

Einfluss von Thrombozyten auf die Progression der Alzheimer Erkrankung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Lili Donner
aus Temirtau

Düsseldorf, Februar 2018

aus der Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie
(ehemals Institut für Hämostaseologie, Hämotherapie und Transfusionsmedizin) des
Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Margitta Elvers

2. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 17.04.2018

*What we know is a drop,
what we don't know is an ocean.*

Isaac Newton (1643 -1727)

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	III
SUMMARY.....	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Alzheimer Erkrankung	1
1.1.1 Neuropathologische Merkmale.....	2
1.1.2 Die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins zu A β	3
1.1.3 Amyloide Plaques und die Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese	5
1.1.4 Zerebrale Amyloidangiopathie.....	7
1.1.5 Die Rolle von Clusterin in der Alzheimer Erkrankung	8
1.2 Thrombozyten	10
1.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombozytenfunktion	10
1.2.2 Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase.....	11
1.2.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$	14
1.3 Rolle der Thrombozyten in der Alzheimer Erkrankung.....	17
1.3.1 APP und A β -Peptide in Thrombozyten	17
1.3.2 Veränderungen von Thrombozyten durch A β -Peptide	18
1.3.3 Veränderungen von Thrombozyten bei der Alzheimer Erkrankung	18
2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	20
3 ERGEBNISSE.....	21
3.1 Blood Platelets in the Progression of Alzheimer's Disease	21
3.2 Platelets contribute to amyloid-β aggregation in cerebral vessels through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$-induced outside-in signaling and clusterin release.....	22
3.3 Relevance of C-terminal residues for amyloid-β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and amyloid-β fibril formation	23
4 ALLGEMEINE DISKUSSION.....	59

5	AUSBLICK.....	67
	LITERATURVERZEICHNIS	VI
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XVIII
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	XXI
	EIGENE PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....	XXII
	DANKSAGUNG	XXIV
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	XXV

Zusammenfassung

Die Alzheimer Krankheit (AD) ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung und ist durch Ablagerungen von Amyloid- β (β) im Hirnparenchym sowie in den Gefäßwänden der zerebralen Blutgefäße, die als zerebrale Amyloidangiopathie (ZAA) bekannt ist, gekennzeichnet. ZAA liegt bei mehr als 90 % der AD Patienten vor und führt zu einer Degeneration der Gefäßwandkomponenten, reduziert den zerebralen Blutfluss und verstärkt den kognitiven Rückgang. Neben der wichtigen Funktion der Thrombozyten in der Hämostase, haben Thrombozyten eine zentrale Bedeutung im Prozess der pathologischen Thrombusbildung, die ein Risikofaktor für AD darstellt. Darüber hinaus modulieren Thrombozyten synthetisches A β 40 zu fibrillären A β Aggregaten *in vitro*. Daher war das Ziel dieser Arbeit den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus aufzudecken und die Beteiligung von Thrombozyten in der Pathogenese von AD zu untersuchen.

Die Untersuchungen dieser Arbeit identifizierten den Fibrinogenrezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ als direkten Bindungspartner von A β 40. Es wurde gezeigt, dass die Bindung von A β 40 an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ die Sekretion des Chaperonproteins Clusterin (CLU) aus Thrombozyten induziert. Zellkulturexperimente mit rekombinantem CLU- und CLU-defizienten Thrombozyten zeigten, dass CLU die Bildung fibrillärer A β -Aggregaten *in vitro* fördert. Die Analyse von Thrombozyten aus Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie, die quantitative und qualitative Defekte des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ aufwiesen, zeigte, dass der Expressionsspiegel des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Membranoberfläche die A β -induzierte CLU-Sekretion und die Bildung der A β -Aggregate bestimmt. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Adenosindiphosphat (ADP) über seine Rezeptoren die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ verstärkt. Dies führt zu einer erhöhten Sekretion von CLU sowie einer verstärkten Bindung von A β 40 an Thrombozyten.

Ergebnisse dieser Arbeit mit modifizierten A β 40 Peptiden, die entweder ein *inverted* oder ein *scrambled* RHDS (Arg-His-Asp-Ser) -Motiv aufwiesen, zeigten, dass die RHDS-Sequenz von A β 40 für die A β -induzierte CLU-Sekretion und A β -Aggregation in Zellkultur essentiell ist. Mittels verkürzten N-terminalen A β 16- und A β 11-Peptiden war es möglich zu zeigen, dass die RHDS-Sequenz von A β alleine nicht für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ *Outside-in signaling* und die Thrombozyten-vermittelte A β -Aggregation ausreicht und vermutlich weitere Bindemotive für eine stabile Bindung von A β an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ notwendig sind.

Die Behandlung von transgenen APP23-Mäusen mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel über einen Zeitraum von drei Monaten führte zur Reduktion der Thrombozytenaktivierung und des CLU-Plasmaspiegels in diesen Tieren. Die Analyse der A β -Ablagerungen in zerebralen Gefäßen ergaben, dass die Behandlung von APP23 Mäusen mit

Clopidogrel zu einer signifikanten Reduktion der ZAA führt, denn die Anzahl der ZAA-betroffenen Gefäße sowie die ZAA-betroffene Gefäßfläche in behandelten APP23-Mäusen war signifikant reduziert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Mechanismus identifiziert werden, der für die Thrombozyten-vermittelte A β Aggregation entscheidend ist. Dabei konnte ein direkter Einfluss von Thrombozyten auf die Entstehung von ZAA und schließlich auf die Progression von AD gezeigt werden.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a progressive, neurodegenerative disorder and characterized by deposits of amyloid- β (A β) in brain parenchyma but also in the walls of cerebral blood vessels, known as cerebral amyloid angiopathy (CAA). CAA is present in more than 90 % of AD patients and leads to the degeneration of vessel wall components, reduces cerebral blood flow, and aggravates cognitive decline. Beside the important function of platelets in hemostasis, platelets play a central role in pathological thrombus formation, which is a risk factor for AD. In addition, platelets modulate synthetic A β 40 to fibrillar A β aggregates *in vitro*. Therefore, the aim of this thesis was to uncover the underlying molecular mechanism and to investigate the involvement of platelets in the pathogenesis of AD.

This study identified platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, which is the receptor for fibrinogen, as a direct binding partner of A β 40. It was shown that binding of A β 40 to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ induces the secretion of the chaperon protein clusterin (CLU) from platelets. Cell culture experiments with recombinant CLU and CLU-deficient platelets suggested that CLU promotes the formation of fibrillar A β aggregates. Analysis of platelets from Glanzmann's thrombasthenia patients, who have quantitative and qualitative abnormalities of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, indicated that the abundance of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ determines A β -induced CLU release from platelets and the ability of platelets to modulate A β 40 in platelet cell culture. Moreover, it was shown that adenosine diphosphat (ADP) enhanced the activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ leading to enhanced secretion of CLU and binding of A β 40 to platelets.

Results of this thesis working with A β 40 peptides that had either an inverted or a scrambled RHDS (Arg-His-Asp-Ser) motif, indicate that the RHDS sequence of A β 40 is important for A β -induced CLU secretion and A β aggregation *in vitro*. The use of truncated N-terminal A β 16 and A β 11 peptides showed that the RHDS sequence of A β alone is not sufficient for integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding, outside-in signaling and platelet mediated A β aggregation.

Treatment of transgenic APP23 mice with the antiplatelet agent Clopidogrel for a period of three months led to reduced platelet activation and CLU levels in plasma. Analysis of A β deposits in cerebral vessels demonstrated that Clopidogrel treatment of APP23 mice reduced the number of CAA-affected vessels and the total area of CAA significantly.

In summary, the data presented in this work describes a novel mechanism, which is crucial for platelet mediated-A β aggregation, and indicates a direct contribution of platelets to the development of CAA and thus to the progression of AD.

1 Einleitung

1.1 Die Alzheimer Erkrankung

Weltweit sind schätzungsweise 47 Millionen Menschen von Demenz betroffen, wobei mit einer steigenden Tendenz zu rechnen ist. So wird für das Jahr 2050 eine Prävalenz von über 131 Million prognostiziert. Die geschätzten weltweiten Ausgaben für Demenzkranke liegen bei 818 Milliarden US-Dollar (Prince M , Rakesh, Szabo *et al.*, 2017).

Die Alzheimer Krankheit (*Alzheimer's disease*, AD) ist die häufigste Form der Demenz. Sie ist für ungefähr 60 % der Demenzfälle verantwortlich (Clarfield 2003). Charakteristisch für die AD sind folgende klinische Symptome: Störungen des Kurz-und Langzeitgedächtnisses, Sprachstörungen, Desorientierung, Verhaltensänderungen und Verlust des logischen Denkens (Maurer, Volk *et al.*, 1997, Forstl und Kurz 1999). Im Endstadium der Erkrankung verlieren die Patienten die Kontrolle über ihre Körperfunktionen. Die häufigsten Todesursachen bei AD sind Lungenentzündung gefolgt von Myokardinfarkt und Septikämie. Nach der klinischen Diagnose beträgt die durchschnittliche Lebenserwartung fünf bis acht Jahre (Forstl und Kurz 1999).

Die AD lässt sich in eine familiäre und eine sporadische Form unterteilen. In den häufigsten Fällen (>95%) tritt die Krankheit sporadisch auf, wobei die ersten klinischen Symptome meist erst nach dem 65. Lebensjahre festgestellt werden. Hingegen werden die ersten Anzeichen der familiären Form, die etwa für 1–5 % aller AD Fälle verantwortlich ist, häufig vor dem 50 Lebensjahr auffällig (Lista, O'Bryant *et al.*, 2015). Die familiäre Form beruht ursächlich auf verschiedenen vererbbaeren Mutationen in einem der drei folgenden Gene: Amyloid-Vorläufer-Protein (*Amyloid-Precursor Protein*, APP), Presenilin-1 (PSEN1) oder Presenilin-2 (PSEN2) (Tanzi 2012, Lista, O'Bryant *et al.*, 2015). Im Vergleich zur familiären Form wurde für die sporadische Form keine eindeutige Ursache identifiziert. Viele Studien deuten bei der sporadischen Form auf eine multifaktorielle Krankheit hin, die sowohl das Zentralnervensystem (ZNS) als auch die Peripherie betrifft (Morris, Honea *et al.*, 2014). Einen großen Einfluss auf die AD haben Stoffwechselerkrankungen, Ernährungs- und Lebensweisen, vaskuläre Veränderungen und genetische Faktoren (Morris, Honea *et al.*, 2014). Das Alter gilt als wichtigster Risikofaktor der sporadischen AD (Hendrie 1998, Bickel 2000). Ein weiterer genetischer Risikofaktor ist das $\epsilon 4$ -Allel des Apolipoproteins E (ApoE4) (Strittmatter, Saunders *et al.*, 1993, Saunders 2001). ApoE4 ist an der Regulation des Lipidtransportes und des Cholesterolfstoffwechsels in der Zelle beteiligt (Saunders 2001). ApoE4 kann A β -Peptide binden und ist stark mit senilen Plaques assoziiert (Liu, Liu *et al.*,

2013). Patienten mit Trisomie 21 haben ebenfalls ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Diese tragen ein zusätzliches Chromosom 21, auf dem das APP Gen liegt. Infolge der vermehrten Bildung von A β treten bereits in jungen Jahren neuropathologische Merkmale der AD auf (Wiseman, Al-Janabi *et al.*, 2015).

1.1.1 Neuropathologische Merkmale

Neuropathologisch ist AD durch die Degeneration von Synapsen und Verluste von Neuronen in bestimmten Gehirnregionen, wie dem Hippocampus und dem Kortex gekennzeichnet. Mikroskopisch sind zwei charakteristische Merkmale festzustellen. Dabei handelt es sich um die extrazelluläre Ablagerung von diffusen und neuritischen (senile) Plaques aus Amyloid β -Peptid (A β) im Hirnparenchym und A β -Ablagerung in den zerebralen Gefäßen in Form einer zerebralen Amyloidangiopathie (ZAA) sowie die intraneuronale Akkumulation fibrillärer Strukturen, sogenannter neurofibrillärer Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs) (Abbildung 1) (Glennner und Wong 1984, Jakes, Novak *et al.*, 1991, Selkoe 2011, Harrington 2012).

Die neurofibrillären Bündel bestehen hauptsächlich aus paarigen, doppelhelikal gewundenen Filamenten (Abbildung 1B) (*paired helical filaments*, PHF) von Tau-Proteinen (Jakes, Novak *et al.*, 1991, Selkoe 2011). Das hyperphosphorylierte Tau-Protein entsteht durch die Störung des Gleichgewichts bestimmter Kinasen und Phosphatasen und kann so seine eigentliche Funktion, die Polymerisation und die Stabilisation der axonalen Mikrotubuli, nicht mehr ausüben (Mandelkow und Mandelkow 1998). Als Folge kommt es zur Destabilisierung des Zytoskeletts und schließlich zum Zelltod (Mandelkow und Mandelkow 1998, Selkoe 2011).

Das A β -Protein ist von großer Bedeutung für die Pathogenese der AD. Aus diesem Grund wird in den folgenden Abschnitten die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins zu A β , die Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese und die zerebrale Amyloidangiopathie näher erläutert.

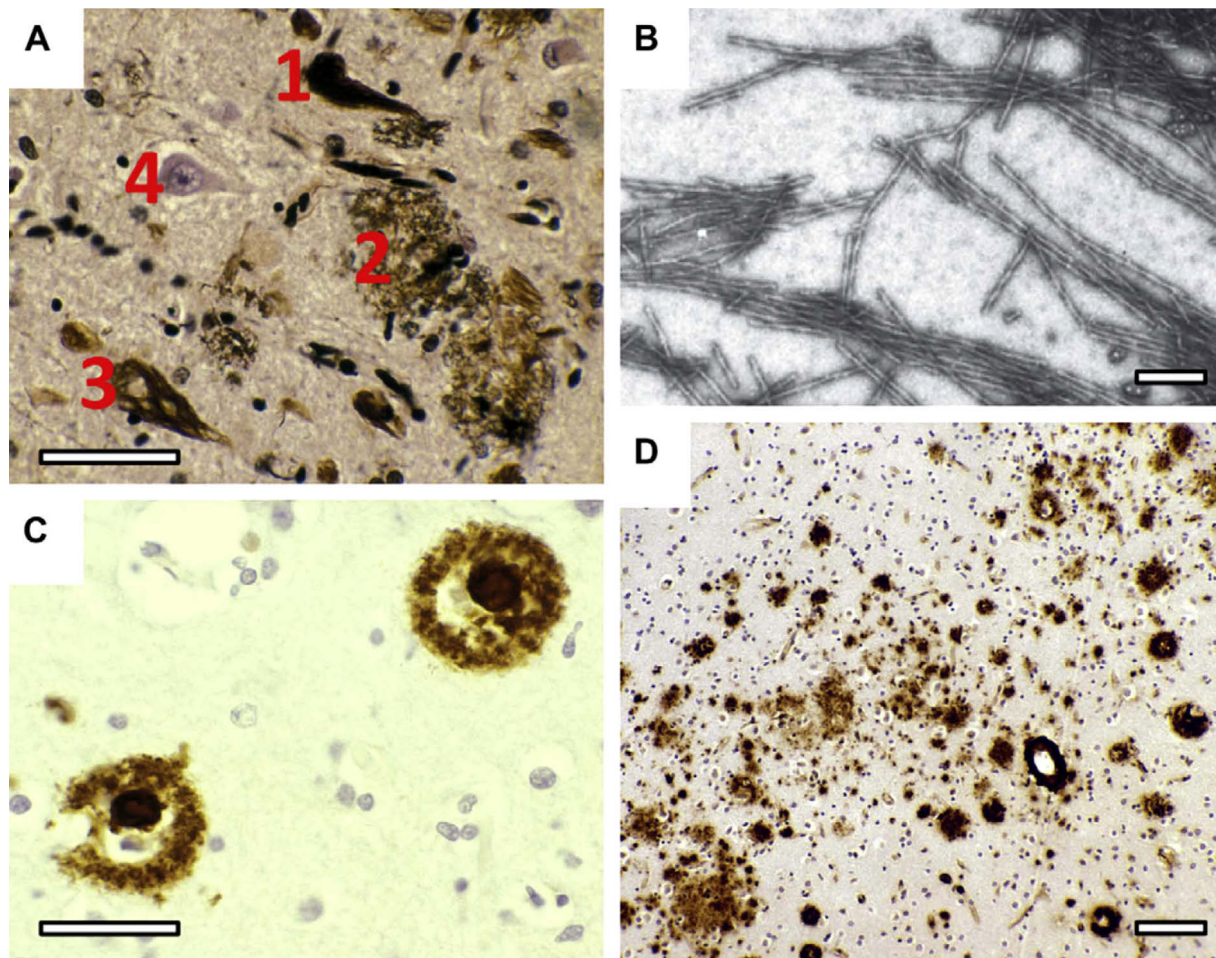


Abbildung 1: Histopathologische Charakteristika der AD. (A) Neurofibrilläre Bündeln aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein in pyramidalen Neuronen (1) und in den Neuriten der Plaques (2). Sobald die Zytoplasmamembran geplatzt ist, werden die neurofibrilläre Bündel extrazellulär (3). Ein nicht betroffenes Neuron (4). (B) Paarige, doppelhelikal gewundene Filamente aus dem Gehirngewebe eines AD-kranken Patienten. (C, D) A β -Pathologie zeigt neuritische Plaques mit Amyloidkern (C), diffuse Plaques und Amyloid β -Peptid-Ablagerung in den zerebralen Gefäßen in Form einer zerebralen Amyloid-Angiopathie (D). (A, C, D) Maßstabsbalken, 50 μ m. (B) Elektronenmikroskopie von neurofibrillären Bündeln; Maßstabsbalken, 250 nm. (Übernommen aus (Harrington 2012).

1.1.2 Die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins zu A β

A β Peptid entsteht durch die Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP). APP ist ein Typ I Transmembranprotein mit extrazellulärer N-terminaler und cytosolischer C-terminaler Domäne (Muller, Deller *et al.*, 2017). Es wird ubiquitär exprimiert und kommt in den drei Isoformen APP 695, APP 751 und APP 770 vor, die durch alternatives Spleißen generiert werden (Slunt, Thinakaran *et al.*, 1994, Muller, Deller *et al.*, 2017). Die physiologische Funktion von APP und seiner proteolytischen Spaltprodukte im Gehirn ist bis heute nicht abschließend geklärt. Es wurden wichtige Funktionen in der Entwicklung des peripheren und des zentralen Nervensystems nachgewiesen. So wird z. B. APP während der Embryogenese für die Migration von neuronalen Vorläuferzellen in die kortikale Platte benötigt (Young-Pearse, Bai *et al.*, 2007, Muller, Deller *et al.*, 2017). Unter anderem wurden Funktionen von APP beim

Neuronen- und Axonenwachstum sowie der Synaptogenese und der synaptischen Plastizität gezeigt (Sabo, Ikin *et al.*, 2003, Hick, Herrmann *et al.*, 2015, Muller, Deller *et al.*, 2017). Zusätzlich konnte APP als ein Reelin-Rezeptor identifiziert werden (Hoe, Lee *et al.*, 2009, Gowert, Kruger *et al.*, 2017), wobei die Interaktion von Reelin und APP das Neuritenwachstum fördert (Hoe, Lee *et al.*, 2009).

Die Prozessierung von APP kann über den amyloidogenen und über den nicht-amyloidogenen Weg erfolgen (Abbildung 2). Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch eine α -Sekretase innerhalb der A β -Domäne gespalten, was zur Sekretion des löslichen extrazellulären N-terminalen APPs α -Fragments führt. In der Membran verbleibt das C-terminale Fragment (CTF α). Anschließend kommt es zur Spaltung des CTF α durch die γ -Sekretase. Hierbei entsteht die intrazelluläre Domäne (AICD) und das lösliche Peptid P3, das freigesetzt wird (Selkoe 2011, Zhang, Ma *et al.*, 2012, Donner und Elvers 2017, Muller, Deller *et al.*, 2017).

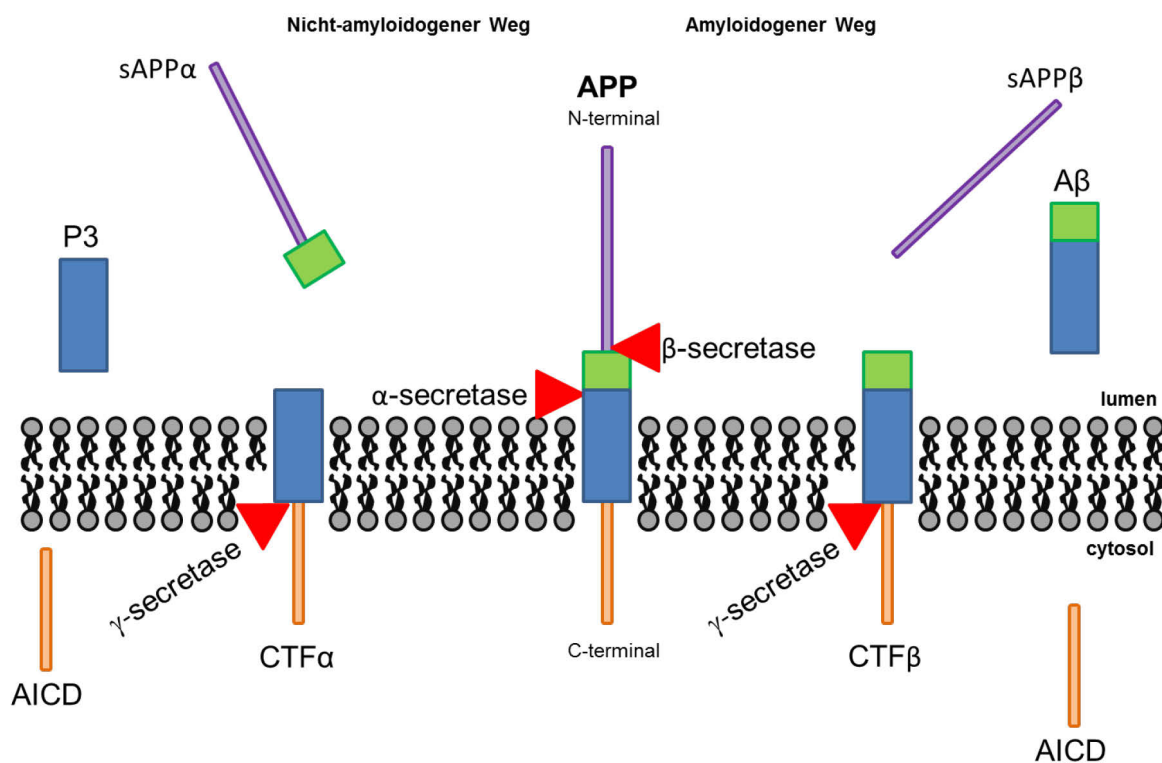


Abbildung 2: Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP). APP kann über den nicht-amyloidogenen Weg (linke Seite der Abb.) und den amyloidogenen Weg (rechte Seite der Abb.) prozessiert werden. Im nicht-amyloidogenen Weg wird APP durch α -Sekretase gespalten. Im amyloidogenen Weg führt die Spaltung durch die β - und die γ -Sekretase zur Freisetzung von A β -Peptiden (modifiziert nach (Donner und Elvers 2017)).

Für die Pathologie der AD ist der amyloidogene Weg von Bedeutung, der zur Bildung des toxischen A β -Peptids führt. Im ersten Schritt kommt es zu einer Spaltung des APP durch die β -Sekretase, die auch BACE1 (*beta-site APP-cleaving enzyme 1*) genannt wird. Hierbei entsteht ein N-terminales Fragment (sAPP β) sowie ein membranverankertes C-terminales Fragment (CTF β). Anschließend spaltet die γ -Sekretase, die aus drei Proteinen (*Nicastrin* (Nct), *Anterior pharynx defective 1* (Aph-1) und dem Präsenilin-Verstärker 2 (Pen-2)) sowie aus einem Heterodimer Präsenilin-1 und -2 (PS1 und PS2) besteht, das C-terminale Fragment (Harrington 2012). Dabei wird die intrazelluläre Domäne von APP (AICD) und das A β -Peptid freigesetzt (Selkoe 2011, Zhang, Ma *et al.*, 2012, Donner und Elvers 2017, Muller, Deller *et al.*, 2017). Die Sequenzlänge der A β -Peptide kann zwischen 38 und 43 Aminosäuren variieren (Zhang, Ma *et al.*, 2012). Hauptsächlich werden Peptide mit der Sequenzlänge von 40 und 42 Aminosäuren (A β 40 und A β 42) generiert. Der gestörte APP-Metabolismus führt zur vermehrten Bildung von A β -Peptiden und zum veränderten Verhältnis von A β 42/A β 40 (Selkoe 2011, Zhang, Ma *et al.*, 2012, Donner und Elvers 2017).

Die nicht-pathophysiologische Rolle von A β ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass endogenes A β für die synaptische Plastizität und die Gedächtnisfunktion notwendig ist, jedoch nur im pikomolaren Bereich funktionsfähig ist (Puzzo, Privitera *et al.*, 2011).

1.1.3 Amyloide Plaques und die Amyloid-(Kaskaden)-Hypothese

Amyloide Plaques sind eines der wichtigsten pathologischen Merkmale der AD und bestehen hauptsächlich aus aggregierten, fibrillären Formen des β -Amyloid-Peptids (Glenner und Wong 1984, Masters, Simms *et al.*, 1985). Es wird zwischen nicht-neuritischen (diffuse) und neuritischen (senile) Plaques unterschieden (Selkoe 2011). Diffuse Plaques haben eine amorphe Struktur und enthalten fast ausschließlich A β 42 (Iwatsubo, Odaka *et al.*, 1994). Außerdem weisen diese keine neuritische Dystrophie auf und kommen auch im Kortex älterer, gesunder Menschen vor. Hingegen bestehen die neuritischen Plaques aus einem zentralen Amyloidkern, der von dystrophischen Neuriten, veränderten Astrozyten und Mikroglia umgeben ist (Selkoe 2011). In den neuritischen Plaques kommt zusätzlich das A β 40 vor, wobei hier die Form A β 42 dominiert (Iwatsubo, Odaka *et al.*, 1994).

Die pathologischen Veränderungen, die zur Entstehung der AD führen, werden durch die Amyloid-Kaskaden-Hypothese beschrieben. Diese Hypothese wurde zum ersten Mal von John A. Hardy und Gerald A. Higgins im Jahre 1992 postuliert (Hardy und Higgins 1992). Laut dieser Hypothese ist die Aggregation und Akkumulation des A β -Peptids die Ursache der AD. Die daraus resultierenden Folgen sind 1. die Entstehung von Neurofibrillenbündeln, 2. der vaskuläre Schaden, 3. die Beeinträchtigung der Ca²⁺ Homöostase und schließlich 4. der

Zelltod (Hardy und Higgins 1992). Durch den Gewinn an neuen Erkenntnissen in den letzten Jahren wurde die Amyloid-Kaskaden-Hypothese modifiziert und ergänzt (Abbildung 3).

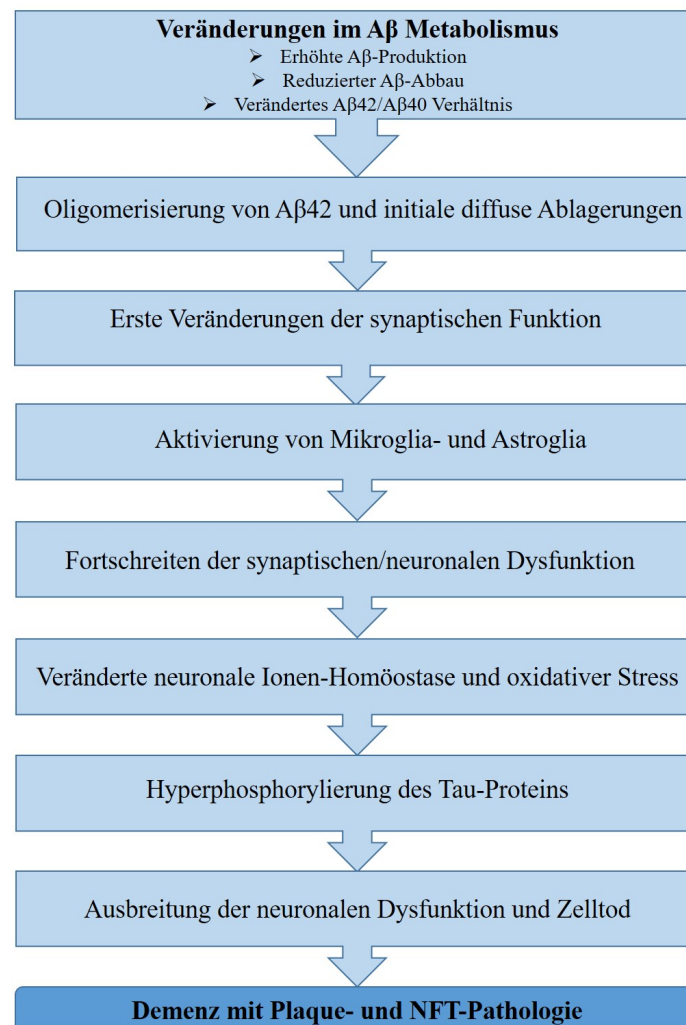


Abbildung 3: Amyloid-Kaskaden-Hypothese. Der erhöhte Aβ-Spiegel durch die erhöhte Produktion und /oder verringerten Abbau sowie das erhöhte Verhältnis von Aβ42 zu Aβ40 verursachen laut dieser Hypothese die Oligomerisierung von Aβ42. Die nachgeschalteten Prozesse führen zum Zelltod und schließlich zur Demenz mit Plaques und neurofibrillären Bündeln (*neurofibrillary tangles*, NFTs) (Abbildung erstellt nach Haass und Selkoe 2007).

