onder een hoge afschuifsnelheid. Gebleken is dat zowel plaquemateriaal als type I collageen (maar niet type III collageen) sterk de plaatjesadhesie en trombusvorming stimuleerde. Blokkering van de GPVI-receptor met behulp van een nieuw ontwikkeld anti-humaan GPVI antilichaam, 9O12, remde de trombusvorming op plaquemateriaal of geïsoleerd collageen volledig. Blokkering van beide ADP-receptoren P2Y<sub>1</sub> en P2Y<sub>12</sub> was daarentegen minder effectief. Samengevat is aangetoond dat de interactie van collageen met GPVI noodzakelijk is voor de vorming van een trombus op plaquemateriaal, terwijl signalering via de ADP-receptoren een ondersteunde rol heeft.

De tweede belangrijke trombogene component in plaques is weefselfactor. Deze brengt de bloedstolling op gang, waardoor trombine en fibrine gevormd worden. In **hoofdstukken 2 en 3** is met behulp van de trombogrammethode de vorming van trombine gemeten in de aanwezigheid van plaquemateriaal of geïsoleerd collageen. De weefselfactorconcentratie in de diverse atherosclerotische plaques bleek goed te correleren met de hoeveelheid gevormd trombine. Blokkering van GPVI onderdrukte een substantieel deel van de trombinegeneratie, wat aangeeft dat het collageen uit plaques een meetbare bijdrage levert aan de trombinegeneratie. Gedetailleerd onderzoek in **hoofdstuk 3**, waarbij gebruik gemaakt is van geïsoleerd type I collageen, wees uit dat signalering via GPVI resulterend in PS expositie verantwoordelijk is voor het stimulerend effect van collageen op de trombinegeneratie. Plaatjesadhesie aan integrine  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 en signalering via ADP- en TxA<sub>2</sub>-receptoren versterkten het GPVI effect.

Uit de literatuur was al bekend dat de hoeveelheid collageen in een plaque niet altijd overeenkomt met het plaatjesactiverend effect van dit collageen. Een aannemelijke verklaring hiervoor was modificatie of afbraak van het collageen in bepaalde plaques door MMPs. Aangezien ook plasma en plaatjes MMP activiteit bevatten, is in **hoofdstuk 4** onderzocht of deze MMPs in staat zijn om collageen af te breken, dat blootgelegd wordt na vaatwandschade of plaqueruptuur. Immunohistochemische kleuring toonde aan dat de MMPs aanwezig in plasma en plaatjes de normale helicale structuur van collageen type I binnen enkele uren volledig konden afbreken. Uit perfusieproeven bleek

vervolgens dat het gedegradeerde collageen niet langer in staat was plaatjes te laten hechten. Naast de collageenafbrekende eigenschappen van MMPs is in dit hoofdstuk ook het effect van MMPs op de activering van plaatjes onderzocht. Door gebruik te maken van muizen die deficiënt waren in één van de in plaatjes aanwezige MMP isovormen MMP-2, MMP-3 of MMP-9, kon aangetoond worden dat MMP-2 een stimulerend effect heeft op de plaatjesadhesie en de trombusvorming onder stromingscondities, terwijl MMP-9 juist remmend werkt. Afwezigheid van MMP-3 had geen effect op de trombusvorming. Samengevat tonen deze resultaten aan dat de MMPs uit plasma en plaatjes een tweeledige functie hebben in de trombusvorming op collageen. Initieel hebben ze een subtiel regulerend effect op de plaatjesactivering en op de lange termijn onderdrukken ze de trombogene functie van het collageen door afbraak.