Eine neue entscheidende Rolle wurde Oligomeren von Aβ Peptiden zugeschrieben. Oligomere sind ein Zwischenprodukt in der Aggregation von amyloiden Plaques (Haass und Selkoe 2007, Selkoe und Hardy 2016). Dabei verursacht die Zunahme an Aβ42- Oligomeren die Veränderungen der synaptischen Funktion durch die Inhibierung der hippocampalen Langzeit-Potenzierung. Parallel dazu kommt es zu mikroskopisch sichtbaren Aβ42-Ablagerungen in diffusen Plaques. Daraus resultierend werden lokale Entzündungsreaktionen (Mikrogliesen und Astrozytose) beobachtet. Im Laufe der Zeit führen diese Ereignisse zu oxidativem Stress, veränderter Ionen-Homöostase sowie einer Vielzahl von zusätzlichen biochemischen Veränderungen. Durch veränderte Kinase- und Phosphatase-Aktivitäten wird die Bildung von neurofibrillären Bündeln induziert, die zusätzliche Defekte induzieren. Der anschließende

Untergang von Neuronen führt zu einer fortschreitenden Demenz (Haass und Selkoe 2007, Selkoe 2011).

1.1.4 Zerebrale Amyloidangiopathie

Die ZAA gehört zur Gruppe der Amyloidosen und ist durch die Aggregation und Akkumulation von Amyloid β in den Wänden der kleinen und mittelgroßen, meist arteriellen Blutgefäße des Kortex und der Leptomeningen gekennzeichnet (Vinters 1987). Im Gegensatz zu parenchymalen Ablagerungen stellt bei der ZAA das Amyloid β 40 den Hauptbestandteil dar und seltener das A β 42 (Revesz, Ghiso *et al.*, 2003). Diese Gefäßablagerung von fibrillärem A β verändern die vaskulären Strukturen und deren Funktion, so dass es schließlich zum Untergang der glatten Muskelzellen, zur Lumeneinengung, Gefäßwandverdickung und zur endothelialen Dysfunktion führt (Smith und Greenberg 2009, Pantoni 2010, Gahr, Nowak *et al.*, 2012). Infolgedessen entstehen brüchige Gefäße, die zur Ausbildung von Mikroaneurysmen und Dissektionen neigen, welche spontanen intrazerebralen Blutungen (IZB) begünstigen (Mandybur 1986, Zekry, Duyckaerts *et al.*, 2003, Thal, Griffin *et al.*, 2008).

Bei der ZAA wird zwischen zwei Formen unterschieden: 1. Die seltene hereditäre Form, welche unterschiedliche Mutationen aufweist, und 2. die sporadische Form. Bei der sporadischen Form stellt das Alter den Hauptrisikofaktor dar. Dabei tritt die ZAA bei circa 30 % der 60- bis 69-jährigen und bei über 50 % der 70 bis 89-jährigen auf, während im Alter unter 55 Jahren die ZAA nur selten vorkommt (Yamada 2000). Wie bei der AD ist das Apolipoprotein APOE- ϵ 4-Allel ein weiterer Risikofaktor. Patienten mit APOE- ϵ 4-Allel haben nicht nur ein erhöhtes Risiko für ZAA, sondern auch eine stärkere Ausprägung der ZAA (Premkumar, Cohen *et al.*, 1996).

Die ZAA wurde bisher zu den vaskulären Erkrankungen gezählt und nicht als Ursache der Neurodegeneration angesehen. Allerdings deuten neue Erkenntnisse daraufhin, dass die ZAA nicht nur als Ursache für den Schlaganfall oder Neurodegeneration zu betrachten ist, sondern ebenfalls eine wichtige Rolle bei diesen beiden neurologischen Syndromen spielt (Smith 2017). Zwei große Studien zeigten, dass nicht-demente Überlebende einer IZB, von denen die meisten ZAA hatten, ein höheres Risiko für Demenz auch in Abwesenheit von neuen IZBs hatten (Biffi, Bailey *et al.*, 2016, Moulin, Labreuche *et al.*, 2016). Eine weitere Studie zeigte, dass die sporadische sowie die hereditäre ZAA mit Ausdünnung des Kortex in den nicht-durch IZBs betroffenen Regionen assoziiert ist (Fotiadis, van Rooden *et al.*, 2016). Zusätzlich zeigte die gleiche Autorengruppe, dass die kleineren Hirnvolumina bei den Patienten mit ZAA mit

einer langsameren kognitiven Verarbeitungsgeschwindigkeit und schlechteren exekutiven Funktionen verbunden waren (Xiong, Davidsdottir *et al.*, 2016).

Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen der ZAA und einer Alzheimer-Demenz. Beide Erkrankungen haben eine gemeinsame A β -assoziierte pathologische Grundlage und über 90 % der AD Patienten weisen eine ZAA auf. Zusätzlich sind die AD- Patienten mit ZAA kognitiv stärker beeinträchtigt als AD-Patienten ohne ZAA (Jellinger 2002, Pfeifer, White *et al.*, 2002, Thal, Griffin *et al.*, 2008). Es liegen jedoch bei weniger als 50 % der Patienten mit ZAA die pathologischen Kriterien für eine AD vor (Gahr, Nowak *et al.*, 2012).

1.1.5 Die Rolle von Clusterin in der Alzheimer Erkrankung

Clusterin (CLU), das auch unter dem Namen Apolipoprotein J bekannt ist, ist ein stress-induziertes Protein. Das CLU Gen ist bei Menschen auf dem Chromosom 8 lokalisiert (Purrello, Bettuzzi *et al.*, 1991, Wong, Taillefer *et al.*, 1994) und kodiert ein 70 - 80 kDa großes glykosyliertes Protein, das aus α - und β -Untereinheiten, die durch Disulfidbindungen miteinander verbunden sind, besteht (Kirsbaum, Bozas *et al.*, 1992, Wilson und Easterbrook-Smith 2000). CLU wird ubiquitär in den meisten Geweben der Säugetiere exprimiert (de Silva, Harmony *et al.*, 1990, Aronow, Lund *et al.*, 1993, Verbrugghe, Kujala *et al.*, 2008), jedoch insbesondere im Zentralnervensystem (ZNS) (Danik, Chabot *et al.*, 1993, O'Bryan, Cheema *et al.*, 1993, Bertrand, Poirier *et al.*, 1995). Im Jahr 1993 zeigte eine Studie, dass die Vorläuferzellen der Thrombozyten, die sogenannte Megakaryozyten ebenfalls CLU exprimieren und diese in den α -Granula von Thrombozyten gespeichert werden (Tschopp, Jenne *et al.*, 1993). Außerdem befindet sich CLU im Plasma sowie in der Zerebrospinalflüssigkeit (*cerebrospinal fluid*, CSF) (Aronow, Lund *et al.*, 1993).

Bereits erste Studien legten den Schluss nahe, dass es sich bei CLU um ein multifunktionales Protein handelt, welches sich an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Insbesondere konnte seine Rolle beim Lipidstoffwechsel, Apoptose, Spermatogenese und an der Aggregation und Adhäsion von Zellen gezeigt werden (de Silva, Harmony *et al.*, 1990, Jenne, Lowin *et al.*, 1991, Jenne und Tschopp 1992, Silkensen, Skubitz *et al.*, 1995, Nuutinen, Suuronen *et al.*, 2009). Es wird zwischen sezerniertem CLU (sCLU) und nicht-sezerniertem CLU unterschieden. Zur zentralen Aufgabe des sCLU zählt seine Chaperonaktivität. Dabei bindet sCLU an denaturierende Proteine und verhindert deren Aggregation (Wilson und Easterbrook-Smith 2000, Nuutinen, Suuronen *et al.*, 2009). Nicht-sezernierte Formen vom CLU können unter pathologischen Zuständen die Apoptose in den Zellen auslösen (Yang, Leskov *et al.*, 2000, Leskov, Klovov *et al.*, 2003).

Eine besondere und gleichzeitig umstrittene Rolle hat CLU bei der AD. Es wurde gezeigt, dass der CLU-Spiegel im frontalen Kortex und im Hippocampus von AD-Patienten im Vergleich zu nicht-dementen Kontrollpersonen signifikant erhöht ist und zudem auch in senilen Amyloidplaques nachweisbar ist (Bertrand 1995, Lidstrom 1998, Calero 2000). Ebenso akkumuliert CLU in den vaskulären Amyloidplaques (Verbeek, Otte-Holler *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist der Plasmaspiegel von CLU bei AD-Patienten erhöht und korreliert mit dem kognitiven Rückgang und der Progression der AD (Jongbloed, van Dijk *et al.*, 2015). Genomweite Assoziationsstudien identifizierten mehrere Einzelnukleotid-Polymorphismen innerhalb des CLU-Gens (jedoch außerhalb des Protein-kodierenden offenen Leserahmens), die Risikofaktoren für AD darstellen (Bertram, McQueen *et al.*, 2007, Harold, Abraham *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurden die Mutationen in der für die CLU- β -Kette kodierenden Sequenz ebenfalls als genetische Risikofaktoren für AD identifiziert (Bettens, Brouwers *et al.*, 2012).

In vielen *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass CLU an das A β bindet und die Bildung amyloider Fibrillen beeinflusst (Ghisso, Matsubara *et al.*, 1993, Matsubara, Frangione *et al.*, 1995, Oda, Wals *et al.*, 1995). Matsubara *et al.* zeigten eine höhere Affinität von CLU zu A β 40-Peptiden als zu den Fibrillen (Matsubara, Frangione *et al.*, 1995). Später zeigte die gleiche Arbeitsgruppe, dass CLU die Amyloid- β Aggregation verhindert. Einige Jahre danach zeigte Yerbury *et al.* sowohl einen aggregationsmindernden als auch aggregations-fördernden Effekt von CLU auf die A β -Peptide (Yerbury, Poon *et al.*, 2007). Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, in welchem relativen Verhältnis CLU/A β während der fibrillären Aggregation vorliegt. Wenn das Verhältnis von CLU zu A β höher ist, hemmt CLU die Aggregation und sorgt für eine Zytoprotektion. Wenn das Verhältnis niedrig ist, wirkt CLU aggregationsfördernd und zytotoxisch (Yerbury, Poon *et al.*, 2007, Wilson, Yerbury *et al.*, 2008). In einer *in vivo* Studie wiesen transgene AD-Mäuse, die auf einem CLU knockout Hintergrund gezüchtet wurden, eine Reduktion von Amyloid-Ablagerungen sowie eine Reduktion der neuritischen Dystrophie in Hirnparenchym auf (DeMattos, O'Dell M *et al.*, 2002). Einzelmolekül-Fluoreszenzstudien zeigten, dass CLU die A β 40 getriggerte Amyloidbildung durch die Bildung eines stabilen Komplexes mit Oligomeren des Peptids hemmt (Narayan, Meehan *et al.*, 2012). Zusätzlich zeigte eine Studie von Howlett *et al.* in den Gehirnen von AD-erkrankten Patienten, dass CLU vermehrt mit A β 40, jedoch nicht mit A β 42, assoziiert ist (Howlett, Hortobagyi *et al.*, 2013).

Eine weitere Funktion von CLU wurde in der Beseitigung von A β Peptiden untersucht. Zwei Möglichkeiten gibt es für die Beseitigung von entstandenen A β Peptiden aus dem Gehirn, 1. Abfluss von A β mit der interstitiellen Flüssigkeit sowie 2. der Rezeptor-vermittelte Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Bei dem Rezeptor-vermittelten Transport sind sowohl das Lipoprotein-verwandte Protein 1 (LRP1) als auch LRP2 (Megalin) involviert, wobei CLU und ApoE eine wichtige Rolle spielen (Bell, Sagare *et al.*, 2007, Nuutinen, Suuronen *et al.*, 2009, Li, Ma *et al.*, 2014). LRP1 bindet direkt A β und interagiert mit ApoE, wobei LRP2 als Rezeptor

für die Aufnahme von CLU/A β -Komplexen gilt (Bell, Sagare *et al.*, 2007, Nuutinen, Suuronen *et al.*, 2009, Verghese, Castellano *et al.*, 2013, Li, Ma *et al.*, 2014). Dabei kann die Dysfunktion der Rezeptoren sowie der Proteine, die an dem Transport beteiligt sind, zu einer mangelnden Beseitigung der A β -Peptide führen, welche in der Folge die Bildung von Plaques begünstigen könnte (Nuutinen, Suuronen *et al.*, 2009, Li, Ma *et al.*, 2014).

1.2 Thrombozyten

1.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombozytenfunktion

Thrombozyten sind die kleinsten Zellen des Blutes und weisen einen Durchmesser von $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ auf (Kehrel 2003). Da Thrombozyten anukleäre Zellen sind, sind sie nur eingeschränkt zur Neusynthese von Proteinen fähig. Thrombozyten werden im Knochenmark und, wie erst vor kurzem gezeigt wurde, in der Lunge durch Zytoplasma-Abschnürungen der Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, gebildet. Sie haben eine Lebenszeit von zehn Tagen (Odell und Mc 1961, Ault und Knowles 1995, George 2000, Lefrancais, Ortiz-Munoz *et al.*, 2017). Anschließend werden sie als gealtert erkannt und im retikulären System der Leber und Milz abgebaut. Im physiologischen Zustand beträgt die Thrombozytenzahl beim Mensch 150.000 bis 350.000/ μl Blut und bei der Maus $1,1 \times 10^6$ / μl Blut (George 2000, Jirouskova, Shet *et al.*, 2007).

Thrombozyten sind an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt, wobei die Hauptfunktion der Thrombozyten in der Blutstillung besteht. Bei einer intakten Barriere der Endothelzellen zirkulieren Thrombozyten im inaktiven, diskoiden Zustand. Zusätzlich dazu wird die unbegründete Thrombozytenaktivierung durch zwei Inhibitoren, Prostaglandin I₂ (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO), unterdrückt (Ruggeri 2002). Erst wenn es zur Schädigung bzw. Verletzung oder Aktivierung des Endothels der Gefäßwand und zur Freilegung von Komponenten der subendothelialen extrazellulären Matrix (EZM) kommt, werden Thrombozyten aktiviert und es kommt zur Bildung eines hämostatischen Pfropfes (Thrombus), der die Blutung zunächst stoppt, aber instabil ist. Somit ist die primäre Hämostase, die im folgenden Abschnitt (Abschnitt 1.2.2) näher beschrieben wird, abgeschlossen (Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008, Jackson 2011). Da der primäre Thrombus reversibel ist und sich von der Gefäßwand ablösen kann, kommt es in der sekundären Hämostase zur Verfestigung des Thrombus durch die Bildung eines festen Fasernetzes aus

Fibrin. Dabei wird Fibrin durch die Spaltung von Fibrinogen durch Thrombin generiert (Riddel, Aouizerat *et al.*, 2007, Jackson 2011).

Neben ihrer Hauptfunktion in der Hämostase spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Angiogenese, Tumorprogression und Inflammation (Jurk und Kehrel 2010). Ebenso sind Thrombozyten maßgeblich an der Pathogenese der Arteriosklerose, die durch eine Dysfunktion des vaskulären Endothels sowie durch chronische Entzündungsprozesse ausgelöst wird, beteiligt. Dabei nutzen sie ihre pro-inflammatorischen Eigenschaften, sodass sie vaskuläres Endothel, glatte Muskelzellen und Leukozyten in ihrer Funktion beeinflussen und tragen somit zu den Entzündungsreaktionen bei (Jurk und Kehrel 2010). In der Folge führt dies zur Entstehung von arteriosklerotischen Plaques. Die Ruptur eines arteriosklerotischen Plaques kann zu akuten thrombotischen Ereignissen führen und schließlich einen Herzinfarkt oder Schlaganfall auslösen (Jurk und Kehrel 2010, Jackson 2011).

1.2.2 Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase

Nach Verletzung eines Blutgefäßes liegt die subendotheliale EZM frei. Diese enthält eine große Anzahl an Adhäsionsproteinen wie z. B. verschiedene Kollagentypen, von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronektin, Laminin, und Thrombospondin (Ruggeri und Mendolicchio 2007). Der initiale Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der EZM erfolgt über die Interaktion des thrombozytären Glykoprotein Ib-V-IX-Komplexes an vWF (Abbildung 4) (Ruggeri und Mendolicchio 2007, Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008). Diese erste Interaktion verlangsamt die Geschwindigkeit zirkulierender Thrombozyten und ermöglicht ein Abstoppen und eine transiente Adhäsion der Thrombozyten an der EZM, so dass der Thrombozyt über den wichtigsten Kollagenrezeptor GPVI an Kollagen binden kann. GPVI ist ein Aktivierungsrezeptor und löst intrazelluläre Signale in Thrombozyt aus (Abbildung 4) (Ruggeri 2002, Ruggeri und Mendolicchio 2007, Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008).

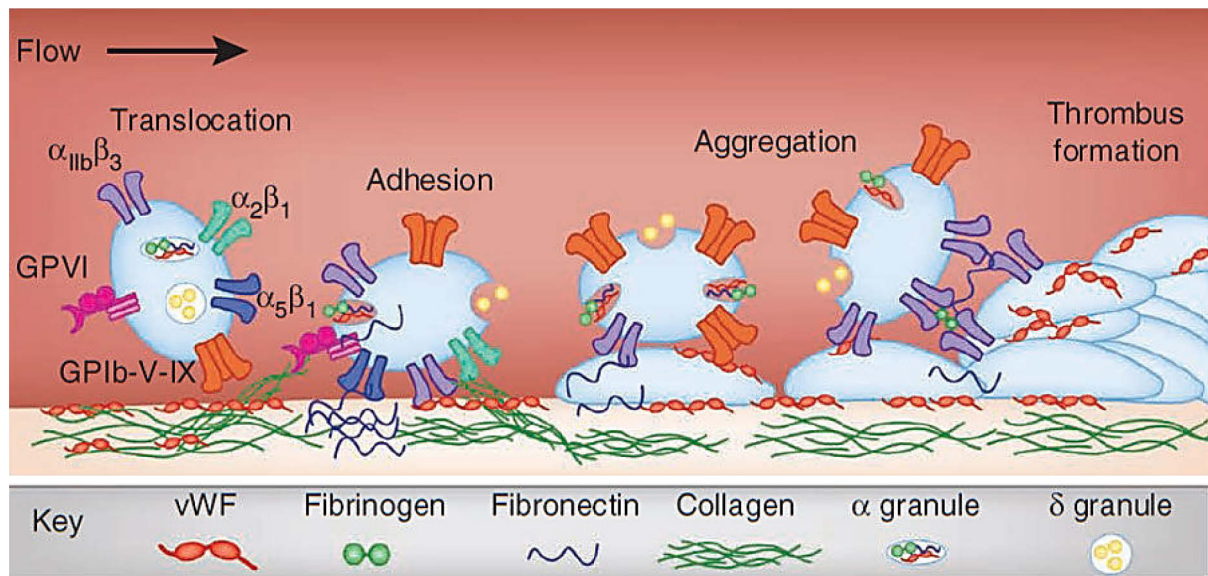


Abbildung 4: Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase. Nach der Freilegung der subendothelialen extrazellulären Matrix entsteht der initiale Kontakt über die Interaktion zwischen dem thrombozytären Glykoprotein Ib-V-IX-Komplex und kollagen-immobilisiertem vWF. Die Adhäsion von Thrombozyten sowie die Auslösung des interzellulären Signalwegs und somit die Aktivierung von Thrombozyten erfolgt über die Bindung von GPVI an Kollagen. Dies bewirkt die Degranulation von α - und dichten Granula und somit die Freisetzung von sekundären Mediatoren. Diese fördern die Aktivierung und die Rekrutierung von weiteren Thrombozyten. Es kommt zur Aggregation von Thrombozyten und anschließend zur Thrombusbildung (modifiziert nach (Jackson 2011)).

Der GPVI-vermittelte Signalweg erfolgt über die Phosphorylierung des konservierten Motivs ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) vom Adaptorprotein FcR- γ , das mit GPVI assoziiert ist. An die phosphorylierte ITAM-Sequenz bindet die SH2-Domäne der Tyrosinkinase Syk, die dadurch phosphoryliert und aktiviert wird. Dies führt zu einer nachgeschalteten über Tyrosinphosphorylierung vermittelten Signalkaskade, die schließlich zur Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase $PLC\gamma_2$ führt. Die Aktivierung von $PLC\gamma_2$ induziert anschließend die Bildung von 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3). DAG aktiviert die Proteinkinase (PK) C und IP_3 induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und anschließender Ca^{2+} -Einstrom, was zu einer Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentrationen führt. Der GPVI-vermittelte Signalweg bewirkt die Degranulation von α - und dichten Granula und somit die Freisetzung der sekundären Mediatoren Adenosindiphosphat (ADP) und Thromboxan A2 (TXA2), sowie die Verlagerung der Integrine in einen hochaffinen Zustand (Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008, Nieswandt, Varga-Szabo *et al.*, 2009).

Durch die Agonisten, ADP und TXA2, und dem lokal produzierten Thrombin kommt es zur vollständigen Thrombozytenaktivierung über die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGR), und zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten (Abbildung 4) (Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008, Nieswandt, Varga-Szabo *et al.*, 2009).

ADP bindet an den Rezeptor P2Y₁, der die Ca²⁺ Mobilisierung, die Oberflächenveränderung, (*shape change*) und die Aggregation von Thrombozyten vermittelt, sowie an den Rezeptor P2Y₁₂. Der Rezeptor P2Y₁₂ ist für die ADP-abhängige Hemmung der Adenylatzyklase sowie für die Amplifikation der Sekretion und Aggregation verantwortlich (Abbildung 5). Die beiden Rezeptoren stellen einen Angriffspunkt für die Entwicklung von antithrombotischen Medikamenten dar. Zu den am häufigsten eingesetzten P2Y₁₂-Antagonisten gehören die so genannten Thienopyridine. Zu dieser Klasse antithrombotischer Medikamente gehören Clopidogrel und Ticlopidin (Abbildung 5) (Kauffenstein, Bergmeier *et al.*, 2001, Gachet 2006).

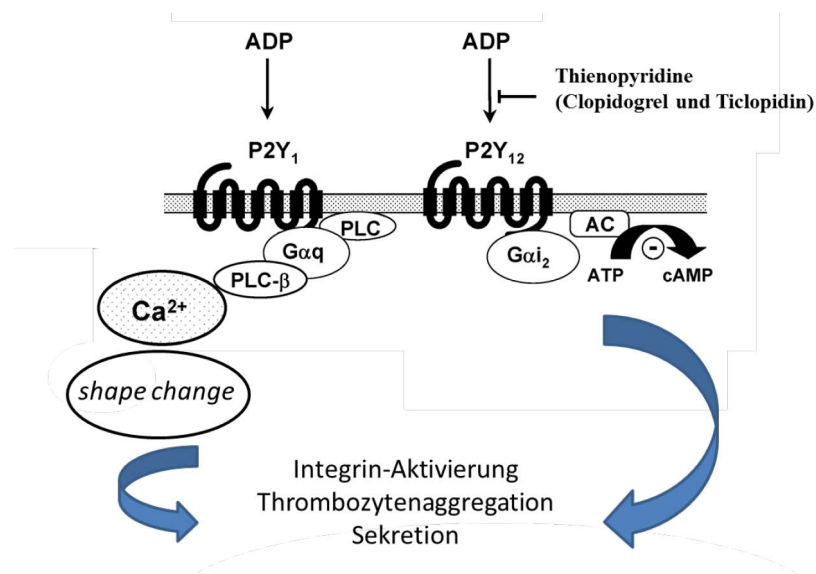


Abbildung 5: Thrombozytäre P2-Rezeptoren. P2Y₁ und P2Y₁₂ sind die wichtigsten Rezeptoren für die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation. Der Gq-gekoppelte P2Y₁-Rezeptor ist für die intrazelluläre Mobilisierung von Ca²⁺, Oberflächenveränderung (*shape change*) und den Beginn der Thrombozytenaggregation verantwortlich. Der Gai-gekoppelte P2Y₁₂-Rezeptor ist für die Inhibition der Adenylatzyklase (AC) sowie für die Verstärkung der Thrombozytenaggregation und Sekretion zuständig. Der P2Y₁₂-Rezeptor ist das Angriffsziel von antithrombotischen Medikamenten wie Clopidogrel und Ticlopidin (modifiziert nach Gachet 2006).

Thrombin ist der stärkste Agonist und bindet an die Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), die an die G-Proteine Gq und G12/13 koppeln. Es gibt vier verschiedene PAR-Subtypen, von denen PAR1 und PAR4 auf humanen Thrombozyten vorkommen, während murine Thrombozyten PAR3 und PAR4 aufweisen (Offermanns 2006, Coller und Shattil 2008).

Thromboxan A₂, das nach Thrombozytenaktivierung durch Zykllooxygenase 1 aus Arachidonsäure gebildet wird, vermittelt seine Wirkung über den Thromboxan-A₂-Rezeptor (TP), der ebenfalls an die G-Proteine Gq und G12/13 gekoppelt ist (Offermanns 2006). Die Signalkaskade kann durch Azetylsalizylsäure (Aspirin), die die Zykllooxygenase 1 inhibiert, blockiert werden. Der Thromboxan A₂-vermittelte Signalweg ist wichtig, jedoch spielt er bei der Aktivierung von Integrin α_{IIb}β₃ sowie bei der Sekretion der α-Granula eine eher untergeordnete Rolle (Rinder, Student *et al.*, 1993, Kehrel 2003).

An der stabilen Adhäsion von Thrombozyten an die EZM sind vor allem das Integrin $\alpha_2\beta_1$, das an Kollagen bindet, und das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, das an Fibrinogen, Fibronectin und Kollagen-gebundenem vWF bindet, beteiligt (Ruggeri 2002, Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008).

Durch die Aktivierung und die Rekrutierung von weiteren Thrombozyten kommt es zur Aggregation von Thrombozyten (Abbildung 4). Eine entscheidende Rolle spielt dabei das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Nach dem das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in den aktiven, hochaffinen Funktionszustand übergegangen ist, kann Fibrinogen an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden und so über eine Brückenbildung die Thrombozyten miteinander verbinden, so dass es zur Aggregatbildung der Thrombozyten untereinander kommt (Ruggeri 2002, Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008, Nieswandt, Varga-Szabo *et al.*, 2009).

1.2.3 Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, welches auch Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) genannt wird, ist das häufigsten vorkommende Glykoprotein auf der Membranoberfläche von ruhenden Thrombozyten in einer Anzahl von ungefähr 80.000 Exemplaren pro Zelle (Wagner, Mascelli *et al.*, 1996). Zusätzlich befindet sich ein intrazellulärer Pool von $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrinen in der Membran der α -Granula, der nach der Aktivierung auf die Thrombozytenoberfläche transloziert wird. Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ ist ein transmembranes Heterodimer, das sich aus zwei nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzt. Die α_{IIb} and β_3 Gene, ITGA2B und ITGB3, sind auf dem langen Arm des Chromosoms 17 in der Region q21-23 lokalisiert (Sosnoski, Emanuel *et al.*, 1988).

Das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet verschiedene Liganden, welche eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) Sequenz enthalten. Zu den bedeutenden Liganden gehören vWF, Fibrin, Fibronectin, Thrombospondin, Vitronectin und vor allem Fibrinogen (Nieswandt, Varga-Szabo *et al.*, 2009). Auf den zirkulierenden, ruhenden Thrombozyten befindet sich das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in einem nicht aktivierten, niedrig-affinen Funktionszustand, bei dem die Bindungsstelle für die RGD-Sequenz unzugänglich ist (Abbildung 6 A) (Estevez, Shen *et al.*, 2015). Durch die Aktivierung des Thrombozyten kommt es zum sogenannten *Inside-out signaling* und damit zur Änderung der Konformation des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, das in seinen aktivierten-intermediär-affinen Funktionszustand (Abbildung 6 B) überführt wird. Hierbei wird die Bindungssequenz für das RGD-Motiv freigelegt (Varga-Szabo, Pleines *et al.*, 2008, Estevez, Shen *et al.*, 2015). Die Bindung von Liganden induziert wiederum eine Konformationsänderung sowie das Clustern des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ und löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, die zum so genannten *Outside-in signaling* führt (Abbildung 6 C) (Estevez, Shen *et al.*, 2015).

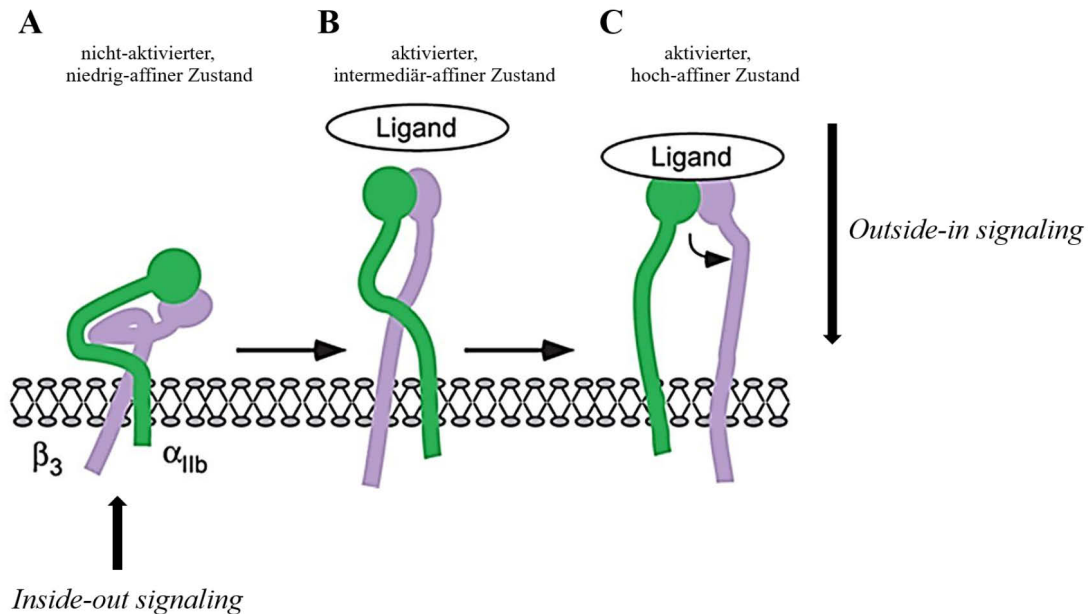


Abbildung 6: Konformationszustand von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ während der Aktivierung und Ligandenbindung. (A) Der nicht aktivierte, niedrig-affine Zustand des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ wird durch Wechselwirkungen zwischen den α - und β -Ketten innerhalb der Transmembran- und zytoplasmatischen Domänen aufrechterhalten, die die Ektodomäne des Integrins einschränken. (B) Das *Inside-out signaling* führt zum aktivierten-intermediär-affinen Funktionszustand, der eine erweiterte Konformation mit einer geschlossenen Konfiguration aufweist. (C) Die Bindung des Liganden induziert weitere Konformationsänderungen, die zu einem offenen hoch-affinen Zustand führen und ermöglicht somit ein *Outside-in signaling* (modifiziert nach (Estevez, Shen *et al.*, 2015)).

Dabei bindet die GPGR-aktivierte $G\alpha_{13}$ -Untereinheit an die zytoplasmatische Domäne der β_3 -Untereinheit (Abbildung 7). Die Interaktion von $G\alpha_{13}$ mit β_3 führt zur Aktivierung von Src-Familienkinasen (SFKs), insbesondere von c-Src, die wiederum die Tyrosin-phosphorylierung des zytoplasmatischen Teils der β_3 -Untereinheit des Integrins vermitteln (Law, Nannizzi-Alaimo *et al.*, 1996, Law, DeGuzman *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von Y^{747} reguliert negativ die Bindung von Talin und die Phosphorylierung von Y^{759} schützt die β_3 -Untereinheit vor der Spaltung durch die Kalzium-abhängige Protease Calpain. Die beiden Phosphorylierungen sind wichtig für die Kontrolle des Wechsels zwischen der Oberflächenvergrößerung von Thrombozyten und der Verfestigung des Thrombozyten-Fibrin-Thrombus (Li, Delaney *et al.*, 2010, Estevez, Shen *et al.*, 2015). Anschließend phosphoryliert und aktiviert c-Src ein wichtiges RhoA-GTPase-aktivierendes Protein, p190 Rho GTPase-aktivierendes Protein, das RhoA inaktiviert, so dass die Oberflächen-vergrößerung von Thrombozyten ermöglicht wird. Die Aktivierung von Syk durch c-Src führt schließlich zur Phosphorylierung und Aktivierung von PLC γ 2. Die darauffolgende Signalkaskade verläuft analog zum GPVI-vermittelten ITAM-Signalweg (siehe Abschnitt 1.2.3). Der aktivierte Syk-ITAM-Signalweg sowie der durch c-Src-aktivierte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Signalweg stimulieren die Sekretion der Granula (Li, Delaney *et al.*, 2010, Estevez, Shen *et al.*, 2015).

Nach der Thrombusbildung und nachfolgender sekundärer Hämostase (Koagulation) unterdrückt die Spaltung von β_3 durch Calpain die Wechselwirkung von c-Src mit der β_3 -Untereinheit. Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von RhoA und Verfestigung des Thrombozyten-Fibrin-Thrombus (Estevez, Shen *et al.*, 2015).

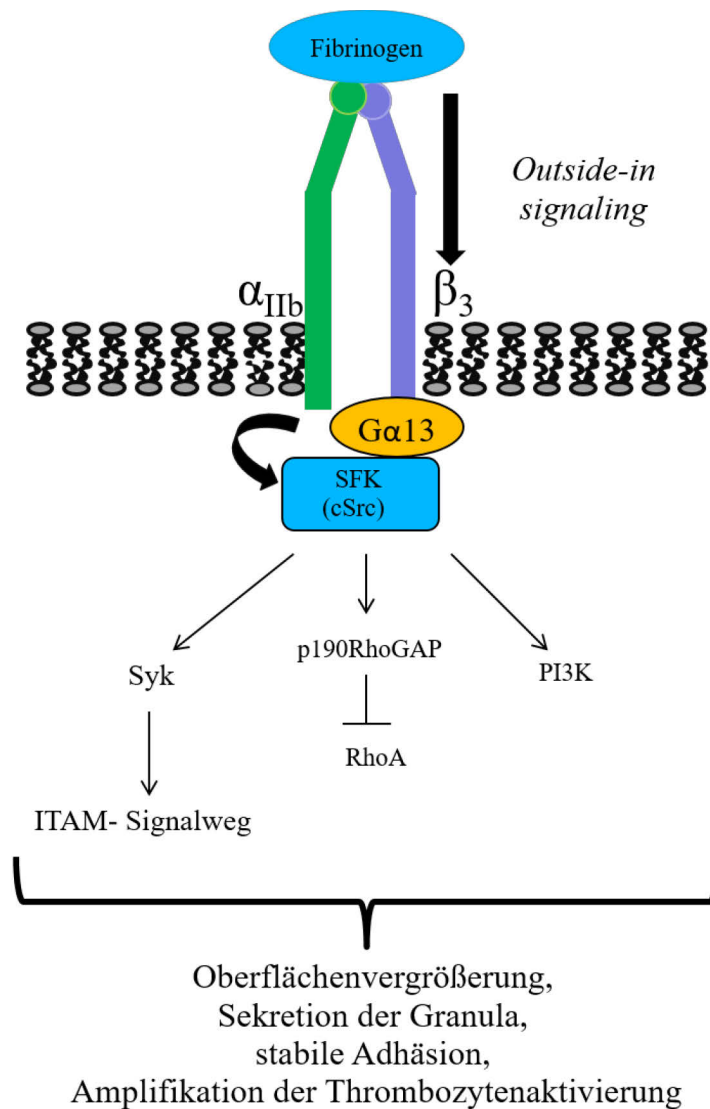


Abbildung 7: Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermitteltes Outside-in signaling. Die Wechselwirkung von Gα13 mit der β_3 -Untereinheit führt zur Aktivierung von c-Src-Kinasen (SFKs). Die SFKs aktivieren den Syk-vermittelten ITAM-Signalweg, das RhoA-GTPase-aktivierende Protein (p190 Rho GAP) und den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) – Signalweg (modifiziert nach (Estevez, Shen *et al.*, 2015)).

Der Verlust oder die Dysfunktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ manifestiert sich in der Glanzmann-Thrombasthenie (GT). Diese seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung ist durch die fehlende Thrombozytenaggregation gekennzeichnet. Die GT wird in drei Gruppen unterteilt: Bei Typ I fehlt Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ fast vollständig (< 5 %), bei Typ II liegt eine Reduktion der normalen Proteinmenge auf 5-20 % vor und der Typ III weist nahezu normale Expression (> 20 %) auf, jedoch mit einem qualitativen Defekt (Solh, Botsford *et al.*, 2015). Der grundlegende

GT-Phänotyp zeigt leichte bis schwere Blutungen. Zu den typischen Symptomen gehören spontane Schleimhautblutungen, Zahnfleisch-Blutungen, Nasenbluten, gastrointestinale Blutungen sowie eine erhöhte Neigung zur Hämatombildung (Nurden 2017).

1.3 Rolle der Thrombozyten in der Alzheimer Erkrankung

1.3.1 APP und A β -Peptide in Thrombozyten

Thrombozyten enthalten eine große Menge an APP (hauptsächlich die Isoformen APP770 und APP751), das in der Plasmamembran und in den α -Granula lokalisiert ist (Van Nostrand, Schmaier *et al.*, 1990, Li, Berndt *et al.*, 1994, Donner und Elvers 2017). Zusätzlich exprimieren Thrombozyten alle für die Generierung von A β -Peptiden notwendige Enzyme (Evin, Zhu *et al.*, 2003, Donner und Elvers 2017). A β -Peptide können bei der Aktivierung von Thrombozyten durch natürliche Agonisten, wie zum Beispiel Kollagen und Thrombin, freigesetzt werden (Li, Whyte *et al.*, 1998). Die Studien zeigten, dass ruhende Thrombozyten durchschnittlich 84 ng/g Zellen von A β 40 aufweisen, aktivierte Thrombozyten hingegen im Durchschnitt 57 ng/g Zellen enthielten. A β 42 ist hingegen in nur sehr geringen Konzentration exprimiert: Es wurden 1,6 ng/g Zellen in ruhenden und 1,7 ng/g Zellen in aktivierten Thrombozyten gemessen (Kokjohn, Van Vickle *et al.*, 2011, Canobbio, Abubaker *et al.*, 2015).

Die physiologische Rolle von APP und A β -Peptiden in Thrombozyten ist noch nicht vollständig geklärt. APP wird zum Teil auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert, wo es als Rezeptor fungieren kann (Kang, Lemaire *et al.*, 1987, Li, Berndt *et al.*, 1994). Es ist bekannt, dass APP an Proteoglycane, Laminin, Kollagen und Integrin-ähnliche Rezeptoren binden kann. Zudem bindet fibrilläres A β spezifisch an APP (Canobbio, Abubaker *et al.*, 2015). Darüber hinaus gibt es starke Hinweise darauf, dass APP eine Rolle bei der Regulation von Thrombose und Hämostase spielt (Xu, Davis *et al.*, 2005, Xu, Previti *et al.*, 2007, Canobbio, Visconte *et al.*, 2017, Gowert, Kruger *et al.*, 2017). Lösliche APP-Fragmente, die die KPI Domäne enthalten, hemmen die Aktivität der Blutgerinnungsfaktoren IXa, XIa und Xa und in geringerem Maße den Faktor VIIa-Gewebefaktorkomplex und könnten daher in der Koagulationskaskade eine Rolle spielen, (Canobbio, Abubaker *et al.*, 2015). Eine *in vivo* Studie mit APP-knockout-Mäusen zeigte, dass APP von Thrombozyten die venöse Thromboembolie durch eine negative Regulation sowohl der Fibrinbildung als auch der Funktion von Neutrophilen begrenzt (Canobbio, Visconte *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte vor kurzem gezeigt werden, dass thrombozytäres APP ein wichtiger Rezeptor für Reelin ist, der durch die Interaktion mit Gp I b

die Thrombozytenaktivierung vermittelt und somit einen Einfluss auf die arterielle Thrombose hat (Gowert, Kruger *et al.*, 2017).

1.3.2 Veränderungen von Thrombozyten durch A β -Peptide

Viele unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass A β -Peptide in der Lage sind, Thrombozyten zu aktivieren, die Thrombozytenaggregation auszulösen sowie unterschiedliche intrazelluläre Signalwege zu induzieren (Shen, Hsiao *et al.*, 2008, Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014, Sonkar, Kulkarni *et al.*, 2014). Die Inkubation der Thrombozyten mit A β führt zur Aggregation von Thrombozyten über die Aktivierung von p38 MAPK Signalwegen, einschließlich der Aktivierung von PI3K, Akt und der zytosolischen Phospholipase A2 (cPLA2) sowie zur Produktion von Thromboxan A2. Zusätzlich wurde gezeigt, dass A β die PLC/PKC Aktivierung und die Ca²⁺ Mobilisierung stimuliert (Shen, Hsiao *et al.*, 2008, Shen, Hsiao *et al.*, 2008). Die Adhäsion von Thrombozyten wird durch A β verstärkt (Kowalska und Badellino 1994, Canobbio, Catricala *et al.*, 2013). Die Thrombozyten adhärieren auf den immobilisierten A β -Peptiden und verstärken zusätzlich die Adhäsion auf Kollagen und Fibrinogen (Canobbio, Catricala *et al.*, 2013, Sonkar, Kulkarni *et al.*, 2014). Darüber hinaus verstärkt A β die Adhäsion von Thrombozyten auf Kollagen unter Flussbedingungen (Canobbio, Catricala *et al.*, 2013, Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014). Des Weiteren zeigte Sonkar *et al.*, dass A β -Peptide die Aktivierung von Thrombozyten über eine RhoA-abhängige Reorganisation des Aktomyosins stimulieren (Sonkar, Kulkarni *et al.*, 2014). ADP scheint bei der Aktivierung von Thrombozyten durch A β -Peptide eine wichtige Rolle zu spielen. Dabei konnte gezeigt werden, dass A β einen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ und somit die Sekretion der dichten und der α -Granula induziert. Dies führt zur Freisetzung von sekundärem Mediator ADP, der die Aktivierung und die Aggregation von Thrombozyten auslöst (Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014).

1.3.3 Veränderungen von Thrombozyten bei der Alzheimer Erkrankung

Der APP-Metabolismus in Thrombozyten von AD-Patienten ist spezifisch verändert. Eine große Anzahl von Publikationen aus verschiedenen Gruppen berichtet über ein vermindertes Verhältnis der beiden wichtigsten APP Isoformen (130 kDa / 110 kDa) in Thrombozyten bei AD-Patienten (Di Luca, Pastorino *et al.*, 1996, Veitinger, Varga *et al.*, 2014). Weitere Studien zeigten, dass das verminderte APP-Isoform-Verhältnis in Thrombozyten mit dem Grad der Demenz bei AD Patienten korreliert (Baskin, Rosenberg *et al.*, 2000, Zainaghi, Talib *et al.*, 2012). Deshalb wird das veränderte APP-Verhältnis in Thrombozyten als vielversprechender

Biomarker für die Diagnose von AD diskutiert. Außerdem weisen AD- Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen eine reduzierte Expression von α -Sekretasen und eine gestiegene β -Sekretase-Aktivität in Thrombozyten auf (Canobbio, Abubaker *et al.*, 2015).

Eine weitere Veränderung in Thrombozyten bei AD- Patienten zeigt sich in der Aktivierung der Zellen. Thrombozyten von AD-Patienten weisen einen Anstieg der zirkulierenden Thrombozytenaggregate, der Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Komplexen und der Expression von P-Selektin (α -Granula Marker) in ruhenden Thrombozyten auf (Sevush, Jy *et al.*, 1998). Zusätzlich wurde eine signifikant höhere Expression von beiden Aktivierungsmarkern, aktiviertes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und P-Selektin, in Thrombozyten von AD-Patienten mit einem schnellen kognitiven Rückgang im Vergleich zu AD-Patienten mit einem langsamen kognitiven Rückgang gemessen (Stellos, Panagiota *et al.*, 2010).

Die Analysen von alten transgenen APP23 Mäusen, die mit zunehmenden Alter parenchymale und vaskuläre Plaques entwickeln, haben gezeigt, dass diese Tiere prä-aktivierte Thrombozyten in der Zirkulation aufweisen. Zusätzlich konnte in diesen Mäusen im Vergleich zu altersgleichen Wildtypen eine erhöhte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Aktivierung sowie die Expression von P-Selektion durch Agonisten *in vitro* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine verstärkte Thrombusbildung auf einer Kollagenmatrix unter Flussbedingungen *ex vivo* und eine beschleunigte Okklusion der Arteria carotis communis *in vivo* beobachtet (Jarre, Gower *et al.*, 2014).

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Aktivierung von Thrombozyten ist der erhöhte Plasmaspiegel von sogenannten „coated“ Thrombozyten bei AD-Patienten (Prodan, Ross *et al.*, 2007). „Coated“ Thrombozyten sind eine Untergruppe von aktivierten Thrombozyten, die eine hohe pro-koagulierende Aktivität nach dualer Stimulation mit den Agonisten, Kollagen und Thrombin, aufweisen (Dale 2005). Prodan *et al.* zeigten, dass der erhöhte Plasmaspiegel von „coated“ Thrombozyten mit der Progression der AD korreliert (Prodan, Ross *et al.*, 2008).

2 Zielsetzung der Arbeit

Trotz intensiver Forschung konnte bisher keine wirksame Therapie gegen Morbus Alzheimer entwickelt werden. Daher ist anzunehmen, dass mehrere Kofaktoren additiv oder synergetisch zur Entstehung der AD beitragen. Die Erkenntnisse der letzten Jahre verdeutlichen, dass nicht nur neuronale, sondern auch vaskuläre Prozesse bei der Pathogenese der AD eine Rolle spielen. Eines der charakteristischen Merkmale der vaskulären Pathologie bei AD ist die Ablagerung von A β , hauptsächlich A β 40, in Gefäßwänden, die als zerebrale Amyloidangiopathie (ZAA) bezeichnet wird. AD-erkrankte Patienten mit ZAA haben eine stärkere kognitive Beeinträchtigung als Patienten mit rein parenchymalen Amyloidablagerungen.

Die Beteiligung von Thrombozyten an der Entstehung der AD wird seit Jahren diskutiert. Thrombozyten exprimieren APP und alle für die Generierung von A β -Peptiden notwendigen Enzyme. Zusätzlich setzen Thrombozyten A β Peptide, hauptsächlich A β 40, frei. Außerdem haben Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass Thrombozyten lösliches, synthetisches A β 40 zu fibrillären Aggregaten *in vitro* modulieren können. Jedoch blieben die molekularen Mechanismen unaufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Wirkmechanismen von Thrombozyten auf das lösliche A β 40 Peptid entschlüsselt werden. Im weiteren Teil der Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit eine Inhibition der Thrombozyten *in vivo* die Bildung von amyloiden Plaques beeinflusst.

3 Ergebnisse

3.1 Blood Platelets in the Progression of Alzheimer's Disease

Nina S. Gowert, Lili Donner, Madhumita Chatterjee, Yvonne S. Eisele, Seyda T. Towhid, Patrick Münzer, Britta Walker, Isabella Ogorek, Oliver Borst, Maria Grandoch, Martin Schaller, Jens W. Fischer, Meinrad Gawaz, Sascha Weggen, Florian Lang, Mathias Jucker, Margitta Elvers

Publiziert in: *PLoS ONE*

Impact Factor: 4.17 (2014)

Eigenanteil an der Publikation: 20 %

Durchführung und Auswertung von Flusskammern, Zellkultur und Immunfluoreszenzfärbung.

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *PLoS ONE*.

Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> oder den Link des Herausgebers <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0090523> eingesehen und heruntergeladen werden.

3.2 Platelets contribute to amyloid- β aggregation in cerebral vessels through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ –induced outside-in signaling and clusterin release

Lili Donner, Knut Fälker, Lothar Gremer, Stefan Klinker, Giulia Pagani, Liza U. Ljungberg, Kimberley Lothmann, Federica Rizzi, Martin Schaller, Holger Gohlke, Dieter Willbold, Magnus Grenegard, Margitta Elvers

Publiziert in: *Science Signaling*

Impact Factor: 6.494 (2016/2017)

Eigenanteil an der Publikation: 80 %

Durchführung und Auswertung von Zellkultur, Western Blots, Immunfluoreszenzfärbung, Immunopräzipitation, Adhäsionsstudien, Analyse von GT-Patienten, FACS-Analysen, Analyse von Clusterin-defizienten Mäusen, Behandlung und Analyse von APP23 Mäusen, Mitverfassung des Manuskripts.

Die Rechte dieser Publikation liegen beim Journal *Science Signaling*.

Die Originalarbeit kann über die National Library of Medicine <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> oder den Link des Herausgebers <http://stke.sciencemag.org/content/9/429/ra52> eingesehen und heruntergeladen werden.

3.3 Relevance of C-terminal residues for amyloid- β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and amyloid- β fibril formation

Lili Donner, Lothar Gremer, Tamar Ziehm, Christoph G. W. Gertzen, Holger Gohlke, Dieter Willbold, Margitta Elvers

Eingereicht in: *Cellular Signalling*

Impact Factor: 3.93 (2016/2017)

Eigenanteil an der Publikation: 85 %

Durchführung und Auswertung von Zellkultur, Western Blots, Immunopräzipitation, Adhäsionsstudien, FACS-Analysen, Clusterin-Bestimmung, Mitverfassung des Manuskripts

Relevance of C-terminal residues for amyloid- β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and amyloid- β fibril formation

Lili Donner^a, Lothar Gremer^{b,c}, Tamar Ziehm^{b,c}, Christoph G. W. Gertzen^d, Holger Gohlke^{e,f}, Dieter Willbold^{b,c}, Margitta Elvers^{a*}

^a Department of Vascular and Endovascular Surgery, Heinrich-Heine-University University Medical Center, Moorenstraße.5, 40225 Düsseldorf, Germany. ^b Institute of Physical Biology, Heinrich-Heine-Universität, 40225 Düsseldorf, Germany. ^c Institute of Structural Biochemistry (ICS-6), Research Centre Jülich, 52425 Jülich, Germany. ^d Clinic for Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany. ^e Institute for Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Department of Mathematics and Natural Sciences, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf, Germany. ^f John von Neumann Institute for Computing (NIC), Jülich Supercomputing Centre (JSC), and Institute for Complex Systems - Structural Biochemistry (ICS-6) Research Centre Jülich, 52425 Jülich, Germany.

Word Count: 4.395

Abstract Word Count: 234

Key words: Platelets, Alzheimer's disease, clusterin, amyloid- β , cerebral amyloid angiopathy, N-terminus

*** Corresponding author:** Margitta Elvers, Ph.D., ^aDepartment of Vascular and Endovascular Surgery, Heinrich-Heine-University University Medical Center, Moorenstraße.5, 40225 Düsseldorf, Germany.

Phone: +49 (0)211 81-08851

Fax: +49 (0)211 81-17498.

Email: margitta.elvers@med.uni-duesseldorf.de

ABSTRACT

A pathological hallmark of Alzheimer's disease (AD) is the aggregation of amyloid- β peptides ($A\beta$) into fibrils, leading to deposits in cerebral parenchyma and vessels known as cerebral amyloid angiopathy (CAA). Platelets are major players of hemostasis but are also implicated in AD. Recently we provided strong evidence for a direct contribution of platelets to AD pathology. We found that monomeric $A\beta_{40}$ binds through its RHDS sequence to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, and promotes the formation of fibrillar $A\beta$ aggregates by the secretion of adenosine diphosphate (ADP) and the chaperone protein clusterin (CLU) from platelets. Here we investigated the molecular mechanisms of $A\beta$ binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ by using $A\beta_{11}$ and $A\beta_{16}$ peptides. These peptides include the RHDS binding motif important for integrin binding but lack the central hydrophobic core and the C-terminal sequence of $A\beta$. We observed platelet adhesion to truncated N-terminal $A\beta_{11}$ and $A\beta_{16}$ peptides that was not mediated by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Thus, no integrin outside-in signalling and almost no CLU release was detected. Accordingly, platelet mediated $A\beta$ fibril formation was not observed. Taken together, the RHDS motif of $A\beta$ is not sufficient for $A\beta$ binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and platelet mediated $A\beta$ fibril formation but requires other recognition or binding motifs important for platelet mediated processes in CAA. Thus, increased understanding of the molecular mechanisms of $A\beta$ binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is important to understand the role of platelets in amyloid pathology.

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder of the brain and the most common form of senile dementia. Characteristic pathological hallmarks are the accumulation of hyperphosphorylated tau (neurofibrillar tangles) and the aggregation of amyloid peptides (A β) into oligomers, proto-filaments and fibrils, leading to deposits in brain parenchyma, accompanied by an inflammatory response and damage of neurons and synapses (Glenner und Wong 1984, Glenner und Wong 1984, Selkoe 1991, Hardy und Higgins 1992, Selkoe und Hardy 2016). Additionally, A β can accumulate within the cerebral blood vessels, known as cerebral amyloid angiopathy (CAA) (Thal, Griffin *et al.*, 2008). Amyloid- β is derived from the proteolytic cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases and can be between 38 and 43 amino acids in length (LaFerla, Green *et al.*, 2007). The most abundant A β -species is A β 40 which is also the predominant isoform found in vascular plaques, whereas the dominant species in parenchymal plaques is A β 42 (Selkoe 2002, LaFerla, Green *et al.*, 2007, Thal, Griffin *et al.*, 2008, Selkoe und Hardy 2016).

Platelets are an essential part of the hemostasis response to injury and involved in pathophysiological mechanisms, leading to arterial thrombosis (Ruggeri 2002, Gawaz, Langer *et al.*, 2005). Platelets express large amounts of APP, which may contribute to more than 90 % of the circulating APP, and all of the enzymatic machinery for generation of A β -peptides (Li, Berndt *et al.*, 1994). Platelet APP may also be the primary source of amyloid β -peptides in whole blood (Chen, Inestrosa *et al.*, 1995). Several studies showed that A β peptides are able to activate platelets and to enhance platelet aggregation (Herczenik, Bouma *et al.*, 2007, Shen, Hsiao *et al.*, 2008, Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014, Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). Moreover, under both static and flow conditions the adhesion of platelets to immobilized A β was observed (Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014, Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). The analysis of transgenic mice APP23, which develop parenchymal plaques and CAA, demonstrated that platelets adhere to vascular amyloid plaques and that recruitment of platelets lead to full occlusion of vessels (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Furthermore, aged APP23 transgenic mice have platelets in a pre-activated state in the circulation. These platelets showed enhanced platelet activation upon stimulation *in vitro*, leading to a high risk of arterial thrombosis *in vivo* (Jarre, Gowert *et al.*, 2014). Recently, we have demonstrated that A β 40 binds through its N-terminal RHDS (Arg-His-Asp-Ser) sequence to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, like its natural ligand fibrinogen with its RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) motif, leading to outside-in signalling of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and the release of adenosine diphosphate (ADP) and clusterin (CLU). This process is amplified via P2Y₁₂ receptors (Donner, Falker *et al.*, 2016). CLU is a chaperon protein and influences the structure and toxicity of A β peptides (Matsubara, Frangione *et al.*, 1995, Oda, Wals *et al.*, 1995, Yerbury, Poon *et al.*, 2007). It has been showed that platelets are able to modulate soluble synthetic A β 40 into

fibrillar structures; inhibition of $\alpha_{IIb}\beta_3$ or the ADP/P2Y₁₂ signalling pathway prevents this process *in vitro*. Moreover, pharmacological blocking of P2Y₁₂ decreased CAA in APP23 transgenic mice *in vivo* (Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). Interestingly, A β 40 peptides with mutated RHDS sequence did not induce platelet aggregation, phosphorylation of phospholipase (PL)C γ 2 or CLU release and thus are not modulated into A β fibrils in cell culture. Taken together, platelets might play an important role in A β pathology and in the progression of plaque formation in CAA.

Here, we investigated the effects of truncated A β peptides on integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding and outside-in signalling in platelets. We used the A β peptides A β 11 and A β 16 that include the N-terminal R₅H₆D₇S₈ sequence known to be responsible for integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding but not the central hydrophobic core and C-terminal part of A β 40. Our findings indicate that the RHDS domain of A β is not sufficient for A β binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, integrin outside-in signalling and platelet-mediated A β fibril formation;

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and reagents

Soluble A β (1-40) H-1194, soluble A β (1-16), soluble A β (1-11), soluble A β (25-35). All peptides were purchased from Bachem. Stock solutions with a concentration of 1 mg/mL were solved in a sterile dH₂O and stored at -20 °C. Platelets were activated by ADP (Sigma-Aldrich) and thrombin (Roche).