Om afsluiting van een bloedvat te voorkomen, dient een trombus beperkt te blijven tot de plaats van vaatwandbeschadiging. In **hoofdstuk 5** is onderzocht welke plaatjesreceptoren en onderliggende signaleringspaden betrokken zijn bij de aangroei en de stabilisatie van een trombus. Door het bepalen van de activeringsstatus van integrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  onder stromings en statische condities, bleek dat voortdurende activering van  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  noodzakelijk was voor het in stand houden van een trombus. Remming van de  $\text{P2Y}_{12}$  ADP-receptor of van diens signalering naar PI3K zorgde ervoor dat actief  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  weer in de inactieve toestand kwam en dat gevormde trombi uit elkaar vielen. Remmen van de  $\text{TxA}_2$ -vorming of van de werking van de tweede ADP-receptor  $\text{P2Y}_1$  was veel minder effectief. Door gebruik te maken van nieuw ontwikkelde remmers tegen de isovormen  $\text{PI3K}\beta$  en  $\text{PI3K}\gamma$  en middels muizen die deficiënt waren in  $\text{PI3K}\gamma$  kon aangetoond worden dat beide PI3K typen betrokken zijn bij de  $\text{P2Y}_{12}$ -gemedieerde  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -activering. Hierin leek  $\text{PI3K}\beta$  vooral het contact tussen afzonderlijke plaatjes te beïnvloeden terwijl  $\text{PI3K}\gamma$  belangrijker was voor de integriteit van het gehele aggregaat. Uit deze resultaten is geconcludeerd dat continue signalering via de  $\text{P2Y}_{12}$ -receptoren en vervolgens via  $\text{PI3K}\beta$  en  $\text{PI3K}\gamma$  noodzakelijk is voor aanhoudende  $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -activering en daarmee voor stabiele trombusvorming.

Uit de resultaten van **hoofdstuk 6** is gebleken dat ook Gas6 receptorsignalering een bijdrage levert aan het activeren van  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  op plaatjes, echter vooral in een later stadium van de trombusvorming, wanneer de beschikbaarheid van ADP afneemt. Uit perfusieproeven met bloed van muizen die deficiënt waren in één van de Gas6-receptoren Axl, Sky of Mer, kwam naar voren dat alle drie de receptoren nodig waren voor deze functie van Gas6. In tegenstelling tot suggesties in de literatuur dat Gas6 geen rol speelt bij de activering van humane plaatjes, lieten experimenten in dit hoofdstuk zien dat het verwijderen van Gas6 uit humaan plasma ervoor zorgde dat trombi eerder uit elkaar vielen (onder stromingscondities) en dat de plaatjesaggregatie verminderde (onder statische condities). Verdere resultaten in dit proefschrift en in de literatuur tonen aan dat PI3K een centrale component is in de signalering via zowel Gas6-receptoren (**hoofdstuk 6**) als  $\text{P2Y}_{12}$  (**hoofdstuk 5**). Remming van de isovorm  $\text{PI3K}\beta$  onderdrukte de activering van integrine  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  onafhankelijk van de aanwezigheid of afwezigheid van Gas6. Dit impliceert dat het Gas6-receptor signaleringspad een afgeleide is van de  $\text{P2Y}_{12}$ -receptor signalering en dat  $\text{P2Y}_{12}$  vermoedelijk rechtstreeks  $\text{PI3K}\beta$  activeert.

In **hoofdstuk 7** is dieper ingegaan op de verschillende activeringsstadia van de integrines  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  en  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$ . Plaatjesactivering leidt door middel van 'inside-out' signalering tot een conformatieverandering en daarmee tot het actief worden van  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . In het geval van ADP-stimulatie blijkt deze activeringsstap omkeerbaar. Actief  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  bindt fibrinogeen, wat leidt tot 'outside-in' activering en daarmee tot consolidatie van de actieve conformatie van het integrine. In geval van een langdurig verhoogd calciumniveau binnen het plaatje, bijvoorbeeld na stimulatie met collageen en trombine, wordt  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  opnieuw inactief. Dit gebeurt met name in plaatjes die PS exposeren. Integrine  $\alpha\text{2}\beta\text{1}$  wordt op soortgelijke wijze geactiveerd als  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , maar kan echter verschillende activeringsconformaties aannemen, al naargelang de activator.

In **hoofdstuk 8** zijn de bevindingen van dit proefschrift bediscussieerd in de context van de literatuur en is ingegaan op de mogelijke klinische relevantie. Het is beargumenteerd dat de trombusvorming geen eenvoudige opeenvolging van gebeurtenissen is, maar een dynamisch en multidirectioneel proces. Op grond van dit concept is er een overzicht gegeven van de gebeurtenissen die op positieve of negatieve wijze de opbouw en stabiliteit van een trombus beïnvloeden. De studies in dit proefschrift beogen bij te dragen tot een beter inzicht in de vroege en late processen die plaatsvinden tijdens de trombusvorming, wat moet leiden tot verbeterde medicatie voor de behandeling van atherotrombose.