2.2 Human platelet preparation

Fresh ACD-anticoagulated human blood was collected from healthy volunteers between the age of 18 and 50 years. After centrifugation at 200 g for 10 min, the supernatant (platelet-rich plasma) was added to phosphate buffered saline (PBS) (pH 6.5, apyrase (2.5 U/mL) 1 μ M PGI₂) in 1:1 volumetric ratio and then centrifuged at 1000 x g for 6 min. The washed platelets were finally suspended in Tyrod's solution (pH 7.4).

2.3 Immunoprecipitation

Platelet suspensions (400x10⁶ platelets/mL) were stimulated with 20 μ M A β -peptides as indicated and then lysed. The samples were incubated with β 3-integrin antibody (Luc.H11, Emfret Analytics) and finally incubated with G-Sepharose overnight at 4° C. The immuno complexes recovered on beads were washed three times with cell lysis buffer before addition of Laemmli sample buffer. Immunoblotting was performed as indicated. Antibody 4G10 (Millipore) was used to analyse tyrosine phosphorylation of the β 3-Integrin subunit. The same membrane was reprobed with anti- β 3-integrin antibody (Luc.H11, Emfret Analytics).

2.4 Clusterin quantification

The human platelets (2x10⁶ platelets per 150 μ l of medium) were stimulated with 5 μ M A β peptides for 1 min at RT. The reaction was stopped by the addition of apyrase (2 U/mL) and the suspension was centrifuged at 659 g for 5 min. The Clusterin levels in the supernatant were measured using an ELISA kit (human CLU ELISA, DCLU00, R &D Systems) according to the manufacturer's protocol.

2.5 Platelet culture

Human platelets (2×10^6 platelets per 150 μ l of medium) were incubated for 1 h with 10 μ M A β peptides. Finally, 5 μ M A β 40 were added to the platelet culture for 3 days. After incubation, unbound human platelets were removed by rinsing with PBS. Finally, adherent platelets were fixed with 2 % paraformaldehyde and stained for A β aggregates with Congo red according to the manufacturer's protocol (Merck).

2.6 Western blot analysis for Clusterin, Syk and PLC γ 2

The sample preparation and western blot analysis was generally undertaken as previously described (Donner, Falker *et al.*, 2016).

2.7 Platelets adhesion on immobilized A β

Synthetic A β 40 (200 μ g/mL), A β 11 (200 μ g/mL), A β 16 (200 μ g/mL) and A β 25-35 (200 μ g/mL) and collagen (200 μ g/mL) were immobilized overnight and then blocked with 1% BSA solution for at least 60 min. Platelet counts were adjusted to 10×10^5 platelets/mL. Where indicated, platelets were pre-incubated with ReoPro for 15 min at room temperature. Platelet adhesion was counted per visual field.

2.8 Flow cytometry

Flow cytometry analysis of human platelet activation was performed using fluorophore-labeled antibodies. 5 μ L of whole blood was immediately added to tube containing buffer and a mixture of saturated antibodies, CD62P-PE (P-selectin marker, BD Biosciences) and PAC1-FITC (activated GP IIb/IIIa receptor marker, BD Biosciences), and agonists (ADP, A β -peptides). After incubation at room temperature for 15 min, the reaction was stopped by the addition of PBS, and samples were immediately analysed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). For analysis of fibrinogen binding washed platelets were mixed with human labeled-fibrinogen (Sigma-Aldrich).

2.9 Biolayer interferometry (BLI)

BLI experiments were performed on an Octet RED96 instrument with immobilized A β and purified integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ as described before (Donner, Falker *et al.*, 2016). N-biotinylated A β (1-40) (Bachem) and fragments F1 (A β 1-15), F2 (A β 6-20), F3 (A β 11-25)) and F5 (A β 21-35) (peptides&elephants) were dissolved in HFIP and lyophilized to destroy any preexisting aggregates. For immobilization on Super Streptavidin sensor tips (SSA), A β 1-40 and F1 were dissolved in PBS to a final concentration of 50 μ g/mL and loaded to a level of 5 nm (A β 1-40) and 0.9 nm (F1). F2, F3 and F5 were dissolved in DMF (1 mg/mL), diluted in PBS to a final concentration of 200 μ g/mL and loaded to a level between 0.5 nm and 1.4 nm. Ligand sensors and a control sensor were quenched with 50 μ g/mL biotin. Direct binding of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ to A β (1-40) and fragments was measured in 50 mM tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.2% (w/v), Triton X-100 (pH 7.3) with a constant integrin concentration 2 μ M. For evaluation, non-specific binding of integrin to the control sensor was subtracted from ligand sensors. As a loading control for A β fragments, following anti-A β antibodies were used: 6E10 (BioLegend) for F1, NAB228 (Sigma-Aldrich) for F2, 4G8 (BioLegend) for F3 and BAM90.1 (Sigma-Aldrich) for F5. Binding of 500 nM of the respective antibody was recorded in PBS.

2.10 Molecular dynamics simulations

The starting structures were prepared similar to our previous study (Donner, Falker *et al.*, 2016) with the following differences. Starting structures for molecular dynamics (MD) simulations of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in the bent, closed form representing the inactive state bound to A β 40 variants were obtained from the coordinates of the X-ray structure of the ectodomain of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Protein Data Bank (PDB) ID: 3FCS), truncated to the propeller, β A, and hybrid domains, and the nuclear magnetic resonance structure of A β 40 with helical secondary structure in the central core and towards the C-terminus (PDB ID: 1BA4). Coordinates of a peptidic RGD motif were taken from the X-ray structure of the integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ headpiece bound to a chimeric fibrinogen γ chain peptide (PDB ID: 2VDQ) and served to place A β 40 via its RHD motif into the binding region between the propeller and β A domains. The A β 40 peptides were subsequently C-terminally truncated to generate the A β 11 and A β 16 peptides. Each starting structure was subjected to three replicates of all-atom MD simulations of 150 ns length each in explicit solvent.

MD simulations were performed with the AMBER 17 suite of programs (Case, Cheatham *et al.*, 2005), together with the ff14SB force field (Maier, Martinez *et al.*, 2015). For metal ions,

the Li-Merz parameters were used (Li, Song *et al.*, 2015). Na⁺ counter ions were added to neutralize the total charge of the system using Leap. The resulting system of ~300,000 atoms was placed into an octahedral period box of TIP3P water molecules (Jorgensen, Chandrasekhar *et al.*, 1983) with a distance of at least 12 Å between the edges of the water box and the closest atom of the protein. Before launching the production phase of MD simulations, each system was minimized by 50 steps of steepest descent minimization followed by 450 steps of conjugate gradient minimization. The particle mesh Ewald method (Darden, York *et al.*, 1993) was used to treat long-range electrostatic interactions, and bond lengths involving bonds to hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm (Ryckaert, Ciccotti *et al.*, 1977). The time step for the MD simulations was 2 fs with a direct space, non-bonded cut-off of 8 Å. Applying harmonic restraints with force constants of 5 kcal mol⁻¹ Å⁻² to all solute atoms, NVT-MD was carried out for 50 ps, during which the system was heated from 100 to 300 K. Subsequent NPT-MD was used for 150 ps to adjust the solvent density. Finally, the force constant of the harmonic restraints on solute atom positions were gradually reduced to zero during 100 ps of NVT-MD. The following 150 ns of NVT-MD at 300 K with a time constant of 10 ps for heat bath coupling were used for analysis, with conformations extracted every 20 ps.

The presence of the interaction between D224 and R5 was analysed with the distance and angle-dependent “hbond” command of cpptraj (Roe und Cheatham 2013). For the data from MD simulations, the standard error in the mean (SEM) was calculated from the standard deviation (SD) of the means of the three replicas, with $SEM = SD / (3^{1/2})$.

3. Results

3.1 Platelets adhere to Aβ11 and Aβ16

Recent studies demonstrated that platelets adhere to immobilized Aβ40, Aβ42 and Aβ25-35 (Canobbio, Catricala *et al.*, 2013, Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). To investigate the adhesion of platelets to truncated Aβ peptides that include the N-terminal residues of Aβ but not the C-terminal end, we immobilized Aβ11 and Aβ16 on coverslips and used immobilized Aβ40 and collagen as controls. As shown in Fig. 1A, platelets are able to adhere to the truncated Aβ peptides Aβ11 and Aβ16. The number of adherent platelets was comparable to experiments where Aβ40 and collagen were immobilized (Fig. 1B). Aβ25-35 was used as control because this Aβ peptide does not include the binding motif RHDS of Aβ40. However, platelets do adhere to immobilized Aβ25-35 as well (Fig. 1C and D) suggesting that

A β binding to platelets can occur via different receptors or different mechanisms at the platelet membrane.

3.2 Effects of different amyloid- β peptides on phosphorylation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, PLCy2 and SYK

We have recently demonstrated that A β 40 binds to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and induces outside-in signalling, including the phosphorylation/activation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ followed by the activation of signalling molecules such as Syk and PLCy2 (Donner, Falker *et al.*, 2016). Here, we investigated the ability of A β 11 and A β 16 to induce integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediated outside-in signalling in platelets. The A β -dependent phosphorylation of the β_3 subunit was investigated by immunoprecipitation (Fig. 2A). Western blot analysis with phospho-specific antibody shows that A β 11 and A β 16 are not able to induce phosphorylation of the β_3 subunit of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. In line with these results, the phosphorylation of PLCy2 and SYK was abolished in response to A β 11 and A β 16 but still detected with A β 40 (Fig. 2B and C) as already published before (Donner, Falker *et al.*, 2016).

3.3 Reduced Clusterin release upon treatment with A β 11 or A β 16

A β 40 binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ induces the release of CLU from platelets, important for platelet mediated A β fibril formation. Thus, treatment of CLU-deficient platelets with A β 40 resulted in significantly reduced platelet-mediated A β fibril formation in cell culture compared to control platelets (Donner, Falker *et al.*, 2016). To investigate whether A β 11 or A β 16 are able to induce CLU release from platelets, we stimulated platelets with A β peptides and measured the amount of secreted CLU by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Stimulation of platelets with thrombin and A β 40 served as positive controls. As shown in Fig. 3A and B, release of CLU was observed when we stimulated platelet with A β 11 and A β 16 compared to non-stimulated platelets; however the amount of secreted CLU was reduced compared to A β 40 stimulation without reaching statistical significance. Western blot experiments confirmed the release of CLU from platelets upon stimulation with truncated A β 11 and A β 16 peptides. In contrast, platelet stimulation with A β peptides that did not include the RHDS binding motif (A β 25-35) showed significantly reduced CLU release (Fig. 3C).

3.4 Effects of A β 11 and A β 16 on platelet activation

A β induced platelet activation and aggregation was already shown by several authors in the past (Shen, Hsiao *et al.*, 2008, Canobbio, Catricala *et al.*, 2013, Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). However, treatment of platelets with A β 40 alone did not induce integrin inside-out activation or degranulation as measured by the exposure of P-selectin at the platelet membrane but enhances platelet activation following ADP stimulation (Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). Therefore, we analysed the ability of N-terminal A β peptides to stimulate platelet activation using flow cytometry. To determine integrin inside-out activation, we measured the binding of fibrinogen following ADP stimulation with and without A β 11 and A β 16. As shown in Fig. 4A, integrin activation was not enhanced when platelets were stimulated with ADP and A β 11 and A β 16, respectively, compared to ADP alone, whereas A β 40 was observed to increase fibrinogen binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ upon ADP stimulation of platelets and served as positive control (Fig. 4A). In line with these results, P-selectin exposure as marker for α -granule release was enhanced when ADP-stimulated platelets were treated with A β 40 but not with A β 11 and A β 16 (Fig. 4B). Treatment of platelets with A β 25-35 that lacks the RHDS binding motif and thus is not able to bind to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ also fails to potentiate platelet activation upon ADP stimulation of platelets (Fig. 4C-E).

3.5 A β 11 and A β 16 binding to platelets does not affect platelet mediated A β 40 fibril formation in platelet cell culture

We have previously reported that platelets modulate soluble A β 40 peptides into fibrillar A β structures leading to fibril A β aggregate formation in cell culture (Gowert, Donner *et al.*, 2014, Donner, Falker *et al.*, 2016). To investigate the mechanism of platelet-induced A β fibril formation and the impact of different A β residues in more detail, we incubated platelets with soluble, synthetic A β 11 and A β 16 peptides for 3 days and analysed A β aggregate formation by Congo red staining. Incubation of platelets with soluble A β 40 served as positive control. Surprisingly, we did not detect any Congo red positive A β deposits in the presence of A β 11 or A β 16 in platelet cell culture (Fig. 5A, left panel). Incubation of platelets with A β 25-35 did not induce A β aggregate formation either (Fig. 5A, right panel), but –in contrast to A β 11 and A β 16– lacks the RHDS binding motif and thus is probably not able to bind to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ to induce outside-in signalling and ADP/CLU release.

We recently demonstrated that binding of A β 40 with its N-terminal RHDS sequence to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ leads to aggregate formation of A β 40 at least *in vitro* (Donner, Falker *et al.*, 2016).

We now explored whether the truncated A β peptides A β 11 and A β 16 that lack the C-terminus of A β 40 are able to block binding of A β 40 to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Time-equal addition of A β 40 and A β 11 or A β 16 to platelet culture (Fig. 5B) as well as the pre-incubation of platelets with A β 11 or A β 16 for 1h did not prevent the formation of fibrillar A β 40 deposits in platelet cell culture (Fig. 5C). Moreover, dose-responses of A β 11 did not reduce aggregate formation when platelets were pre-treated with A β 11 for 1 h before incubation with A β 40 for three days (Fig. 5D).

3.6 RHDS containing A β 1-16 peptide does not bind to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

Platelet adhesion to different immobilized A β peptides was investigated using ReoPro to block A β binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ to avoid A β fibril formation as previously reported (Donner, Falker *et al.*, 2016). Whereas treatment of platelets with the integrin inhibitor ReoPro significantly reduced platelet adhesion to A β 40, no differences were observed when platelets were allowed to adhere to A β 11, A β 16 or A β 25-35 suggesting that binding of these truncated A β peptides to platelets is mediated by other receptors than integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. 6A). To confirm this hypothesis, kinetic analysis by bio-layer interferometry (BLI) was performed to analyse direct binding of truncated A β peptides to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. As shown in Fig. 6B, A β 40 was able to bind to purified integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ as already reported previously (Donner, Falker *et al.*, 2016). In contrast, truncated A β peptides did not show any binding signal to purified integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. 6B) confirming that A β peptides that lack the C-terminus of A β 40 (F1=A β 1-15) as well as A β peptides without RHDS sequence (F2=A β 6-20), F3=A β 11-25, F5=A β 21-35) do not bind to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. As loading controls for A β fragments, following anti-A β antibodies were used: 6E10 (BioLegend) for F1, NAB228 (Sigma-Aldrich) for F2, 4G8 (BioLegend) for F3 and BAM90.1 (Sigma-Aldrich) for F5. Binding of 500 nM of the respective antibody was recorded in PBS (Fig. S1).

3.7 Differences in interactions of A β peptides with platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$

A β peptide binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ was investigated by molecular dynamics (MD) simulations, starting from A β 11, A β 16, or A β 40 peptides in complex with the propeller, β A, and hybrid domains of $\alpha_{IIb}\beta_3$, respectively, as done previously (Donner, Falker *et al.*, 2016). Of note, these starting structures were identical except for the missing C-terminal parts in A β 11 and A β 16 to prevent any bias in the simulations (Fig. S2). While a complete unbinding of the peptides, in particular breaking of the interactions between D7 and Mg²⁺ at the metal-ion dependent

adhesion site (MIDAS), cannot be expected on the time scale of the simulations (Ohtaki und Radnai 1993), local structural changes may provide an indication of differences in the interactions between the peptides and $\alpha_{IIb}\beta_3$. As such, A β 11 and A β 16 quickly lost the salt bridge interaction between R5 of the peptides and D224 of the β_3 subunit during the simulations, resulting in an average occupancy of $43 \pm 0.76\%$ (mean $\pm$ SEM) and $4.32 \pm 0.82\%$ across the three replicates, respectively (Figure 6C; Fig. S3 A and B). In contrast, A β 40 maintains this interaction throughout the simulations to, on average, $99.78 \pm 0.12\%$ (Figure 6D, Fig. S3 C). This salt bridge interaction has been found crucial for peptide binding to the head region of integrin before (Gohlke, Schmitz *et al.*, 2013). In conjunction with this, the structural deviation of the N-terminal part up until residue 6 of A β 11 and A β 16 raises to an RMSD of 7.08 ± 1.12 Å and 6.35 ± 0.83 Å, respectively, whereas that of A β 40 is 5.81 ± 0.54 Å (Fig. S4). Together, our results suggest that A β 11 and A β 16 do not establish crucial interactions of the N-terminal part with $\alpha_{IIb}\beta_3$, in contrast to A β 40, despite the presence of the RHDS binding motif.

The MD simulations provide a glimpse into a possible reason for this difference: during the simulations, the C-terminus of A β 40 bends towards the propeller domain (Figure 6C, Fig. S4), establishes interactions with it (Figure 6C), and covers the region around R5 of the peptide and D224 $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Figure 6C, Figures S5); this new conformation stays for the remainder of the simulations (Fig. S4). Shielding the R5/D224 salt bridge from solvent (Fig. S6) likely contributes to its interaction strength (Nussinov und Kumar 2000). Together, these results may explain how the C-terminal part of A β 40, which is lacking in A β 11 and A β 16, can help establishing crucial interactions of the N-terminal part with $\alpha_{IIb}\beta_3$ and contribute to the overall binding strength of that peptide.

4. Discussion

The present study demonstrates that platelets are able to adhere to immobilized truncated N-terminal A β 11 and A β 16, but do not induce integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mediated outside-in signalling in platelets. Accordingly, platelet mediated A β fibril formation was not observed. Mechanistically, A β 11 and A β 16 peptides bind to a yet unknown receptor on platelets but not to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ although their sequence includes the binding motif RHDS of A β 40. Taken together, this study suggests that the C-terminal part upstream of amino acid 17 of A β 40 is important for integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding and subsequent integrin outside-in signalling of platelets and platelet-mediated A β fibril formation.

Adhesion of platelets to A β 11 and A β 16 indicated that the first 11 amino acids of A β 40 that include the RHDS motif are sufficient to allow A β binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Donner, Falker *et al.*, 2016). However, no integrin outside-in signalling was detected as already observed with the mutated A β peptides A β 40_{scrambled} and A β 40_{inverted} (Donner, Falker *et al.*, 2016). The lack of outside-in signalling was due to the fact that platelets do not bind to A β 11 and A β 16 via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ as shown by adhesion studies using ReoPro to block integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and BLI experiments, and supported by MD simulations. Thus, incubation of platelets with A β 11 and A β 16 does not prevent platelet mediated A β fibril formation in the presence of A β 40 (Fig. 5). The receptor or mechanism how platelets bind to A β 11 and A β 16 is yet unknown but excludes protein phosphorylation and platelet mediated A β fibril formation. In contrast, A β 25-35 did not include the RHDS binding motif responsible for A β binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Thus, it was not surprising that ReoPro fails to reduce platelet binding to A β 25-35. However, platelets do adhere to A β 25-35 to a yet unknown receptor as well. Furthermore, Canobbio and colleagues demonstrated that incubation of platelets with this peptide induces granule secretion and ADP release (Canobbio, Guidetti *et al.*, 2014). Here, we never observed phosphorylation of platelet proteins or P-selectin exposure solely induced by A β 25-35 or following ADP stimulation. Moreover, we found that A β 25-35 is not able to induce platelet mediated A β fibril formation in cell culture which is probably due to the fact that A β 25-35 binding to platelets is not mediated by integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. Thus A β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is a fundamental process for platelet mediated A β fibril formation *in vitro* and probably platelet mediated processes upon CAA formation *in vivo*.

However, the RGD (Arg-Gly-Asp) recognition sequence of the natural ligand of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ fibrinogen is sufficient to allow binding of RGD peptides to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. The RGD motif was first discovered in fibronectin but later found in many other extracellular matrix proteins such as laminin, vitronectin, thrombospondin etc. (Ruoslahti 1996). This conserved motif efficiently serves as attachment site for the α and β subunits of integrins (Ruoslahti 1996). While platelets are able to bind to RGD peptides, the incubation of soluble RGD inhibits fibrinogen binding and platelet activation and thus might be a promising therapeutic target for thrombosis and cancer (Ruoslahti 1996) but also blocks Cdc42 activation and inhibits cell polarity (Etienne-Manneville und Hall 2001). RGD-based antagonists of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ are widely used as antithrombotic agents such as eptifibatide and tirofiban (Hanson, de Leval *et al.*, 2004). Here we provided evidence that A β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is not solely mediated by the RHDS motif of A β . This might be due to the differences in the recognition motif of A β (RHDS) and fibrinogen (RGDS) suggesting that further recognition sites in the A β peptide are needed for robust integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binding at the platelet surface. It is well known that platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binds to a KQAGDV motif at the fibrinogen γ -chain C-terminus beside the RGD motif present in loops of many extracellular matrix proteins (Lin, Zhu *et al.*, 2016). The AGDV

tetrapeptide of the KQAGDV motif binds to the $\alpha_{IIb}\beta_3$ headpiece with comparable affinity known from the RGDS peptide and induces complete headpiece opening in solution (Lin, Zhu *et al.*, 2016). Surprisingly, A β 40 peptides include an AGDV-like motif in terms of the amino acids AEDV (represents amino acids 21-24 of A β). Thus, although we did not observe a direct interaction in our MD simulations, probably because of too short simulation times for them to establish from the starting structures, it is tempting to speculate that this additional recognition motif is crucial for A β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Beside the integrin recognition motifs of A β 40, the C-terminus of the peptide was described to be essential for oligomerization of A β . Thus, besides missing the recognition motif AEDV (amino acid 21-24 of A β), other mechanisms might be responsible for failure of platelet mediated A β fibril formation in cell culture of platelets incubated with A β 11 and A β 16, respectively. Already in the early nineties, Maruyama and colleagues suggested that the formation of amyloid fibril is an inherent characteristic of the C-terminal peptide of APP (Maruyama, Terakado *et al.*, 1990). This observation led to the generation of IgG antibodies raised against the C-terminus of A β . Chronic intranasal treatment with an anti- A β 30-42 scFv antibody ameliorated amyloid pathology in Alzheimer transgenic mice suggesting that A β directed immunotherapy can reduce A β deposition in brain vessels and parenchyma (Cattapoel, Hanenberg *et al.*, 2011).

However, not only the C-terminus of A β plays an important role for A β pathology. In recent years, several authors have demonstrated that N-terminal sequences of neurotoxic A β oligomers are implicated in causing AD (Jonsson, Atwal *et al.*, 2012, Welzel, Maggio *et al.*, 2014, Murray, Sorci *et al.*, 2016, Murray, Sharma *et al.*, 2017). Murray *et al.*, showed an altered aggregate morphology of N-terminal mutants leading to an increased aggregation lag time prior to the onset of fibril formation compared with wildtype A β (Murray, Sorci *et al.*, 2016). Moreover, the N-terminal residues Arg₅, Asp₇, and Ser₈ of A β 40 form important interfilament contacts necessary to stabilize the overall fibril structure of threefold symmetry, whereas N-terminal truncated A β (9-40) was less stable (Soldner, Sticht *et al.*, 2017). Interestingly, the N-terminus of A β negatively effects the long-term potentiation (LTP). LTP deficit was effectively prevented by blocking the N-terminus with sequence specific antibodies compared to blocking of the central hydrophobic core and C-terminus (Willem, Tahirovic *et al.*, 2015, Murray, Sorci *et al.*, 2016). Additionally, McLaurin *et al.*, showed that beneficial effects in mice arise from antibodies selectively directed against N-terminal residues 4–10 of A β , and that these antibodies inhibit both A β , fibrillogenesis and cytotoxicity (McLaurin, Cecal *et al.*, 2002).

Taken together, the RHDS motif of A β is not sufficient for A β binding to platelet integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, integrin outside-in signalling and platelet mediated A β fibril formation. Rather, other recognition and/or C-terminal sequence motifs are required. Thus, an increased understanding of A β binding to platelets and related platelet mediated cellular processes is important to scrutinize the role of platelets in amyloid pathology.

5. Conclusions

1. Platelets adhere to the truncated A β peptides A β 11 and A β 16 independent of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
2. N-terminal A β 11 and A β 16 are not able to induce outside-in signalling
3. Treatment of platelets with A β 16 and A β 11 does not lead to the formation of toxic A β fibrils in platelet cell culture
4. Other recognition or binding motifs of A β peptides are required for binding of A β peptides to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, integrin outside-in signalling and platelet-mediated amyloid fibril formation

REFERENCES

1. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **122**(3): p. 1131-5.
2. Glenner, G.G. and C.W. Wong, *Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **120**(3): p. 885-90.
3. Hardy, J.A. and G.A. Higgins, *Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis*. Science, 1992. **256**(5054): p. 184-5.
4. Selkoe, D.J., *The molecular pathology of Alzheimer's disease*. Neuron, 1991. **6**(4): p. 487-98.
5. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 595-608.
6. Thal, D.R., et al., *Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(6): p. 599-609.
7. LaFerla, F.M., K.N. Green, and S. Oddo, *Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 499-509.
8. Selkoe, D.J., *Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease*. J Clin Invest, 2002. **110**(10): p. 1375-81.
9. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
10. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
11. Li, Q.X., et al., *Membrane-associated forms of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in human platelet and brain: surface expression on the activated human platelet*. Blood, 1994. **84**(1): p. 133-42.
12. Chen, M., et al., *Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **213**(1): p. 96-103.
13. Gowert, N.S., et al., *Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e90523.
14. Shen, M.Y., et al., *Amyloid beta peptide-activated signal pathways in human platelets*. Eur J Pharmacol, 2008. **588**(2-3): p. 259-66.
15. Herczenik, E., et al., *Activation of human platelets by misfolded proteins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(7): p. 1657-65.

16. Canobbio, I., et al., *Amyloid beta-peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca²⁺ and ADP in aggregation and thrombus formation*. Biochem J, 2014. **462**(3): p. 513-23.
17. Donner, L., et al., *Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin α IIb β 3-induced outside-in signalling and clusterin release*. Sci Signal, 2016. **9**(429): p. ra52.
18. Jarre, A., et al., *Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease*. Cell Signal, 2014. **26**(9): p. 2040-50.
19. Oda, T., et al., *Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress*. Exp Neurol, 1995. **136**(1): p. 22-31.
20. Matsubara, E., B. Frangione, and J. Ghiso, *Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7563-7.
21. Yerbury, J.J., et al., *The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2312-22.
22. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. J Comput Chem, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
23. Maier, J.A., et al., *ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015. **11**(8): p. 3696-3713.
24. Li, P.F., L.F. Song, and K.M. Merz, *Parameterization of Highly Charged Metal Ions Using the 12-6-4 LJ-Type Nonbonded Model in Explicit Water*. Journal of Physical Chemistry B, 2015. **119**(3): p. 883-895.
25. Jorgensen, W.L., et al., *Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water*. Journal of Chemical Physics, 1983. **79**(2): p. 926-935.
26. Darden, T., D. York, and L. Pedersen, *Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems*. Journal of Chemical Physics, 1993. **98**(12): p. 10089-10092.
27. Ryckaert, J.P., G. Ciccotti, and H.J.C. Berendsen, *Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes*. Journal of Computational Physics, 1977. **23**(3): p. 327-341.

28. Roe, D.R. and T.E. Cheatham, *PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2013. **9**(7): p. 3084-3095.
29. Canobbio, I., et al., *Immobilized amyloid Abeta peptides support platelet adhesion and activation*. FEBS Lett, 2013. **587**(16): p. 2606-11.
30. Ohtaki, H. and T. Radnai, *Structure and Dynamics of Hydrated Ions*. Chemical Reviews, 1993. **93**(3): p. 1157-1204.
31. Gohlke, H., et al., *$\alpha_5\beta_1$ -Integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes*. Hepatology, 2013. **57**: p. 1117–1129.
32. Nussinov, R. and S. Kumar, *Salt bridge stability in monomeric proteins*. Biophysical Journal, 2000. **78**(1): p. 425a-425a.
33. Ruoslahti, E., *RGD and other recognition sequences for integrins*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 697-715.
34. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ* . Cell, 2001. **106**(4): p. 489-98.
35. Hanson, J., et al., *Progress in the field of GPIIb/IIIa antagonists*. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2004. **2**(2): p. 157-67.
36. Lin, F.Y., et al., *beta-Subunit Binding Is Sufficient for Ligands to Open the Integrin α IIb β 3 Headpiece*. J Biol Chem, 2016. **291**(9): p. 4537-46.
37. Maruyama, K., et al., *Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor*. Nature, 1990. **347**(6293): p. 566-9.
38. Cattapoel, S., et al., *Chronic intranasal treatment with an anti-A β (30-42) scFv antibody ameliorates amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18296.
39. Murray, B., et al., *A2T and A2V A β peptides exhibit different aggregation kinetics, primary nucleation, morphology, structure, and LTP inhibition*. Proteins, 2016. **84**(4): p. 488-500.
40. Jonsson, T., et al., *A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline*. Nature, 2012. **488**(7409): p. 96-9.
41. Murray, B., B. Sharma, and G. Belfort, *N-Terminal Hypothesis for Alzheimer's Disease*. ACS Chem Neurosci, 2017. **8**(3): p. 432-434.

42. Welzel, A.T., et al., *Secreted amyloid beta-proteins in a cell culture model include N-terminally extended peptides that impair synaptic plasticity*. *Biochemistry*, 2014. **53**(24): p. 3908-21.
43. Soldner, C.A., H. Sticht, and A.H.C. Horn, *Role of the N-terminus for the stability of an amyloid-beta fibril with three-fold symmetry*. *PLoS One*, 2017. **12**(10): p. e0186347.
44. Willem, M., et al., *eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus*. *Nature*, 2015. **526**(7573): p. 443-7.
45. McLaurin, J., et al., *Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1263-9.

Contributors

L.D., L. G., T. Z. performed experiments and analysed the data; H.G., C.G.W.G. performed and analysed molecular modelling and MD simulations, D.W., L.D. and M.E. discussed data. L.D. and M.E. wrote the manuscript with contributions by C.G.W.G. and H.G.

Conflict-of-interest disclosure

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments: The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), grant number EL651/5-1 to M.E. H.G. is grateful for computational support and infrastructure provided by the “Zentrum für Informations- und Medientechnologie” (ZIM) at the Heinrich Heine University Düsseldorf and the computing time provided by the John von Neumann Institute for Computing (NIC) on the supercomputer JURECA at Jülich Supercomputing Centre (JSC) (user ID: HKF7).

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Platelets adhere to the truncated A β peptides A β 11 and A β 16. (A) Representative images of platelet adhesion to immobilized A β 40, A β 16 and A β 11 under static conditions. Collagen-immobilized coverslips served as positive control. (B) Quantification of adherent platelets per visual field. (C-D) Platelet adhesion to immobilized A β 25-35 that lacks the integrin RHDS binding motif serves as negative control. Bar graphs depict mean values $\pm$ SD (n = 4). ***p < 0.001.

Fig. 2. Treatment of platelets with A β 11 and A β 16 does not induce phosphorylation of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, SYK and PLCy2. Platelets were stimulated with 20 μ M A β 40, 20 μ M A β 16 or 20 μ M A β 11. Stimulated platelets were immunoprecipitated with anti- β_3 integrin antibody (A). Phosphorylation of immunoprecipitated β_3 integrin was evaluated with the anti-phosphotyrosine (p-tyrosine) antibody 4G10. The level of immunoprecipitated protein was detected with anti- β_3 integrin antibody. (B-C) Representative Western blots of phosphorylated PLCy2 (B) and SYK (C) after stimulation of platelets with different A β peptides (n=4).

Fig. 3. Reduced Clusterin release of platelets after treatment with A β 11 or A β 16. (A) The release of CLU upon stimulation with 5 μ M A β 40, A β 11 or A β 16 for 1 min was investigated using ELISA (A, n=7) or Western blot analysis (B). Representative Western blot of supernatant of platelets after stimulation with indicated peptides using anti-CLU antibody (n=3). (C) CLU release from platelets after stimulation of platelets with A β 25-35. Stimulation of platelets with thrombin served as positive control. *p<0.05, ***p<0.001, n.s.=not significant.

Fig. 4. A β 11 and A β 16 do not potentiate ADP induced platelet activation. Integrin activation as measured by fibrinogen binding to platelets (A) and degranulation of α -granule release by exposure of P-selectin (B) following stimulation of platelets with 50 μ g/ml A β 40 (positive control), 50 μ g/ml A β 11 or 50 μ g/ml A β 16 in the absence or presence of 5 μ M ADP was investigated by flow cytometry. (C-E) A β peptide without RHDS binding motif (A β 25-35) is not able to increase ADP-induced platelet activation, neither P-selectin exposure (C) nor integrin activation (D-E) as measured by PAC1 (integrin antibody that only binds to activated integrins, D) and fibrinogen binding (E). n=4 *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, n.s.=not significant.

Fig. 5. Treatment of platelets with A β 16 and A β 11 does not lead to the formation of toxic A β fibrils in platelet cell culture. (A) Congo red staining of amyloid fibrils after incubation with soluble, synthetic A β peptides for 3 days. Incubation of platelets with A β 40 served as positive control. (B-D) Treatment of platelets with A β 11 or A β 16 does not avoid platelets mediated aggregation of soluble A β 40. (B) Time-equal addition of 5 μ M A β 40 and 10 μ M A β 11 or 10 μ M A β 16 to platelet culture. (C) Platelets were pre-incubated with 10 μ M A β 11 or A β 16 for 1 h, followed by the addition of 5 μ M A β 40. (D) Platelets were pre-incubated with different concentration of A β 11 for 1 h, followed by the addition of 5 μ M A β 40. Scale bars, 50 μ m. n=3.

Fig. 6. Lack of the C-terminus of the A β peptides Abeta1-16 avoids binding to integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. (A) Platelet adhesion to different immobilized A β peptides with and without RHDS motif in the presence and absence of the integrin inhibitor ReoPro. n=4. (B) Binding of purified integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (2 μ M) to immobilized A β fragments F1 (A β 1-15), F2 (A β 6-20), F3 (A β 11-25), F5 (A β 21-35) and A β 1-40 (positive control) was measured by BLI. (C) Closest-to-the-average structure of A β 11 at the propeller and β A domains of $\alpha_{IIb}\beta_3$. The interaction between D224 of the propeller domain and R5 of A β 11 is lost in the course of MD simulations (Fig. S3). (D) Closest-to-the-average structure of A β 40 binding to the propeller and β A domains of $\alpha_{IIb}\beta_3$. The C-terminus of A β 40 bridges both domains, covers the region around R5 of the peptide and D224 of $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Fig. S6), and the salt bridge interaction between R5 and D224 is maintained (Fig. S3). Metal ions are shown as spheres. Results are representative for three independent measurements. **p<0.01.

Figures

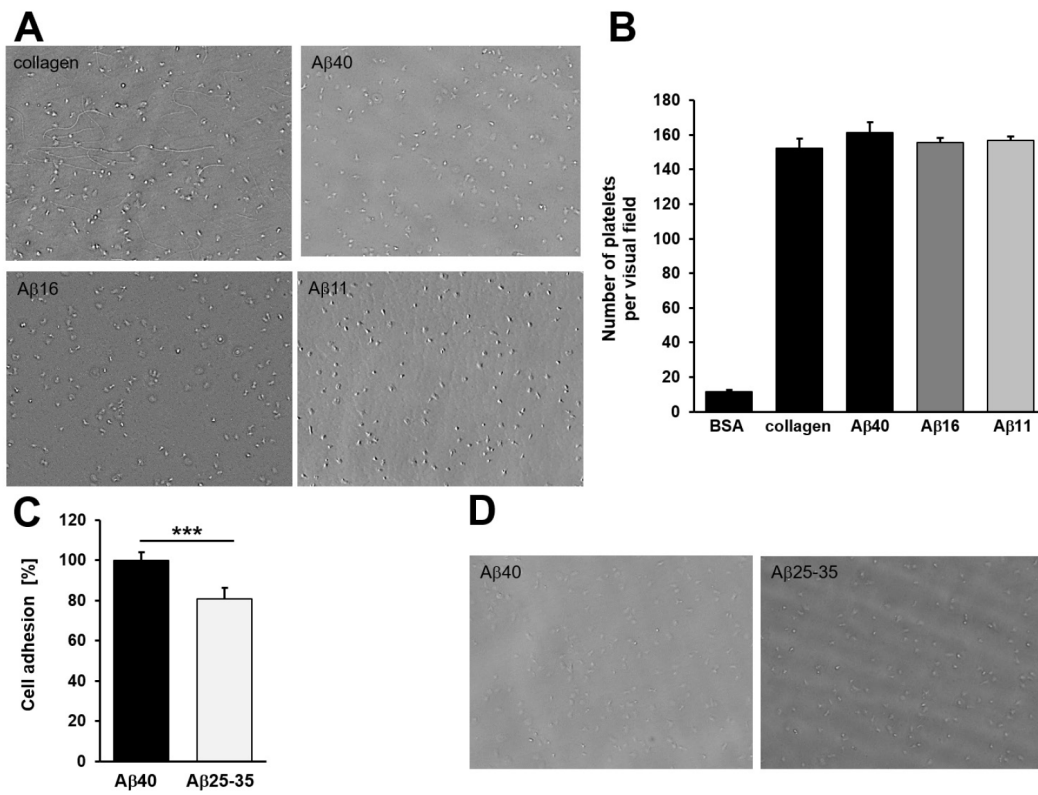
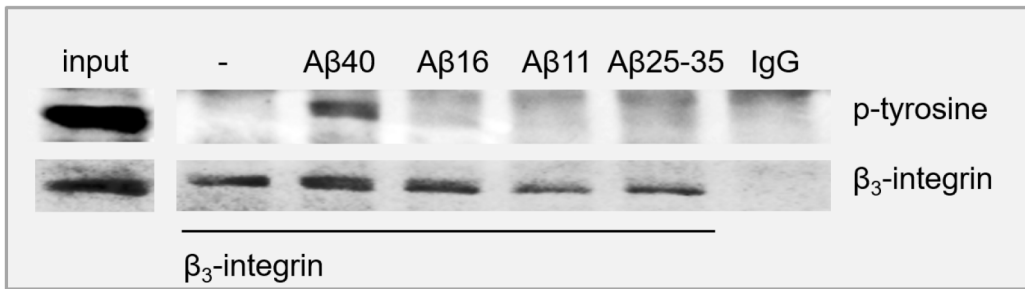
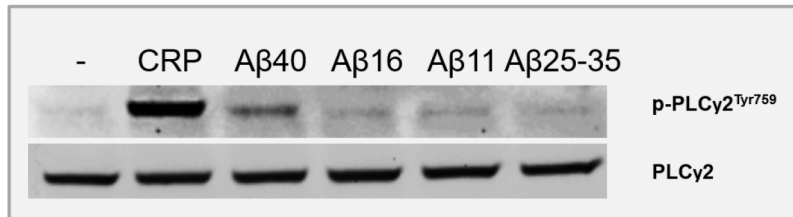


Figure 1

A



B



C

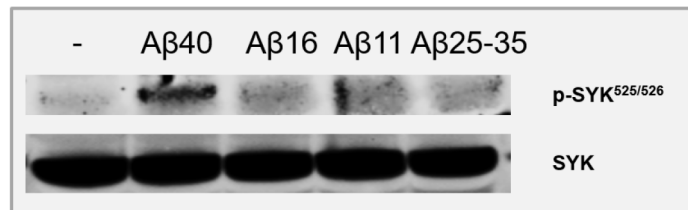


Figure 2

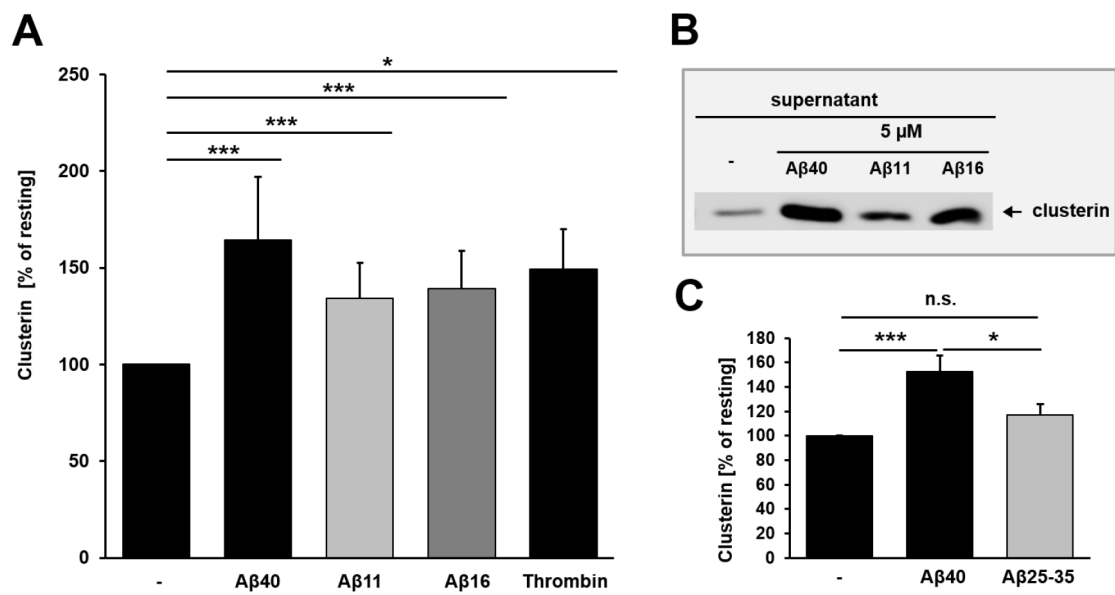


Figure 3

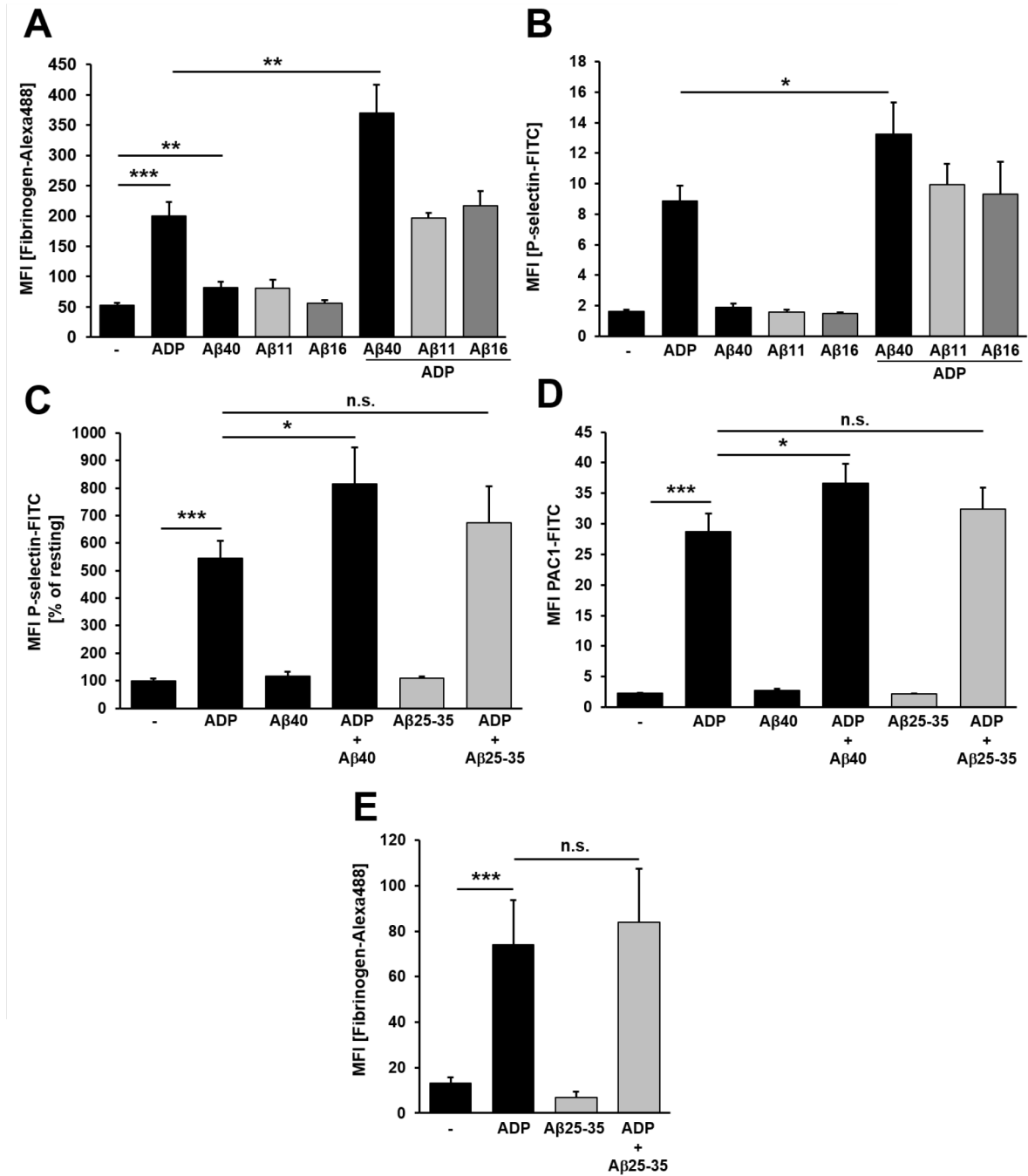


Figure 4

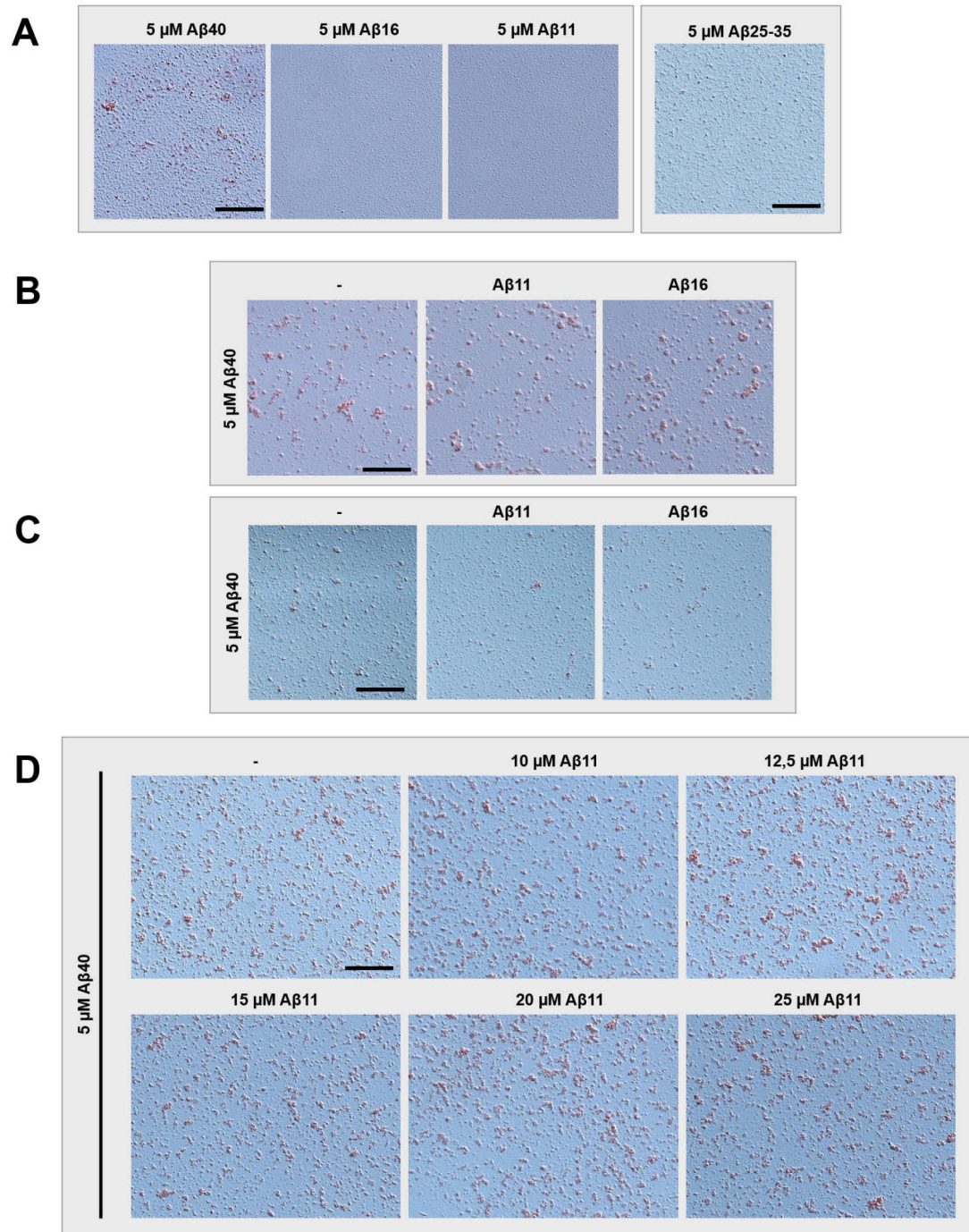


Figure 5

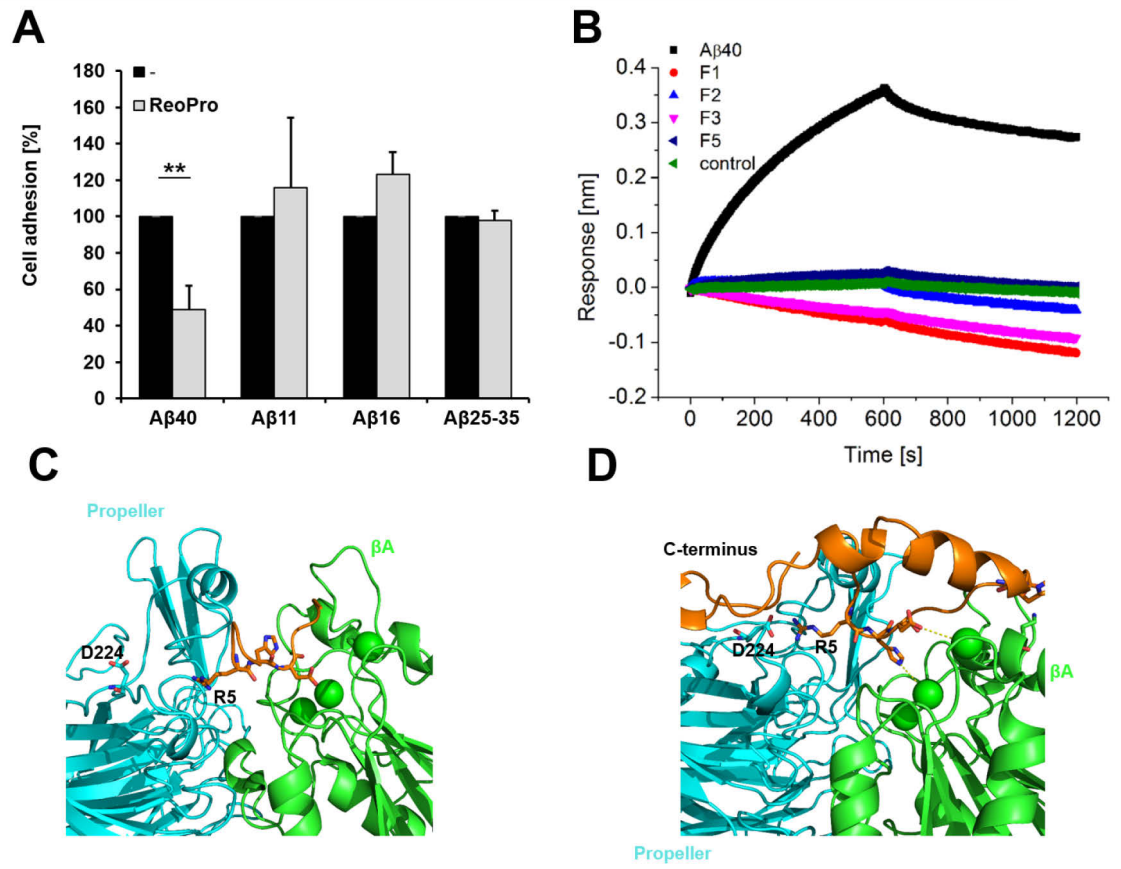


Figure 6

Supporting Information

Supplemental Figures

Figure S1. Anti-A β antibodies binding to immobilized A β fragments measured by BLI. (A) 6E10 antibody binding to F1. (B) NAB228 antibody binding to F2. (C) 4G8 antibody binding to F3. (D) BAM90.1 antibody binding to F5. Binding of 500 nM antibody was recorded in PBS.

Figure S2. Starting structures for MD simulations of the A β peptide/integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ complexes. The used starting structures are identical except for the C-termini of A β peptides with different length: A β 40 (green), A β 16 (navy), and A β 11 (orange). The circles and squares indicate the A β peptides and the interacting integrin subunits, respectively.

Figure S3. Salt bridge interactions between D224 of the propeller domain and R5 of the A β peptides. The number of hydrogen bonds between the residues over the course of three replicate MD simulations (red, black, blue) and the probability of occupancy (highest value normalized to 1) are depicted for A β 11 (A), A β 16 (B), and A β 40 (C). While AE11 and AE16 essentially do not form the D224/R5 salt bridge, A β 40 forms one or two between the two residues.

Figure S4. Structural deviation of the peptides over 150 ns of MD simulations. The non-hydrogen atom root mean square deviation (RMSD) of the first six residues of A β 11 (A), A β 16 (B), and A β 40 (C) after superimpositioning of the propeller, β A, and hybrid domains to the respective starting structure are shown for three replicate MD simulations (red, black, blue), respectively. The RMSD and its spread is lower in A β 40 than in the other two peptides. The highest value of the probability of occurrence is normalized to 1.

Figure S5. Distance between the center of mass of the ten C-terminal residues of A β 40 and D224 in the propeller domain over 150 ns of MD simulations. In all three replicate MD simulations (red, black, blue), the C-terminus moves towards D224. The highest value of the probability of occurrence is normalized to 1.

Figure S6. Solvent accessible surface area of D224 of the propeller domain and R5 of the A β peptides over 150 ns of MD simulations. The solvent accessible surface area (SASA) of D224

of the propeller domain and R5 of the A β 11 (A), A β 16 (B), and the A β 40 (C) peptides is shown for three replicates of MD simulations (red, black, blue). The SASA in A β 40 is generally lower than in the other peptides, as the two residues are covered by the C-terminus of A β 40 (see also Figure S4 and Figure 6D). The highest value of the probability of occurrence is normalized to 1

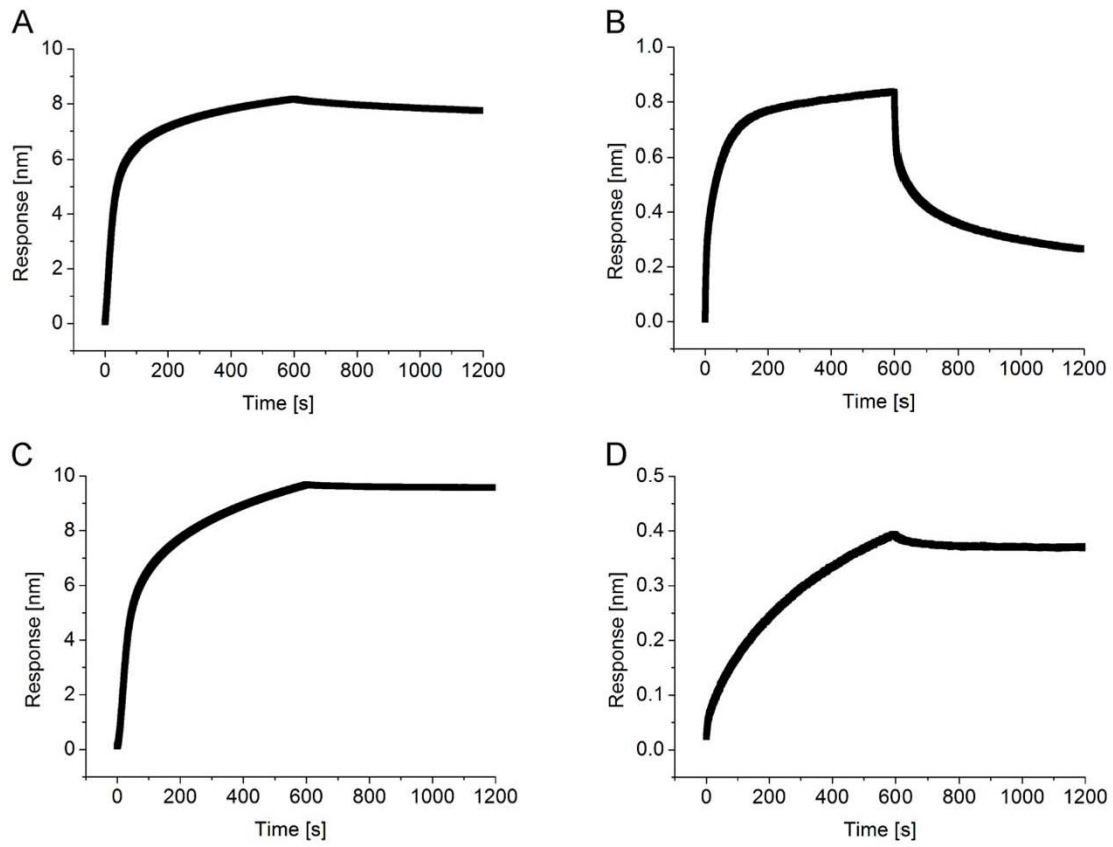


Fig S1

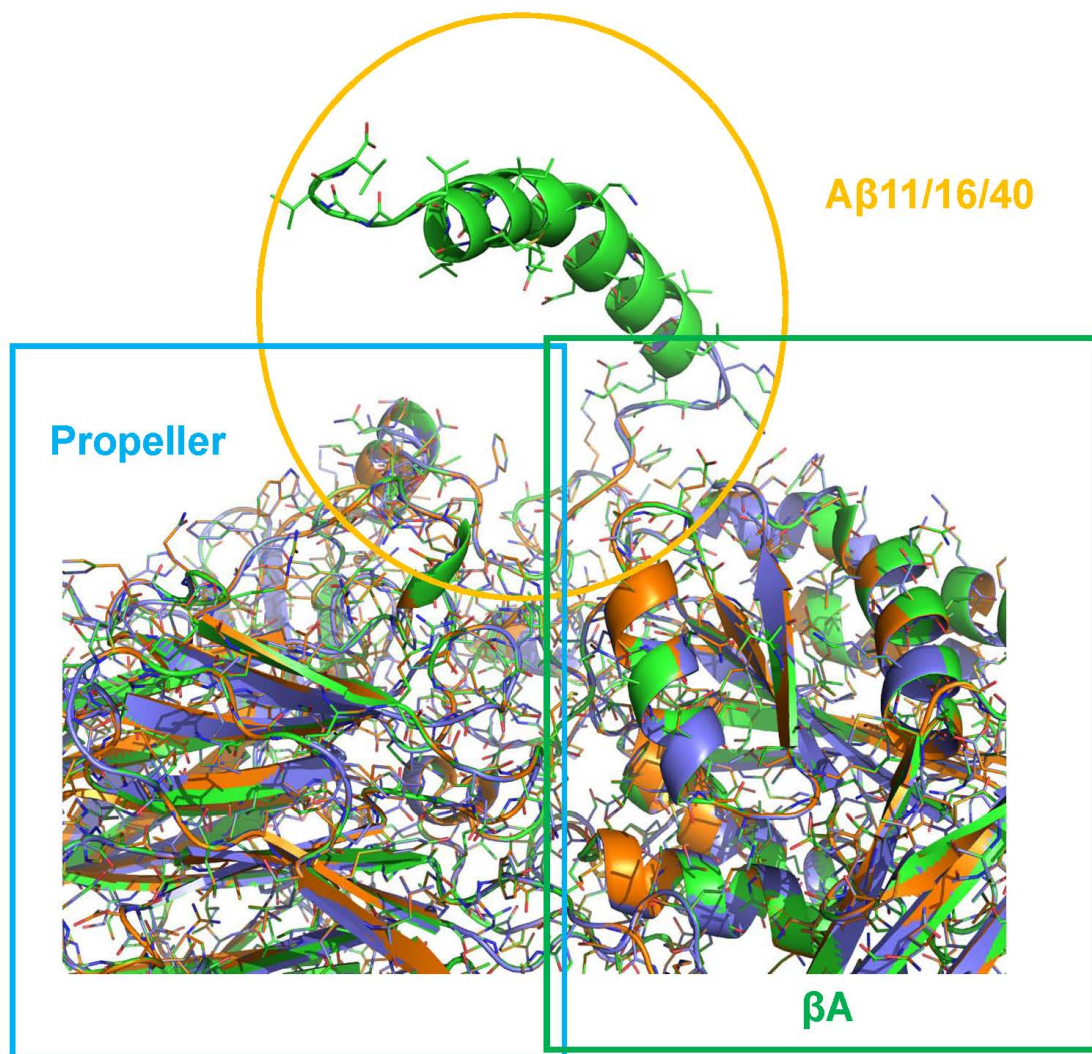


Fig. S2

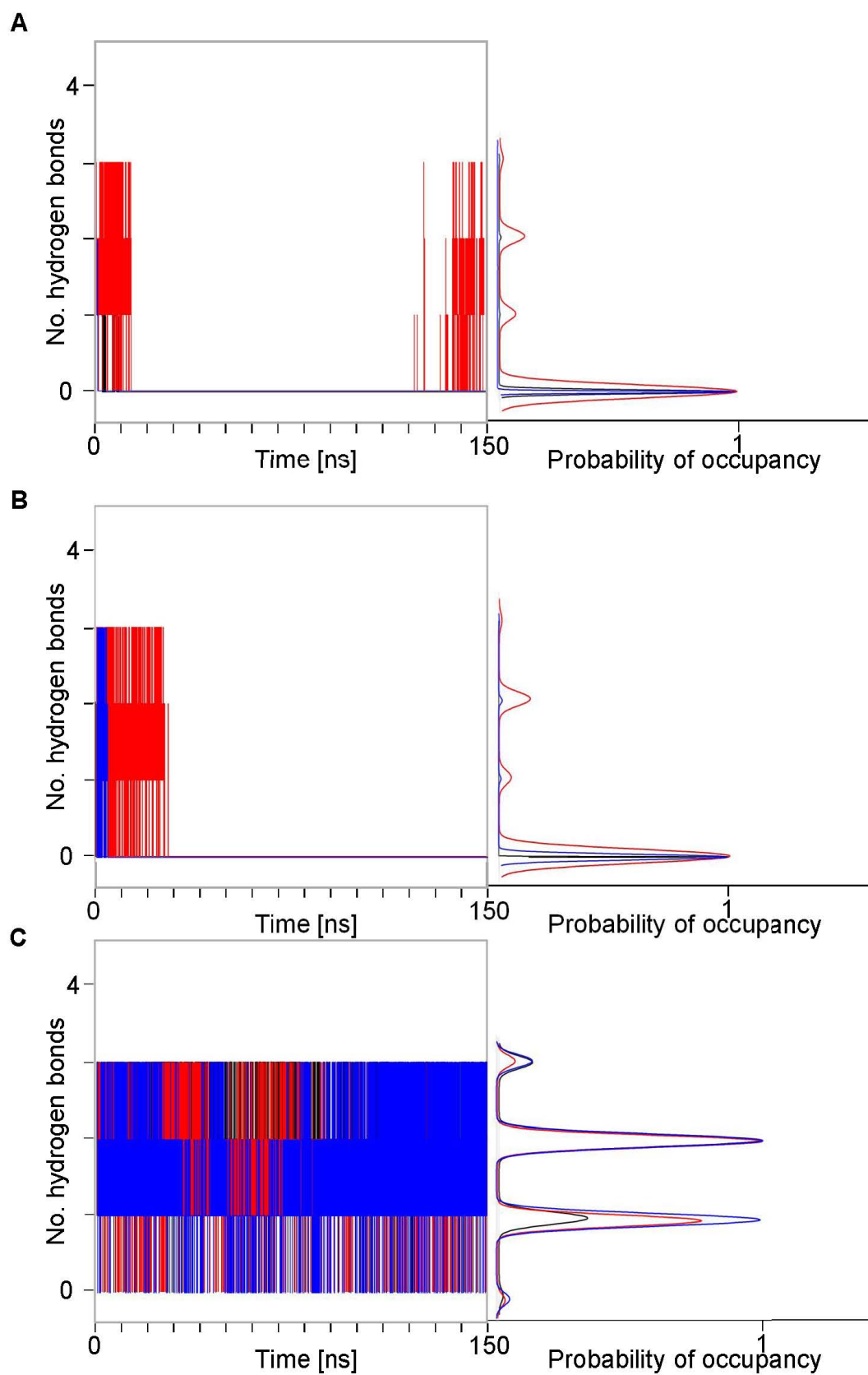


Fig. S3

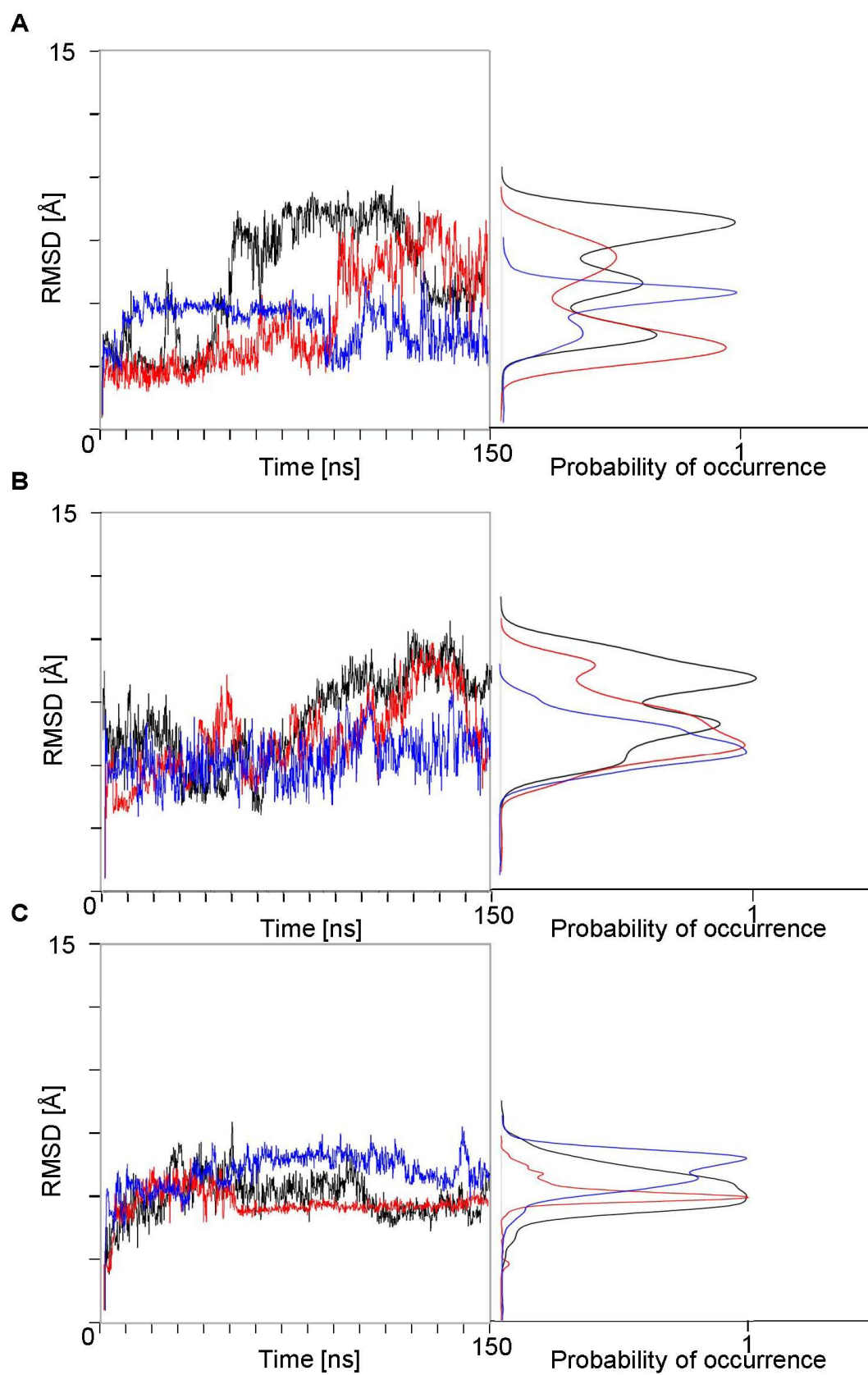


Fig. S4

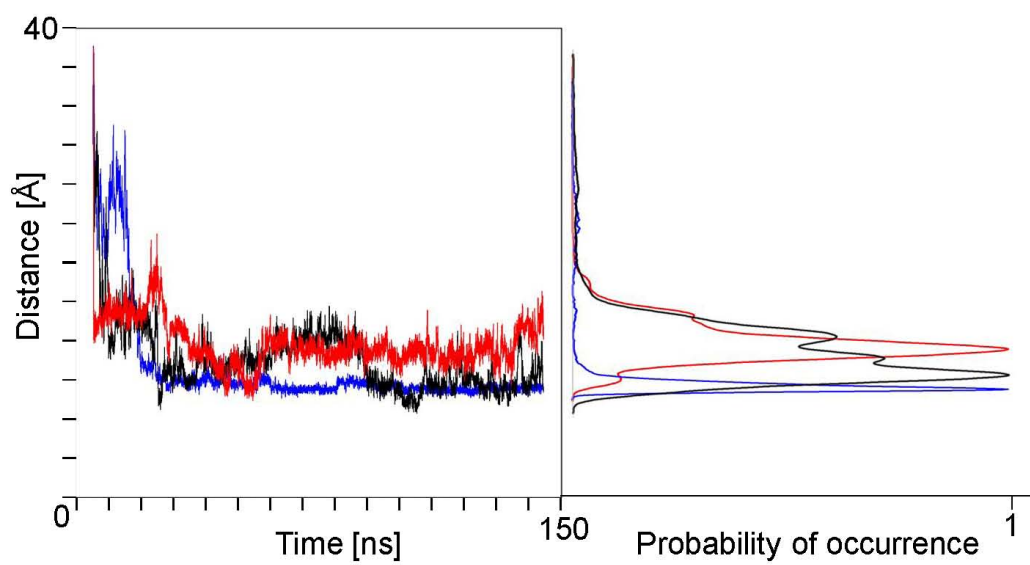


Fig. S5

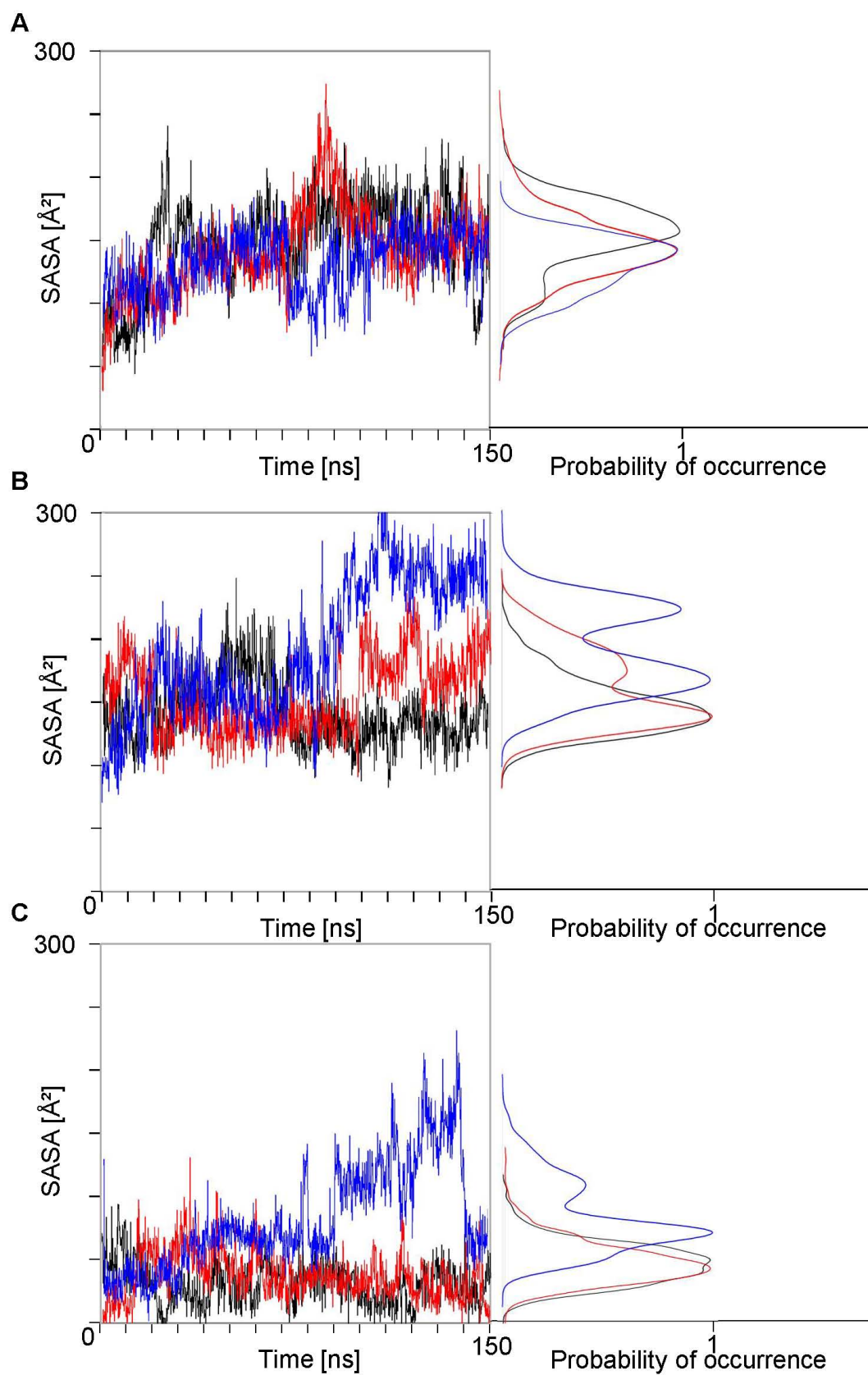


Fig. S6

4 Allgemeine Diskussion

Die AD ist die häufigste neurodegenerative Erkrankung und für mehr als die Hälfte der Demenzfällen verantwortlich (Clarfield 2003). Die Pathologie der Erkrankung ist durch die Akkumulation des Amyloid- β -Peptids und die Bildung von neurofibrillären Bündeln charakterisiert (Selkoe 2011). Ein weiteres Kennzeichen der AD ist die zerebrale Amyloidangiopathie (ZAA), die durch Akkumulation von A β in den zerebralen Gefäßen zustande kommt (Thal, Griffin *et al.*, 2008).

Seit vielen Jahren wird von Forschern über einen Zusammenhang zwischen kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen, ZAA und AD diskutiert. Insbesondere wurde beobachtet, dass Hypertonie sowie Herzerkrankungen Risikofaktoren für das Auftreten von AD darstellen und diese zu einem erhöhten und schnelleren Kognitionsverlust führen (Mielke, Rosenberg *et al.*, 2007, Helzner, Luchsinger *et al.*, 2009, Kennelly, Lawlor *et al.*, 2009). Ebenfalls erhöhen Schlaganfälle das AD-Risiko signifikant (Honig, Tang *et al.*, 2003). Aufgrund zahlreicher Befunde ist es naheliegend, dass die vaskulären Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf der AD haben. Somit muss AD als eine systemische Erkrankung verstanden werden. In kardio- und zerebrovaskulären Erkrankungen nehmen Thrombozyten eine wichtige Rolle ein. Die unkontrollierte Thrombozytenaktivierung kann zum Gefäßverschluss führen und somit einen Schlaganfall oder Myokardinfarkt auslösen (Gawaz, Langer *et al.*, 2005, Jurk und Kehrel 2010). Da unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, dass transgene AD Mäuse prä-aktivierte Thrombozyten in der Zirkulation aufweisen sowie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko tragen (Jarre, Gowert *et al.*, 2014), war es von Interesse in dieser Arbeit, den Einfluss von Thrombozyten auf die Progression der Alzheimer Erkrankung zu untersuchen.

Thrombozyten enthalten große Mengen an APP und alle notwendige Enzyme, um A β -Peptide zu generieren (Van Nostrand, Schmaier *et al.*, 1990, Evin, Zhu *et al.*, 2003). A β 40-Peptide werden überwiegend von Thrombozyten generiert und freigesetzt (Kokjohn, Van Vickle *et al.*, 2011). Interessanterweise enthalten die amyloiden Plaques in den zerebralen Gefäßen hauptsächlich A β 40-Peptide (Thal, Griffin *et al.*, 2008). Daher wurde in dieser Arbeit ausschließlich das A β 40-Peptid für die Untersuchungen verwendet.

Bei der Entwicklung der Alzheimer Erkrankung spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle (Barnham, Masters *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die A β 40-Peptide die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species, ROS) in Thrombozyten induzieren sowie die Expression von aktiven-Caspase-3 (Apoptosemarker) aktivieren. Zusätzlich führt die Inkubation von Thrombozyten mit A β -Peptiden zur Reduktion des Zellvolumens und des mitochondrialen Membranpotentials. Diese Ergebnisse weisen auf die

Apoptose von Thrombozyten durch A β hin (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Des Weiteren zeigten die apoptotischen, jedoch nicht die vitalen, Thrombozyten die Fähigkeit, prä-aggregierte A β -Peptide aufzunehmen (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Diese *in vitro* Ergebnisse legen nahe, dass das zirkulierende A β zur Aktivierung und zur Induktion der Apoptose von Thrombozyten in der Zirkulation führen könnte. Die Induktion der Apoptose wiederum ermöglicht die Aufnahme von A β in apoptotischen Thrombozyten, sodass es zu einer lokalen Akkumulation von A β -Peptiden in zerebralen Gefäßen kommen könnte. Interessanterweise konnte durch *in vitro* Analysen gezeigt werden, dass Thrombozyten aktiv an der Modulation von löslichem A β 40 zu fibrillären A β -Aggregaten beteiligt sind. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Fluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass die dazugegebenen A β -Peptide an der Plasmamembran von Thrombozyten anhaften (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Nach einer Verletzung von Blutgefäßen ist die bedeutendste Aufgabe von Thrombozyten die Blutstillung. Hierbei kommt es zur Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten und schließlich zur Rekrutierung von weiteren Thrombozyten (Jurk und Kehrel 2010). In dieser Arbeit konnte anhand von *ex vivo* Experimenten gezeigt werden, dass A β -Peptide die Adhäsion von Thrombozyten auf einer Kollagenmatrix unter Flussbedingungen verstärken. Zusätzlich haben *in vivo* Untersuchungen an Mäusen ergeben, dass die Adhäsion von Thrombozyten an der verletzten *Arteria carotis* durch die Zugabe von A β -stimulierten Thrombozyten verstärkt wird (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Des Weiteren bestätigen Immunfluoreszenzfärbungen aus unserer Arbeitsgruppe, dass Thrombozyten an die zerebralen, vaskulären A β -Plaques in den AD Mausmodellen, APP Dutch und APP23, adhären. Dabei deutet die Okklusion zahlreicher zerebraler Gefäße in APP23 und APP Dutch Mäusen auf eine anhaltende Rekrutierung von weiteren Thrombozyten zu vaskulären A β -Ablagerungen durch aktivierte Thrombozyten hin (Gowert, Donner *et al.*, 2014). Jarre *et al.* haben gezeigt, dass alte APP23 Mäuse prä-aktivierte Thrombozyten in der Zirkulation aufweisen, die zu einer erhöhten Thrombusbildung *ex vivo* führen (Jarre, Gowert *et al.*, 2014). Zusammengefasst legen diese Ergebnisse nahe, dass APP23 Mäuse ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung arterieller Thrombosen haben und daher zu zerebrovaskulären und kardiovaskulären Komplikationen neigen könnten.

Unter Berücksichtigung der Fähigkeit von Thrombozyten, das lösliche A β 40 zu fibrillären A β Strukturen *in vitro* zu modulieren (Gowert, Donner *et al.*, 2014), wurde des Weiteren untersucht, welche molekularen Mechanismen hierbei eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde daher die Thrombozyten-vermittelte Bildung von fibrillären A β 40-Peptiden in Zellkultur genauer analysiert. Das fibrilläre A β 40 in der Thrombozyten-Zellkultur zeigte eine positive Färbung durch Kongorot und Thioflavin. Durch die Färbung mit dem A β -Antikörper 6E10 konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um spezifische A β -Aggregate handelt. Die Aufnahmen mittels Transmissionselektronenmikroskopie zeigten das Anhaften von A β -Fibrillen an der Zelloberfläche von Thrombozyten. Zusätzlich konnten keine A β -Aggregate

nach Inkubation mit den Überständen von stimulierten Thrombozyten in der Kultur detektiert werden (Donner, Falker *et al.*, 2016). Beide Ergebnisse wiesen auf eine Zellkontakt-abhängige Aggregation von A β 40 in Zellkultur hin.

Aus früheren Publikationen ist bereits bekannt, dass sich verschiedene Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche wie z.B. der Typ 2 Scavenger-Rezeptor CD36, Glykoprotein Iba und Par-1 durch Inkubation mit A β 40 Peptiden aktivieren lassen (Herczenik, Bouma *et al.*, 2007, Shen, Hsiao *et al.*, 2008). Des Weiteren haben Cortes-Canteli *et al.* gezeigt, dass Fibrinogen zur AD Pathologie beitragen kann (Cortes-Canteli, Zamolodchikov *et al.*, 2012). Fibrinogen ist ein natürlicher Ligand des Oberflächenrezeptors Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, der für die Thrombozytenaggregation verantwortlich ist (Estevez, Shen *et al.*, 2015). Da die Aggregation von A β 40 in der Zellkultur einen Zellkontakt voraussetzt, wurde in dieser Arbeit der Rezeptor Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der Thrombozyten-vermittelten A β -Aggregation untersucht. Die Reduktion der A β -Aggregat-Bildung in der Zellkultur durch die Vorinkubation der Thrombozyten mit Fibrinogen oder mit Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -blockierenden Antikörpern, sowohl für humane als auch für murine Thrombozyten, ließ einen ersten Rückschluss auf eine direkte Interaktion zwischen A β und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu. Zusätzlich wiesen diese Ergebnisse auf eine Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ - abhängige A β -Aggregat-Bildung hin. Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen A β 40 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zeigten eine Kolokalisation dieser Proteine auf der Thrombozytenoberfläche. Einen weiteren Hinweis auf eine Interaktion zwischen A β 40 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ wurde in dieser Arbeit durch die Durchführung der Immunpräzipitation und der Durchflusszytometrie (*fluorescence activating cell sorting*, FACS) erbracht. Kinetische Analysen mittels Bio-Layer-Interferometrie (BLI) sowie Molekulardynamik (MD)-Simulationsstudien bestätigten die Interaktion zwischen monomerem A β 40 und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und zeigten eine hochaffine Bindung von A β 40 an das Integrin mit einem K_d -Wert von 43.8 ± 18.8 nM (Donner, Falker *et al.*, 2016).

Ein weiteres Protein, das in dieser Arbeit im Zusammenhang mit der thrombozyten-vermittelten A β -Aggregation untersucht wurde, ist das stress-induzierte Chaperonprotein CLU. Es ist bekannt, dass der CLU-Spiegel im Plasma von AD-Patienten erhöht ist und dass dieser mit dem kognitiven Rückgang sowie der Progression der Alzheimer Krankheit korreliert (Jongbloed, van Dijk *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten durch den Kontakt mit A β 40 das Protein CLU verstärkt sekretieren. Darüber hinaus konnte die A β -induzierte Sekretion von CLU durch Hemmung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ verhindert werden. Zusätzlich wurde eine verstärkte A β -Aggregation bzw. eine verminderte A β -Aggregation durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von rekombinantem CLU in der Thrombozytenzellkultur festgestellt (Donner, Falker *et al.*, 2016). Dieser Befund lässt sich mit der Studie von Yerbury *et al.* erklären. Sie konnten in Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen CLU und A β -Peptiden den aggregationsfördernden (CLU < A β) bzw. aggregationsmindernden

(CLU > A β) Effekt von CLU beobachten (Yerbury, Poon *et al.*, 2007, Wilson, Yerbury *et al.*, 2008). In dieser Arbeit konnte zudem mit Thrombozyten aus CLU-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass thrombozytäres CLU zur A β -Aggregatbildung in der Zellkultur beiträgt, jedoch nicht essentiell für diesen Prozess ist, da nur eine verminderte A β Aggregation, nicht aber ein vollständiges Ausbleiben der A β Aggregation beobachtet wurde (Donner, Falker *et al.*, 2016). Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in der *in vivo* Studie von DeMattos *et al.* wieder. AD Mäuse, die auf einem CLU-knockout Hintergrund gezüchtet wurden, wiesen nur eine Reduktion und keine vollständige Abwesenheit von Amyloidablagerungen im Hirnparenchym auf (DeMattos, O'Dell M *et al.*, 2002).

Um besser zu verstehen, welche Bedeutung das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie das Protein CLU in der Thrombozyten-vermittelten A β -Aggregation haben, wurden Thrombozyten von Patienten mit Glanzmann-Thrombasthenie (siehe Abschnitt 1.2.3) für weitere Untersuchungen verwendet. Interessanterweise korrelierte die Menge an A β -Aggregaten in der Zellkultur positiv mit der steigenden Expression von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Zelloberfläche (Donner, Falker *et al.*, 2016). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Expression des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Thrombozytenoberfläche für die Aggregation von A β 40 entscheidend ist und nicht die Funktion des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$, da alle Patienten einen kompletten Funktionsverlust des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ aufwiesen. Darüber hinaus konnte die Sekretion des Proteins CLU durch Thrombozyten von einem GT Typ I Patienten im Vergleich zu einem GT Typ III Patienten nicht durch A β 40-Peptide ausgelöst werden (Donner, Falker *et al.*, 2016). Jedoch ist nicht vollständig geklärt, ob A β 40 an das nicht aktivierte und aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden kann. Einerseits weisen die Thrombozyten von GT-Typ II und III einen qualitativen Defekt, d.h. einen Aktivierungsdefekt des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf, sind aber trotzdem fähig, A β -Aggregate in der Zellkultur zu bilden. Zusätzlich konnte mit Hilfe der MD-Simulation eine Bindung von A β 40 an das nicht aktivierte Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ gezeigt werden (Donner, Falker *et al.*, 2016). Andererseits ist die Aktivierung von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Aufreinigung für BLI-Bindungsstudien nicht auszuschließen.

AD-erkrankte Patienten sowie APP23 Mäuse weisen Thrombozyten mit aktiviertem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in der Zirkulation auf (Stellos, Panagiota *et al.*, 2010, Jarre, Gower *et al.*, 2014). Mittels FACS-Analysen konnte in dieser Arbeit eine verstärkte Bindung von markiertem A β 40 an die Thrombozyten nach Aktivierung mit ADP sowie eine Reduktion durch Blockierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ gezeigt werden (Donner, Falker *et al.*, 2016). Diese Daten deuten darauf hin, dass Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ im aktivierten Zustand mit höherer Affinität A β 40 binden können. Patienten mit kardio-und zerebrovaskulären Erkrankungen, wie z.B. einem Myokardinfarkt oder einem Schlaganfall, zeigen ebenfalls prä-aktivierte Thrombozyten mit aktiviertem Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf der Zelloberfläche. (Langford, Wainwright *et al.*, 1996, Ghosh, Khare *et al.*, 2006, Cevik, Baykal *et al.*, 2016). Unter Berücksichtigung der Daten dieser Arbeit könnte der prä-aktivierte

Zustand von Thrombozyten einer der Gründe sein, warum bei diesen Patienten das Risiko an AD zu erkranken erhöht ist.

Unter anderem haben die Ergebnisse dieser Arbeit ergeben, dass ADP nicht nur die Bindung von A β 40 an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ verstärkt, sondern selbst eine wichtige Rolle in der Thrombozyten-vermittelten A β Aggregation einnimmt. ADP ist ein sekundärer Mediator der Thrombozytenaktivierung und wird von Thrombozyten insbesondere nach Stimulation des Kollagenrezeptors GPVI ausgeschüttet, wobei er die Thrombozytenaktivierung verstärkt (Gachet 2006, Gachet 2008). *In vitro* Untersuchungen zeigten eine reduzierte CLU Ausschüttung sowie vollständige Verhinderung der A β -Aggregat Bildung in Zellkultur durch die Zugabe des ADP-Scavengers Apyrase oder durch Blockierung des ADP-Rezeptors P2Y₁₂. Jedoch wies eine Studie zur Kolokalisation keine Bindung von A β an den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ auf. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass A β 40 die Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ auf ADP Stimulation amplifiziert (Donner, Falker *et al.*, 2016). Aufgrund dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass ADP über die Bindung an seine Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ eine verstärkte Aktivierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ induziert. Daraufhin kommt es zu einem weiteren Anstieg der Clusterinsekretion und zur hoch-affinen Bindung von A β 40 an Thrombozyten. Ein anderer sekundärer Mediator der Thrombozytenaktivierung, das Thromboxan A₂, scheint bei der A β -Aggregat Bildung *in vitro* keine Rolle zu spielen. Es konnte weder eine Reduktion von A β -Aggregaten in Zellkultur, noch eine reduzierte Sekretion von thrombozytärem CLU durch Hemmung der Thromboxan-A₂-Synthese mittels Azetylsalizylsäure festgestellt werden (Donner, Falker *et al.*, 2016). Diese Daten könnten eine Erklärung dafür sein, warum die Langzeitstudie AD2000 keinen positiven Effekt erbracht hat. In dieser Studie wurden AD erkrankte Patienten zwei Jahre lang mit Aspirin (Azetylsalizylsäure) ohne einen Effekt auf die Verbesserung der Kognition (Group, Bentham *et al.*, 2008) behandelt.

Eigene sowie Untersuchungen von anderen Wissenschaftlern haben gezeigt, dass Thrombozyten auf immobilisierten A β -Peptiden unter statischen und dynamischen Bedingungen adhären (Canobbio, Catricala *et al.*, 2013, Gowert, Donner *et al.*, 2014). Durch Blockierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ mittels ReoPro konnte eine Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelte Adhäsion von Thrombozyten auf immobilisiertem A β 40 nachgewiesen werden. Darauffolgend ergab die Analyse der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermittelten Signalübertragung in Thrombozyten, dass A β 40 über die Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, ähnlich wie der natürliche Ligand Fibrinogen, ein *Outside-in signaling* und nachfolgend eine Aggregation der Thrombozyten induziert. Interessanterweise konnte mittels Bindungsstudie (BLI) gezeigt werden, dass A β 40 nicht nur an Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$, sondern ebenfalls an Fibrinogen bindet. Zusätzlich deuten die FACS-Analysen in dieser Arbeit auf die Bindung von Fibrinogen an den A β 40/ Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex hin (Donner, Falker *et al.*, 2016). Bereits in anderen Studien wurde die kritische Rolle von Fibrinogen in AD diskutiert (Ahn, Zamolodchikov *et al.*, 2010, Cortes-Canteli, Paul *et al.*, 2010).

Untersuchungen von Cortes-Canteli *et al.* haben gezeigt, dass A β -Peptide eine Oligomerisierung von Fibrinogen induzieren können. Des Weiteren führt eine Depletion von Fibrinogen im Plasma zu einer Reduktion von ZAA in AD Mäusen (Cortes-Canteli, Paul *et al.*, 2010). Diese Daten sowie Untersuchungen der vorliegenden Arbeit lassen die Vermutung zu, dass die Bindung von Fibrinogen an den A β 40/Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex und die A β -induzierte Aggregation von Thrombozyten zur Entwicklung der ZAA beitragen. Dies könnte unter anderem erklären, warum in transgenen APP23 Mäusen eine Okklusion von zerebralen Gefäßen (Gowert, Donner *et al.*, 2014) beobachtet wurde.

Die Liganden für das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ enthalten eine Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) Sequenz, mit der sie an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden (Nieswandt, Varga-Szabo *et al.*, 2009). APP sowie A β -Peptide enthalten eine Arginin-Histidin-Asparaginsäure-Serin (RHDS) Sequenz. Diese befindet sich im N-Terminus von A β -Peptiden an den Positionen 5 bis 8. In dieser Arbeit wiesen Untersuchungen mit A β 40-Peptiden, die die modifizierte RHDS-Sequenzen enthalten, darauf hin, dass die Bindung von A β 40 an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und das von A β 40 induzierte *Outside-in signaling* des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ durch Bindung der intakten RHDS Sequenz bestimmt wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die intakte RHDS-Sequenz für die Thrombozyten-vermittelte A β -Aggregation, das *Outside-in signaling* sowie für die CLU Sekretion essenziell ist (Donner, Falker *et al.*, 2016). Um die Bedeutung des N-Terminus und der RHDS Sequenz von A β für die Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie für die darauffolgenden Prozesse zu untersuchen, wurden die A β -Peptide, A β 1-11 und A β 1-16, mit intakten RHDS-Sequenzen und A β 25-35 ohne RHDS Sequenz für weitere Analysen verwendet. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten an N-terminalen A β 11- und A β 16-Peptiden sowie an A β 25-35 adhären. Es wurde jedoch keine Reduktion der Adhäsion durch Blockierung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ im Vergleich zu A β 40 festgestellt (Donner *et al.* 2018, eingereicht). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es noch andere Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche gibt, an die A β binden kann. Darüber hinaus wurde bereits in einigen Studien von elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen A β und spezifischen Zellmembrankomponenten (negativ geladene Phospholipide und Ganglioside) berichtet (Venkatasubramaniam, Drude *et al.*, 2014). Diese könnten ebenfalls für die Adhäsion von Thrombozyten auf immobilisierten N-terminalen A β -Peptiden sowie auf A β 25-35 verantwortlich sein. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die N-terminalen A β -Peptide, A β 11 und A β 16, sowie das A β 25-35 im Vergleich zu intakten A β 40-Peptiden keine Fibrinogen-Bindung sowie kein *Outside-in signaling* in Thrombozyten auslösen. Entsprechend konnten auch keine A β -Aggregate durch Kongorot-Färbung von A β 11-, A β 16- und A β 25-35-Peptiden in Anwesenheit von Thrombozyten in Zellkultur detektiert werden. Eine Verdrängungsstudie in der Zellkultur wies darauf hin, dass die extrazellulären Bindungsstellen von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ für das A β 40 trotz Vorinkubation mit A β 11 sowie mit A β 16-Peptiden nicht blockiert wurden, da eine

Thrombozyten-vermittelte Aggregation von A β 40 detektiert werden konnte. Diese Daten lassen vermuten, dass die N-terminalen A β -Peptide, A β 11 und A β 16, obwohl diese die RHDS Sequenz enthalten, nicht an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden können. Diese Vermutung konnte mittels einer Bindungsstudie mit BLI sowie der MD-Simulationsstudie bestätigt werden (Donner et al. 2018, eingereicht). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die RHDS Sequenz des A β 40-Peptids bei der Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie bei der Aggregation von A β 40 eine essentielle Rolle spielt. Allerdings reicht das RHDS-Motiv alleine für eine stabile Bindung an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermutlich nicht aus. Unter Berücksichtigung dieser Daten ist es vorstellbar, dass das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ mehr als eine Bindestelle für A β 40 hat. Es ist z. B. bekannt, dass der natürliche Ligand Fibrinogen nicht nur über das RGD-Motiv sondern auch über ein KQAGDV-Motiv am Fibrinogen- γ -Ketten-C-Terminus an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ bindet (Lin, Zhu *et al.*, 2016). Das AGDV-Tetrapeptid des KQAGDV-Motivs bindet mit vergleichbarer Affinität wie das RGD-Motiv an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ und induziert eine Konformationsänderung des Integrins $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Lin, Zhu *et al.*, 2016, Kononova, Litvinov *et al.*, 2017). A β 40 besitzt ein AGDV-ähnliches Motiv, bei dem die Aminosäure Glycin gegen Glutaminsäure ausgetauscht ist. Das AEDV-Motiv von A β 40 befindet sich in der Reihenfolge der Aminosäuren 21 bis 24. Dies lässt die Vermutung zu, dass A β 40 mehr als eine Bindestelle benötigt, um an das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ zu binden. Hierzu sind weitere Untersuchungen notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

Aufgrund von neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen haben einige Wissenschaftler die Amyloid-Hypothese modifiziert. Diese besagt, dass die N-terminalen Domänen (A β -Aminosäuren 1 bis 14) von neurotoxischen A β -Oligomeren die Ursache für AD sind (Murray, Sharma *et al.*, 2017). Es wurde gezeigt, dass Mutationen im N-Terminus von A β zu einer Verzögerung der Aggregation führen (Murray, Sorci *et al.*, 2016, Murray, Sharma *et al.*, 2017). Darüber hinaus zeigen andere Studien, dass N-terminal verkürzte Pyroglutamat-modifizierte A β Spezies (A β pE3-42 sowie A β pE3-40) stabiler und toxischer als A β 1-42 und A β 1-40 sowie stark mit AD assoziiert sind (Schilling, Lauber *et al.*, 2006, Nussbaum, Schilling *et al.*, 2012, Murray, Sharma *et al.*, 2017). Zudem beeinflusst der N-Terminus von A β negativ die Langzeitpotenzierung (LTP). Es konnte gezeigt werden, dass die Blockierung des N-Terminus mit sequenzspezifischen Antikörpern eine A β -induzierte Beeinträchtigung der LTP verhindert, während die Blockierung des zentralen hydrophoben Kerns (CHC) und des C-Terminus nur minimale Auswirkungen hat (Willem, Tahirovic *et al.*, 2015, Murray, Sorci *et al.*, 2016, Murray, Sharma *et al.*, 2017). Darüber hinaus stabilisieren die N-terminalen Aminosäuren Arg₅, Asp₇ und Ser₈ von A β 40 die Fibrillenstruktur, wohingegen N-terminal trunkiertes A β (9-40) weniger stabil ist (Soldner, Sticht *et al.*, 2017). Diese Daten stehen im Einklang mit unserem Befund, dass die N-terminalen Aminosäuren von A β -Peptiden von Bedeutung bei AD sein könnten.

Das transgene APP23-Mausmodell ist ein anerkanntes Tiermodell in der Alzheimer Forschung. Die transgenen APP23 Mäuse weisen einen Anstieg von A β 40 und A β 42 sowie

neuropathologische Merkmale, wie diffuse und neuritische Plaques, lokale Astro- und Mikroglie, Neuronendegeneration und eine zerebrale Amyloidangiopathie auf (Sturchler-Pierrat, Abramowski *et al.*, 1997, Calhoun, Wiederhold *et al.*, 1998, Winkler, Bondolfi *et al.*, 2001). Um den Einfluss von Thrombozyten auf die amyloiden Plaques *in vivo* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit 13 Monate alte transgene APP23 Mäuse über einen Zeitraum von 3 Monaten mit Clopidogrel behandelt. Clopidogrel gehört zu den antithrombotischen Medikamenten. Dabei blockiert Clopidogrel den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ (Gachet 2006 Kauffenstein, Bergmeier *et al.* 2001). Die Behandlung mit Clopidogrel bewirkte eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung sowie eine Reduktion des CLU Plasmaspiegels in APP23 Mäusen (Donner, Falker *et al.*, 2016). Dieser Befund spricht dafür, dass die Thrombozyten durch Degranulation der α -Granula zum erhöhten CLU Spiegel im Plasma der APP23 Mäusen beitragen könnten. Es ist bekannt, dass der CLU-Spiegel im Plasma von AD-Patienten erhöht und mit dem kognitiven Rückgang und der Progression der AD korreliert ist (Jongbloed, van Dijk *et al.* 2015). Jedoch scheint CLU anhand der *in vitro* Daten mit Thrombozyten aus CLU-Knockout-Mäusen keine essentielle Rolle in der A β -Aggregation zu spielen, da die A β -Aggregat-Bildung signifikant reduziert aber nicht vollständig blockiert war. In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der Färbung von Gehirnschnitten von behandelten und nicht-behandelten APP23 Mäusen eine Reduktion der ZAA durch die Clopidogrel-Behandlung gezeigt werden. Jedoch ließ die Auswertung von parenchymalen Plaques keinen signifikanten Unterschied in der Partikelgröße der amyloiden Plaques im Kortex sowie im Hippokampus feststellen. Dennoch wurden tendenziell weniger β -Amyloid-Ablagerungen im Hippokampus von behandelten Mäusen als in den gleichaltrigen unbehandelten Mäusen detektiert (Donner, Falker *et al.*, 2016). Aufgrund der Tatsache, dass die Bildung von ZAA ab einem Alter von 12 Monaten und von parenchymalen Plaques schon im Alter von 6 Monaten in APP23 Mäusen beginnt (Sturchler-Pierrat, Abramowski *et al.*, 1997, Winkler, Bondolfi *et al.*, 2001), ist es denkbar, dass die Thrombozytenhemmung zu einem früheren Zeitpunkt erfolgen muss, um die Entstehung von amyloiden Plaques zu verhindern. Ebenfalls könnte es sein, dass die Behandlung der Tiere mit Clopidogrel über einen Zeitraum von nur 3 Monaten zu kurz ist, um Effekte auf die Entstehung und Verbreitung von parenchymalen Plaques detektieren zu können. Es ist derzeit jedoch nicht auszuschließen, dass Thrombozyten nur an der Entstehung von ZAA, nicht aber an der Bildung von parenchymalen Plaques beteiligt sind. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Beteiligung von Thrombozyten an der Entstehung und Verbreitung der ZAA nachgewiesen werden. Inwieweit eine antithrombozytäre Therapie bei der Behandlung von AD- bzw. ZAA erkrankten Patienten umgesetzt werden kann, bleibt Bestandteil weiterer Untersuchungen.

5 Ausblick

In dieser Dissertation neu gewonnene Erkenntnisse geben den Anstoß zu einigen weiterführenden Fragestellungen. Buckley *et al.* konnten zeigen, dass RGD-enthaltende Peptide Apoptose induzieren. Dabei dringen diese in die Zelle ein und induzieren direkt die enzymatische Aktivität des pro-apoptotischen Proteins Pro-Caspase 3 (Buckley, Pilling *et al.*, 1999). Da die ansteigende Expression der aktiven Caspase-3 durch A β 40 in Thrombozyten sowie die Relevanz der RHD Sequenz von A β gezeigt werden konnte, wäre es von Interesse zu untersuchen, ob die A β -induzierte Caspase-3 Aktivität in Thrombozyten über den gleichen Mechanismus, der bereits bei den RGD-Peptiden beschrieben wurde (Buckley, Pilling *et al.*, 1999), reguliert wird.

Erst vor kurzem konnten die Forscher durch Parabiose-Experimente zeigen, dass das im Blut zirkulierende A β zur Entstehung der ZAA und amyloiden Plaques im Hirnparenchym beiträgt (Bu, Xiang *et al.*, 2017). Jedoch wurde nicht geklärt, wie das zirkulierende A β ins Parenchym gelangt und wie es zur A β -Aggregation kommt. Unter Betrachtung dieser Ergebnisse sowie der Daten der vorliegenden Doktorarbeit stellt sich hier die Frage, ob Thrombozyten ebenfalls an der Bildung parenchymaler Plaques beteiligt sind. Erste Hinweise darüber könnte die Behandlung von jüngeren transgenen APP23 Mäusen (bevor sie beginnen parenchymale und vaskuläre Plaques zu entwickeln) mit Clopidogrel über einen längeren Zeitraum liefern. Des Weiteren wäre es von großem Interesse zu klären, ob eine antithrombozytäre Behandlung einen Einfluss auf die kognitiven Fähigkeiten von transgenen APP23 Mäusen hat. Sollte sich eine Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bei AD-Mäusen nach antithrombozytärer Therapie zeigen, wäre von Bedeutung, bei der Entwicklung geeigneter Therapien nicht nur neuronale, sondern auch vaskuläre Prozesse zu berücksichtigen.

In den letzten Jahren wurden Oligomere des β -Amyloid-Proteins als Hauptursache der AD angesehen. Zusätzlich korreliert der Grad der Demenz stärker mit der Menge an A β 42-Oligomeren als mit der Menge an amyloiden Plaques (Shankar, Li *et al.*, 2008, Benilova, Karran *et al.*, 2012, Selkoe und Hardy 2016). Hierzu könnte durch Bindungsstudien zunächst geklärt werden, ob auch A β 42 an thrombozytäres Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ binden kann. Daran anknüpfend stellt sich die Frage, ob A β -Oligomere ebenfalls Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ vermitteltes *Outside- in signaling* induzieren können.

Literaturverzeichnis

- Ahn, H. J., D. Zamolodchikov, M. Cortes-Canteli, E. H. Norris, J. F. Glickman and S. Strickland (2010). "Alzheimer's disease peptide beta-amyloid interacts with fibrinogen and induces its oligomerization." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(50): 21812-21817.
- Aronow, B. J., S. D. Lund, T. L. Brown, J. A. Harmony and D. P. Witte (1993). "Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(2): 725-729.
- Ault, K. A. and C. Knowles (1995). "In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets are the youngest platelets in circulation." Exp Hematol **23**(9): 996-1001.
- Barnham, K. J., C. L. Masters and A. I. Bush (2004). "Neurodegenerative diseases and oxidative stress." Nat Rev Drug Discov **3**(3): 205-214.
- Baskin, F., R. N. Rosenberg, L. Iyer, L. Hynan and C. M. Cullum (2000). "Platelet APP isoform ratios correlate with declining cognition in AD." Neurology **54**(10): 1907-1909.
- Bell, R. D., A. P. Sagare, A. E. Friedman, G. S. Bedi, D. M. Holtzman, R. Deane and B. V. Zlokovic (2007). "Transport pathways for clearance of human Alzheimer's amyloid beta-peptide and apolipoproteins E and J in the mouse central nervous system." J Cereb Blood Flow Metab **27**(5): 909-918.
- Benilova, I., E. Karran and B. De Strooper (2012). "The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes." Nat Neurosci **15**(3): 349-357.
- Bertram, L., M. B. McQueen, K. Mullin, D. Blacker and R. E. Tanzi (2007). "Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database." Nat Genet **39**(1): 17-23.
- Bertrand, P., J. Poirier, T. Oda, C. E. Finch and G. M. Pasinetti (1995). "Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease." Brain Res Mol Brain Res **33**(1): 174-178.
- Bettens, K., N. Brouwers, S. Engelborghs, J. C. Lambert, E. Rogaeva, R. Vandenberghe, N. Le Bastard, F. Pasquier, S. Vermeulen, J. Van Dongen, M. Mattheijssens, K. Peeters, R. Mayeux, P. St George-Hyslop, P. Amouyel, P. P. De Deyn, K. Sleegers and C. Van Broeckhoven (2012). "Both common variations and rare non-synonymous substitutions and small insertion/deletions in CLU are associated with increased Alzheimer risk." Mol Neurodegener **7**: 3.
- Bickel, H. (2000). "[Dementia syndrome and Alzheimer disease: an assessment of morbidity and annual incidence in Germany]." Gesundheitswesen **62**(4): 211-218.
- Biffi, A., D. Bailey, C. D. Anderson, A. M. Ayres, E. M. Gurol, S. M. Greenberg, J. Rosand and A. Viswanathan (2016). "Risk Factors Associated With Early vs Delayed Dementia After Intracerebral Hemorrhage." JAMA Neurol **73**(8): 969-976.
- Bu, X. L., Y. Xiang, W. S. Jin, J. Wang, L. L. Shen, Z. L. Huang, K. Zhang, Y. H. Liu, F. Zeng, J. H. Liu, H. L. Sun, Z. Q. Zhuang, S. H. Chen, X. Q. Yao, B. Giunta, Y. C. Shan, J. Tan, X. W. Chen, Z. F. Dong, H. D. Zhou, X. F. Zhou, W. Song and Y. J. Wang (2017). "Blood-derived amyloid-beta protein induces Alzheimer's disease pathologies." Mol Psychiatry.
- Buckley, C. D., D. Pilling, N. V. Henriquez, G. Parsonage, K. Threlfall, D. Scheel-Toellner, D. L. Simmons, A. N. Akbar, J. M. Lord and M. Salmon (1999). "RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation." Nature **397**(6719): 534-539.

- Calhoun, M. E., K. H. Wiederhold, D. Abramowski, A. L. Phinney, A. Probst, C. Sturchler-Pierrat, M. Staufenbiel, B. Sommer and M. Jucker (1998). "Neuron loss in APP transgenic mice." Nature **395**(6704): 755-756.
- Canobbio, I., A. A. Abubaker, C. Visconte, M. Torti and G. Pula (2015). "Role of amyloid peptides in vascular dysfunction and platelet dysregulation in Alzheimer's disease." Front Cell Neurosci **9**: 65.
- Canobbio, I., S. Catricala, L. G. Di Pasqua, G. Guidetti, A. Consonni, D. Manganaro and M. Torti (2013). "Immobilized amyloid A β peptides support platelet adhesion and activation." FEBS Lett **587**(16): 2606-2611.
- Canobbio, I., G. F. Guidetti, B. Oliviero, D. Manganaro, D. Vara, M. Torti and G. Pula (2014). "Amyloid beta-peptide-dependent activation of human platelets: essential role for Ca²⁺ and ADP in aggregation and thrombus formation." Biochem J **462**(3): 513-523.
- Canobbio, I., C. Visconte, S. Momi, G. F. Guidetti, M. Zara, J. Canino, E. Falcinelli, P. Gresele and M. Torti (2017). "Platelet amyloid precursor protein is a modulator of venous thromboembolism in mice." Blood **130**(4): 527-536.
- Case, D. A., T. E. Cheatham, 3rd, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, Jr., A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang and R. J. Woods (2005). "The Amber biomolecular simulation programs." J Comput Chem **26**(16): 1668-1688.
- Cattepoel, S., M. Hanenberg, L. Kulic and R. M. Nitsch (2011). "Chronic intranasal treatment with an anti-A β (30-42) scFv antibody ameliorates amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease." PLoS One **6**(4): e18296.
- Cevik, O., A. T. Baykal and A. Sener (2016). "Platelets Proteomic Profiles of Acute Ischemic Stroke Patients." PLoS One **11**(6): e0158287.
- Chen, M., N. C. Inestrosa, G. S. Ross and H. L. Fernandez (1995). "Platelets are the primary source of amyloid beta-peptide in human blood." Biochem Biophys Res Commun **213**(1): 96-103.
- Clarfield, A. M. (2003). "The decreasing prevalence of reversible dementias: an updated meta-analysis." Arch Intern Med **163**(18): 2219-2229.
- Coller, B. S. and S. J. Shattil (2008). "The GPIIb/IIIa (integrin α IIb β 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend." Blood **112**(8): 3011-3025.
- Cortes-Canteli, M., J. Paul, E. H. Norris, R. Bronstein, H. J. Ahn, D. Zamolodchikov, S. Bhuvanendran, K. M. Fenz and S. Strickland (2010). "Fibrinogen and beta-amyloid association alters thrombosis and fibrinolysis: a possible contributing factor to Alzheimer's disease." Neuron **66**(5): 695-709.
- Cortes-Canteli, M., D. Zamolodchikov, H. J. Ahn, S. Strickland and E. H. Norris (2012). "Fibrinogen and altered hemostasis in Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **32**(3): 599-608.
- Dale, G. L. (2005). "Coated-platelets: an emerging component of the procoagulant response." J Thromb Haemost **3**(10): 2185-2192.
- Danik, M., J. G. Chabot, D. Hassan-Gonzalez, M. Suhan and R. Quirion (1993). "Localization of sulfated glycoprotein-2/clusterin mRNA in the rat brain by in situ hybridization." J Comp Neurol **334**(2): 209-227.
- Darden, T., D. York and L. Pedersen (1993). "Particle Mesh Ewald - an N.Log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems." Journal of Chemical Physics **98**(12): 10089-10092.
- de Silva, H. V., J. A. Harmony, W. D. Stuart, C. M. Giland J. Robbins (1990). "Apolipoprotein J: structure and tissue distribution." Biochemistry **29**(22): 5380-5389.
- DeMattos, R. B., A. O'Dell M, M. Parsadanian, J. W. Taylor, J. A. Harmony, K. R. Bales, S. M. Paul, B. J. Aronow and D. M. Holtzman (2002). "Clusterin promotes amyloid plaque formation

and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10843-10848.

Di Luca, M., L. Pastorino, F. Cattabeni, R. Zanardi, S. Scarone, G. Racagni, E. Smeraldi and J. Perez (1996). "Abnormal pattern of platelet APP isoforms in Alzheimer disease and Down syndrome." Arch Neurol **53**(11): 1162-1166.

Donner, L. and M. Elvers (2017). Platelets and Neurodegenerative Diseases. In: Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update.

Donner, L., K. Falker, L. Gremer, S. Klinker, G. Pagani, L. U. Ljungberg, K. Lothmann, F. Rizzi, M. Schaller, H. Gohlke, D. Willbold, M. Grenegard and M. Elvers (2016). "Platelets contribute to amyloid-beta aggregation in cerebral vessels through integrin α IIb β 3-induced outside-in signaling and clusterin release." Sci Signal **9**(429): ra52.

Estevez, B., B. Shen and X. Du (2015). "Targeting integrin and integrin signaling in treating thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **35**(1): 24-29.

Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ ." Cell **106**(4): 489-498.

Evin, G., A. Zhu, R. M. Holsinger, C. L. Masters and Q. X. Li (2003). "Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets." J Neurosci Res **74**(3): 386-392.

Forstl, H. and A. Kurz (1999). "Clinical features of Alzheimer's disease." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **249**(6): 288-290.

Fotiadis, P., S. van Rooden, J. van der Grond, A. Schultz, S. Martinez-Ramirez, E. Auriel, Y. Reijmer, A. M. van Opstal, A. Ayres, K. M. Schwab, I. Alzheimer's Disease Neuroimaging, T. Hedden, J. Rosand, A. Viswanathan, M. Wermer, G. Terwindt, R. A. Sperling, J. R. Polimeni, K. A. Johnson, M. A. van Buchem, S. M. Greenberg and M. E. Gurol (2016). "Cortical atrophy in patients with cerebral amyloid angiopathy: a case-control study." Lancet Neurol **15**(8): 811-819.

Gachet, C. (2006). "Regulation of platelet functions by P2 receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **46**: 277-300.

Gachet, C. (2008). "P2 receptors, platelet function and pharmacological implications." Thromb Haemost **99**(3): 466-472.

Gahr, M., D. A. Nowak, B. J. Connemann and C. Schonfeldt-Lecuona (2012). "[Cerebral amyloid angiopathy--an update]." Fortschr Neurol Psychiatr **80**(11): 618-626.

Gawaz, M., H. Langer and A. E. May (2005). "Platelets in inflammation and atherogenesis." J Clin Invest **115**(12): 3378-3384.

George, J. N. (2000). "Platelets." Lancet **355**(9214): 1531-1539.

Ghisso, J., E. Matsubara, A. Koudinov, N. H. Choi-Miura, M. Tomita, T. Wisniewski and B. Frangione (1993). "The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex." Biochem J **293** (Pt 1): 27-30.

Ghosh, K., A. Khare, S. Shetty, S. Nair, B. Kulkarni and D. Mohanty (2006). "Flow cytometric evidence of platelet activation in patients on aspirin following myocardial infarction." Natl Med J India **19**(2): 73-74.

Glenner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein." Biochem Biophys Res Commun **122**(3): 1131-1135.

- Glennner, G. G. and C. W. Wong (1984). "Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein." Biochem Biophys Res Commun **120**(3): 885-890.
- Gohlke, H., B. Schmitz, A. Sommerfeld, R. Reinehrand, D. Häussinger (2013). "α₅β₁-Integrins are sensors for tauroursodeoxycholic acid in hepatocytes." Hepatology **57**: 1117–1129.
- Gowert, N. S., L. Donner, M. Chatterjee, Y. S. Eisele, S. T. Towhid, P. Munzer, B. Walker, I. Ogorek, O. Borst, M. Grandoch, M. Schaller, J. W. Fischer, M. Gawaz, S. Weggen, F. Lang, M. Jucker and M. Elvers (2014). "Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease." PLoS One **9**(2): e90523.
- Gowert, N. S., I. Kruger, M. Klier, L. Donner, F. Kipkeew, M. Gliem, N. J. Bradshaw, D. Lutz, S. Kober, H. Langer, S. Jander, K. Jurk, M. Frotscher, C. Korth, H. H. Bock and M. Elvers (2017). "Loss of Reelin protects mice against arterial thrombosis by impairing integrin activation and thrombus formation under high shear conditions." Cell Signal **40**: 210-221.
- Group, A. D. C., P. Bentham, R. Gray, E. Sellwood, R. Hills, P. Crome and J. Raftery (2008). "Aspirin in Alzheimer's disease (AD2000): a randomised open-label trial." Lancet Neurol **7**(1): 41-49.
- Haass, C. and D. J. Selkoe (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.
- Hanson, J., X. de Leval, J. L. David, C. Supuran, B. Pirotte and J. M. Dogne (2004). "Progress in the field of GPIIb/IIIa antagonists." Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents **2**(2): 157-167.
- Hardy, J. A. and G. A. Higgins (1992). "Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis." Science **256**(5054): 184-185.
- Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M. L. Hamshere, J. S. Pahwa, V. Moskvina, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A. R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M. K. Lupton, C. Brayne, D. C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K. S. Brown, P. A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A. D. Smith, S. Love, P. G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schurmann, R. Heun, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frolich, H. Hampel, M. Hull, D. Rujescu, A. M. Goate, J. S. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J. C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P. P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N. J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C. E. Shaw, M. Tsolaki, A. B. Singleton, R. Guerreiro, T. W. Muhleisen, M. M. Nothen, S. Moebus, K. H. Jockel, N. Klopp, H. E. Wichmann, M. M. Carrasquillo, V. S. Pankratz, S. G. Younkin, P. A. Holmans, M. O'Donovan, M. J. Owen and J. Williams (2009). "Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease." Nat Genet **41**(10): 1088-1093.
- Harrington, C. R. (2012). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." Neuroimaging Clin N Am **22**(1): 11-22, vii.
- Helzner, E. P., J. A. Luchsinger, N. Scarmeas, S. Cosentino, A. M. Brickman, M. M. Glymour and Y. Stern (2009). "Contribution of vascular risk factors to the progression in Alzheimer disease." Arch Neurol **66**(3): 343-348.
- Hendrie, H. C. (1998). "Epidemiology of dementia and Alzheimer's disease." Am J Geriatr Psychiatry **6**(2 Suppl 1): S3-18.
- Herczenik, E., B. Bouma, S. J. Korpelaar, R. Strangi, Q. Zeng, P. Gros, M. Van Eck, T. J. Van Berkel, M. F. Geubbink and J. W. Akkerman (2007). "Activation of human platelets by misfolded proteins." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(7): 1657-1665.
- Hick, M., U. Herrmann, S. W. Weyer, J. P. Mallm, J. A. Tschape, M. Borgers, M. Mercken, F. C. Roth, A. Draguhn, L. Slomianka, D. P. Wolfer, M. Korte and U. C. Muller (2015). "Acute

- function of secreted amyloid precursor protein fragment APP α in synaptic plasticity." Acta Neuropathol **129**(1): 21-37.
- Hoe, H. S., K. J. Lee, R. S. Carney, J. Lee, A. Markova, J. Y. Lee, B. W. Howell, B. T. Hyman, D. T. Pak, G. BuandG. W. Rebeck (2009). "Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth." J Neurosci **29**(23): 7459-7473.
- Honig, L. S., M. X. Tang, S. Albert, R. Costa, J. Luchsinger, J. Manly, Y. SternandR. Mayeux (2003). "Stroke and the risk of Alzheimer disease." Arch Neurol **60**(12): 1707-1712.
- Howlett, D. R., T. HortobagyiandP. T. Francis (2013). "Clusterin associates specifically with Abeta40 in Alzheimer's disease brain tissue." Brain Pathol **23**(6): 623-632.
- Iwatsubo, T., A. Odaka, N. Suzuki, H. Mizusawa, N. NukinaandY. Ihara (1994). "Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43)." Neuron **13**(1): 45-53.
- Jackson, S. P. (2011). "Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly." Nat Med **17**(11): 1423-1436.
- Jakes, R., M. Novak, M. DavisonandC. M. Wischik (1991). "Identification of 3- and 4-repeat tau isoforms within the PHF in Alzheimer's disease." EMBO J **10**(10): 2725-2729.
- Jarre, A., N. S. Gowert, L. Donner, P. Munzer, M. Klier, O. Borst, M. Schaller, F. Lang, C. KorthandM. Elvers (2014). "Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease." Cell Signal **26**(9): 2040-2050.
- Jellinger, K. A. (2002). "Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update." J Neural Transm (Vienna) **109**(5-6): 813-836.
- Jenne, D. E., B. Lowin, M. C. Peitsch, A. Bottcher, G. SchmitzandJ. Tschopp (1991). "Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma." J Biol Chem **266**(17): 11030-11036.
- Jenne, D. E.andJ. Tschopp (1992). "Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein." Trends Biochem Sci **17**(4): 154-159.
- Jirouskova, M., A. S. ShetandG. J. Johnson (2007). "A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations." J Thromb Haemost **5**(4): 661-669.
- Jongbloed, W., K. D. van Dijk, S. D. Mulder, W. D. van de Berg, M. A. Blankenstein, W. van der FlierandR. Veerhuis (2015). "Clusterin Levels in Plasma Predict Cognitive Decline and Progression to Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **46**(4): 1103-1110.
- Jonsson, T., J. K. Atwal, S. Steinberg, J. Snaedal, P. V. Jonsson, S. Bjornsson, H. Stefansson, P. Sulem, D. Gudbjartsson, J. Maloney, K. Hoyte, A. Gustafson, Y. Liu, Y. Lu, T. Bhangale, R. R. Graham, J. Huttenlocher, G. Bjornsdottir, O. A. Andreassen, E. G. Jonsson, A. Palotie, T. W. Behrens, O. T. Magnusson, A. Kong, U. Thorsteinsdottir, R. J. WattsandK. Stefansson (2012). "A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline." Nature **488**(7409): 96-99.
- Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. ImpeyandM. L. Klein (1983). "Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water." Journal of Chemical Physics **79**(2): 926-935.
- Jurk, K.andB. E. Kehrel (2010). "[Pathophysiology and biochemistry of platelets]." Internist (Berl) **51**(9): 1086, 1088-1092, 1094.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. BeyreutherandB. Muller-Hill (1987). "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor." Nature **325**(6106): 733-736.
- Kauffmanstein, G., W. Bergmeier, A. Eckly, P. Ohlmann, C. Leon, J. P. Cazenave, B. NieswandtandC. Gachet (2001). "The P2Y₁₂ receptor induces platelet aggregation through

weak activation of the alpha(IIb)beta(3) integrin--a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism." *FEBS Lett* **505**(2): 281-290.

Kehrel, B. E. (2003). "[Blood platelets: biochemistry and physiology]." *Hamostaseologie* **23**(4): 149-158.

Kennelly, S. P., B. A. Lawlor and R. A. Kenny (2009). "Blood pressure and the risk for dementia: a double edged sword." *Ageing Res Rev* **8**(2): 61-70.

Kirszbaum, L., S. E. Bozas and I. D. Walker (1992). "SP-40,40, a protein involved in the control of the complement pathway, possesses a unique array of disulphide bridges." *FEBS Lett* **297**(1-2): 70-76.

Kokjohn, T. A., G. D. Van Vickle, C. L. Maarouf, W. M. Kalback, J. M. Hunter, I. D. Dausg, D. C. Luehrs, J. Lopez, D. Brune, L. I. Sue, T. G. Beach, E. M. Castano and A. E. Roher (2011). "Chemical characterization of pro-inflammatory amyloid-beta peptides in human atherosclerotic lesions and platelets." *Biochim Biophys Acta* **1812**(11): 1508-1514.

Kononova, O., R. I. Litvinov, D. S. Blokhin, V. V. Klochkov, J. W. Weisel, J. S. Bennett and V. Barsegov (2017). "Mechanistic Basis for the Binding of RGD- and AGDV-Peptides to the Platelet Integrin alphaIIb beta3." *Biochemistry* **56**(13): 1932-1942.

Kowalska, M. A. and K. Badellino (1994). "beta-Amyloid protein induces platelet aggregation and supports platelet adhesion." *Biochem Biophys Res Commun* **205**(3): 1829-1835.

LaFerla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). "Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease." *Nat Rev Neurosci* **8**(7): 499-509.

Langford, E. J., R. J. Wainwright and J. F. Martin (1996). "Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(1): 51-55.

Law, D. A., F. R. DeGuzman, P. Heiser, K. Ministri-Madrid, N. Killeen and D. R. Phillips (1999). "Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function." *Nature* **401**(6755): 808-811.

Law, D. A., L. Nannizzi-Alaimo and D. R. Phillips (1996). "Outside-in integrin signal transduction. Alpha IIb beta 3-(GP IIb IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation." *J Biol Chem* **271**(18): 10811-10815.

Lefrancais, E., G. Ortiz-Munoz, A. Caudrillier, B. Mallavia, F. Liu, D. M. Sayah, E. E. Thornton, M. B. Headley, T. David, S. R. Coughlin, M. F. Krummel, A. D. Leavitt, E. Passegue and M. R. Looney (2017). "The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors." *Nature* **544**(7648): 105-109.

Leskov, K. S., D. Y. Klokov, J. Li, T. J. Kinsella and D. A. Boothman (2003). "Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein." *J Biol Chem* **278**(13): 11590-11600.

Li, P. F., L. F. Song and K. M. Merz (2015). "Parameterization of Highly Charged Metal Ions Using the 12-6-4 LJ-Type Nonbonded Model in Explicit Water." *Journal of Physical Chemistry B* **119**(3): 883-895.

Li, Q. X., M. C. Berndt, A. I. Bush, B. Rumble, I. Mackenzie, A. Friedhuber, K. Beyreuther and C. L. Masters (1994). "Membrane-associated forms of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease in human platelet and brain: surface expression on the activated human platelet." *Blood* **84**(1): 133-142.

Li, Q. X., S. Whyte, J. E. Tanner, G. Evin, K. Beyreuther and C. L. Masters (1998). "Secretion of Alzheimer's disease A beta amyloid peptide by activated human platelets." *Lab Invest* **78**(4): 461-469.

Li, X., Y. Ma, X. Wei, Y. Li, H. Wu, J. Zhuang and Z. Zhao (2014). "Clusterin in Alzheimer's disease: a player in the biological behavior of amyloid-beta." *Neurosci Bull* **30**(1): 162-168.

- Li, Z., M. K. Delaney, K. A. O'Brien and X. Du (2010). "Signaling during platelet adhesion and activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(12): 2341-2349.
- Lin, F. Y., J. Zhu, E. T. Eng, N. E. Hudson and T. A. Springer (2016). "beta-Subunit Binding Is Sufficient for Ligands to Open the Integrin α IIb β 3 Headpiece." J Biol Chem **291**(9): 4537-4546.
- Lista, S., S. E. O'Bryant, K. Blennow, B. Dubois, J. Hugon, H. Zetterberg and H. Hampel (2015). "Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **47**(2): 291-317.
- Liu, C. C., C. C. Liu, T. Kanekiyo, H. Xu and G. Bu (2013). "Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy." Nat Rev Neurol **9**(2): 106-118.
- Maier, J. A., C. Martinez, K. Kasavajhala, L. Wickstrom, K. E. Hauser and C. Simmerling (2015). "ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB." Journal of Chemical Theory and Computation **11**(8): 3696-3713.
- Mandelkow, E. M. and E. Mandelkow (1998). "Tau in Alzheimer's disease." Trends Cell Biol **8**(11): 425-427.
- Mandybur, T. I. (1986). "Cerebral amyloid angiopathy: the vascular pathology and complications." J Neuropathol Exp Neurol **45**(1): 79-90.
- Maruyama, K., K. Terakado, M. Usami and K. Yoshikawa (1990). "Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor." Nature **347**(6293): 566-569.
- Masters, C. L., G. Simms, N. A. Weinman, G. Multhaup, B. L. McDonald and K. Beyreuther (1985). "Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(12): 4245-4249.
- Matsubara, E., B. Frangione and J. Ghiso (1995). "Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction." J Biol Chem **270**(13): 7563-7567.
- Maurer, K., S. Volk and H. Gerbaldo (1997). "Auguste D and Alzheimer's disease." Lancet **349**(9064): 1546-1549.
- McLaurin, J., R. Cecal, M. E. Kierstead, X. Tian, A. L. Phinney, M. Manea, J. E. French, M. H. Lambermon, A. A. Darabie, M. E. Brown, C. Janus, M. A. Chishti, P. Horne, D. Westaway, P. E. Fraser, H. T. Mount, M. Przybylski and P. St George-Hyslop (2002). "Therapeutically effective antibodies against amyloid-beta peptide target amyloid-beta residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis." Nat Med **8**(11): 1263-1269.
- Mielke, M. M., P. B. Rosenberg, J. Tschanz, L. Cook, C. Corcoran, K. M. Hayden, M. Norton, P. V. Rabins, R. C. Green, K. A. Welsh-Bohmer, J. C. Breitner, R. Munger and C. G. Lyketsos (2007). "Vascular factors predict rate of progression in Alzheimer disease." Neurology **69**(19): 1850-1858.
- Morris, J. K., R. A. Honea, E. D. Vidoni, R. H. Swerdlow and J. M. Burns (2014). "Is Alzheimer's disease a systemic disease?" Biochim Biophys Acta **1842**(9): 1340-1349.
- Moulin, S., J. Labreuche, S. Bombois, C. Rossi, G. Boulouis, H. Henon, A. Duhamel, D. Leys and C. Cordonnier (2016). "Dementia risk after spontaneous intracerebral haemorrhage: a prospective cohort study." Lancet Neurol **15**(8): 820-829.
- Muller, U. C., T. Deller and M. Korte (2017). "Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family." Nat Rev Neurosci **18**(5): 281-298.
- Murray, B., B. Sharma and G. Belfort (2017). "N-Terminal Hypothesis for Alzheimer's Disease." ACS Chem Neurosci **8**(3): 432-434.
- Murray, B., M. Sorci, J. Rosenthal, J. Lippens, D. Isaacson, P. Das, D. Fabris, S. Li and G. Belfort (2016). "A2T and A2V A beta peptides exhibit different aggregation kinetics, primary nucleation, morphology, structure, and LTP inhibition." Proteins **84**(4): 488-500.

- Narayan, P., S. Meehan, J. A. Carver, M. R. Wilson, C. M. Dobson and D. Klenerman (2012). "Amyloid-beta oligomers are sequestered by both intracellular and extracellular chaperones." Biochemistry **51**(46): 9270-9276.
- Nieswandt, B., D. Varga-Szabo and M. Elvers (2009). "Integrins in platelet activation." J Thromb Haemost **7 Suppl 1**: 206-209.
- Nurden, A. T. (2017). "Should studies on Glanzmann thrombasthenia not be telling us more about cardiovascular disease and other major illnesses?" Blood Rev **31**(5): 287-299.
- Nussbaum, J. M., S. Schilling, H. Cynis, A. Silva, E. Swanson, T. Wangsanut, K. Tayler, B. Wiltgen, A. Hatami, R. Ronicke, K. Reymann, B. Hutter-Paier, A. Alexandru, W. Jagla, S. Graubner, C. G. Glabe, H. U. Demuth and G. S. Bloom (2012). "Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta." Nature **485**(7400): 651-655.
- Nussinov, R. and S. Kumar (2000). "Salt bridge stability in monomeric proteins." Biophysical Journal **78**(1): 425a-425a.
- Nuutinen, T., T. Suuronen, A. Kauppinen and A. Salminen (2009). "Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease." Brain Res Rev **61**(2): 89-104.
- O'Bryan, M. K., S. S. Cheema, P. F. Bartlett, B. F. Murphy and M. J. Pearse (1993). "Clusterin levels increase during neuronal development." J Neurobiol **24**(4): 421-432.
- Oda, T., P. Wals, H. H. Osterburg, S. A. Johnson, G. M. Pasinetti, T. E. Morgan, I. Rozovsky, W. B. Stine, S. W. Snyder, T. F. Holzman and et al. (1995). "Clusterin (apoJ) alters the aggregation of amyloid beta-peptide (A beta 1-42) and forms slowly sedimenting A beta complexes that cause oxidative stress." Exp Neurol **136**(1): 22-31.
- Odell, T. T., Jr. and D. T. Mc (1961). "Life span of mouse blood platelets." Proc Soc Exp Biol Med **106**: 107-108.
- Offermanns, S. (2006). "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors." Circ Res **99**(12): 1293-1304.
- Ohtaki, H. and T. Radnai (1993). "Structure and Dynamics of Hydrated Ions." Chemical Reviews **93**(3): 1157-1204.
- Pantoni, L. (2010). "Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges." Lancet Neurol **9**(7): 689-701.
- Pfeifer, L. A., L. R. White, G. W. Ross, H. Petrovitch and L. J. Launer (2002). "Cerebral amyloid angiopathy and cognitive function: the HAAS autopsy study." Neurology **58**(11): 1629-1634.
- Premkumar, D. R., D. L. Cohen, P. Hedera, R. P. Friedland and R. N. Kalaria (1996). "Apolipoprotein E-epsilon4 alleles in cerebral amyloid angiopathy and cerebrovascular pathology associated with Alzheimer's disease." Am J Pathol **148**(6): 2083-2095.
- Prince M, C.-H. A., Knapp M, et al. "World Alzheimer report 2016: improving healthcare for people living with dementia: coverage, quality and costs now and in the future. London, UK: Alzheimer's Disease International, 2016, <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2016.pdf> 2016."
- Prodan, C. I., E. D. Ross, A. S. Vincent and G. L. Dale (2007). "Coated-platelets are higher in amnesic versus nonamnesic patients with mild cognitive impairment." Alzheimer Dis Assoc Disord **21**(3): 259-261.
- Prodan, C. I., E. D. Ross, A. S. Vincent and G. L. Dale (2008). "Rate of progression in Alzheimer's disease correlates with coated-platelet levels--a longitudinal study." Transl Res **152**(3): 99-102.
- Purrello, M., S. Bettuzzi, C. Di Pietro, E. Mirabile, M. Di Blasi, R. Rimini, K. H. Grzeschik, C. Ingletti, A. Corti and G. Sichel (1991). "The gene for SP-40,40, human homolog of rat sulfated glycoprotein 2, rat clusterin, and rat testosterone-repressed prostate message 2, maps to chromosome 8." Genomics **10**(1): 151-156.

- Puzzo, D., L. Privitera, M. Fa, A. Staniszewski, G. Hashimoto, F. Aziz, M. Sakurai, E. M. Ribe, C. M. Troy, M. Mercken, S. S. Jung, A. Palmeri and O. Arancio (2011). "Endogenous amyloid-beta is necessary for hippocampal synaptic plasticity and memory." Ann Neurol **69**(5): 819-830.
- Rakesh, G., S. T. Szabo, G. S. Alexopoulos and A. S. Zannas (2017). "Strategies for dementia prevention: latest evidence and implications." Ther Adv Chronic Dis **8**(8-9): 121-136.
- Revesz, T., J. Ghiso, T. Lashley, G. Plant, A. Rostagno, B. Frangione and J. L. Holton (2003). "Cerebral amyloid angiopathies: a pathologic, biochemical, and genetic view." J Neuropathol Exp Neurol **62**(9): 885-898.
- Riddel, J. P., Jr., B. E. Aouizerat, C. Miaskowski and D. P. Lillicrap (2007). "Theories of blood coagulation." J Pediatr Oncol Nurs **24**(3): 123-131.
- Rinder, C. S., L. A. Student, J. L. Bonan, H. M. Rinder and B. R. Smith (1993). "Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release." Blood **82**(2): 505-512.
- Roe, D. R. and T. E. Cheatham (2013). "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data." Journal of Chemical Theory and Computation **9**(7): 3084-3095.
- Ruggeri, Z. M. (2002). "Platelets in atherothrombosis." Nat Med **8**(11): 1227-1234.
- Ruggeri, Z. M. and G. L. Mendolicchio (2007). "Adhesion mechanisms in platelet function." Circ Res **100**(12): 1673-1685.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." Annu Rev Cell Dev Biol **12**: 697-715.
- Ryckaert, J. P., G. Ciccotti and H. J. C. Berendsen (1977). "Numerical-Integration of Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints - Molecular-Dynamics of N-Alkanes." Journal of Computational Physics **23**(3): 327-341.
- Sabo, S. L., A. F. Ikin, J. D. Buxbaum and P. Greengard (2003). "The amyloid precursor protein and its regulatory protein, FE65, in growth cones and synapses in vitro and in vivo." J Neurosci **23**(13): 5407-5415.
- Saunders, A. M. (2001). "Gene identification in Alzheimer's disease." Pharmacogenomics **2**(3): 239-249.
- Schilling, S., T. Lauber, M. Schaupp, S. Manhart, E. Scheel, G. Bohm and H. U. Demuth (2006). "On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (in vitro)." Biochemistry **45**(41): 12393-12399.
- Selkoe, D. J. (1991). "The molecular pathology of Alzheimer's disease." Neuron **6**(4): 487-498.
- Selkoe, D. J. (2002). "Deciphering the genesis and fate of amyloid beta-protein yields novel therapies for Alzheimer disease." J Clin Invest **110**(10): 1375-1381.
- Selkoe, D. J. (2011). "Alzheimer's disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **3**(7).
- Selkoe, D. J. and J. Hardy (2016). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years." EMBO Mol Med **8**(6): 595-608.
- Sevush, S., W. Jy, L. L. Horstman, W. W. Mao, L. Kolodny and Y. S. Ahn (1998). "Platelet activation in Alzheimer disease." Arch Neurol **55**(4): 530-536.
- Shankar, G. M., S. Li, T. H. Mehta, A. Garcia-Munoz, N. E. Shepardson, I. Smith, F. M. Brett, M. A. Farrell, M. J. Rowan, C. A. Lemere, C. M. Regan, D. M. Walsh, B. L. Sabatini and D. J. Selkoe (2008). "Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory." Nat Med **14**(8): 837-842.

- Shen, M. Y., G. Hsiao, T. H. Fong, H. M. Chen, D. S. Chou, C. H. Lin, J. R. Sheu and C. Y. Hsu (2008). "Amyloid beta peptide-activated signal pathways in human platelets." Eur J Pharmacol **588**(2-3): 259-266.
- Shen, M. Y., G. Hsiao, T. H. Fong, D. S. Chou and J. R. Sheu (2008). "Expression of amyloid beta peptide in human platelets: pivotal role of the phospholipase Cgamma2-protein kinase C pathway in platelet activation." Pharmacol Res **57**(2): 151-158.
- Silkensen, J. R., K. M. Skubitz, A. P. Skubitz, D. H. Chmielewski, J. C. Manivel, J. A. Dvergsten and M. E. Rosenberg (1995). "Clusterin promotes the aggregation and adhesion of renal porcine epithelial cells." J Clin Invest **96**(6): 2646-2653.
- Slunt, H. H., G. Thinakaran, C. Von Koch, A. C. Lo, R. E. Tanzi and S. S. Sisodia (1994). "Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP)." J Biol Chem **269**(4): 2637-2644.
- Smith, E. E. and S. M. Greenberg (2009). "Beta-amyloid, blood vessels, and brain function." Stroke **40**(7): 2601-2606.
- Soldner, C. A., H. Sticht and A. H. C. Horn (2017). "Role of the N-terminus for the stability of an amyloid-beta fibril with three-fold symmetry." PLoS One **12**(10): e0186347.
- Solh, T., A. Botsford and M. Solh (2015). "Glanzmann's thrombasthenia: pathogenesis, diagnosis, and current and emerging treatment options." J Blood Med **6**: 219-227.
- Sonkar, V. K., P. P. Kulkarni and D. Dash (2014). "Amyloid beta peptide stimulates platelet activation through RhoA-dependent modulation of actomyosin organization." FASEB J **28**(4): 1819-1829.
- Sosnoski, D. M., B. S. Emanuel, A. L. Hawkins, P. van Tuinen, D. H. Ledbetter, R. L. Nussbaum, F. T. Kaos, E. Schwartz, D. Phillips, J. S. Bennett and et al. (1988). "Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa." J Clin Invest **81**(6): 1993-1998.
- Stellos, K., V. Panagiotou, A. Kogel, T. Leyhe, M. Gawaz and C. Laske (2010). "Predictive value of platelet activation for the rate of cognitive decline in Alzheimer's disease patients." J Cereb Blood Flow Metab **30**(11): 1817-1820.
- Strittmatter, W. J., A. M. Saunders, D. Schmechel, M. Pericak-Vance, J. Enghild, G. S. Salvesen and A. D. Roses (1993). "Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(5): 1977-1981.
- Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, M. Duke, K. H. Wiederhold, C. Mistl, S. Rothacher, B. Ledermann, K. Burki, P. Frey, P. A. Paganetti, C. Waridel, M. E. Calhoun, M. Jucker, A. Probst, M. Staudenmann and B. Sommer (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13287-13292.
- Tanzi, R. E. (2012). "The genetics of Alzheimer disease." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(10).
- Thal, D. R., W. S. Griffin, R. A. de Vos and E. Ghebremedhin (2008). "Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **115**(6): 599-609.
- Tschopp, J., D. E. Jenne, S. Hertig, K. T. Preissner, H. Morgenstern, A. P. Sapino and L. French (1993). "Human megakaryocytes express clusterin and package it without apolipoprotein A-1 into alpha-granules." Blood **82**(1): 118-125.
- Van Nostrand, W. E., A. H. Schmaier, J. S. Farrow and D. D. Cunningham (1990). "Protease nexin-II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein." Science **248**(4956): 745-748.

- Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.
- Veitinger, M., B. Varga, S. B. Guterres and M. Zellner (2014). "Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers?" Acta Neuropathol Commun **2**: 65.
- Venkatasubramaniam, A., A. Drude and T. Good (2014). "Role of N-terminal residues in Abeta interactions with integrin receptor and cell surface." Biochim Biophys Acta **1838**(10): 2568-2577.
- Verbeek, M. M., I. Otte-Holler, R. Veerhuis, D. J. Ruiter and R. M. De Waal (1998). "Distribution of A beta-associated proteins in cerebrovascular amyloid of Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **96**(6): 628-636.
- Verbrugghe, P., P. Kujala, W. Waelput, P. J. Peters and C. A. Cuvelier (2008). "Clusterin in human gut-associated lymphoid tissue, tonsils, and adenoids: localization to M cells and follicular dendritic cells." Histochem Cell Biol **129**(3): 311-320.
- Verghese, P. B., J. M. Castellano, K. Garai, Y. Wang, H. Jiang, A. Shah, G. Bu, C. Frieden and D. M. Holtzman (2013). "ApoE influences amyloid-beta (Abeta) clearance despite minimal apoE/Abeta association in physiological conditions." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(19): E1807-1816.
- Vinters, H. V. (1987). "Cerebral amyloid angiopathy. A critical review." Stroke **18**(2): 311-324.
- Wagner, C. L., M. A. Mascelli, D. S. Neblock, H. F. Weisman, B. S. Collier and R. E. Jordan (1996). "Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets." Blood **88**(3): 907-914.
- Welzel, A. T., J. E. Maggio, G. M. Shankar, D. E. Walker, B. L. Ostaszewski, S. Li, I. Klyubin, M. J. Rowan, P. Seubert, D. M. Walsh and D. J. Selkoe (2014). "Secreted amyloid beta-proteins in a cell culture model include N-terminally extended peptides that impair synaptic plasticity." Biochemistry **53**(24): 3908-3921.
- Willem, M., S. Tahirovic, M. A. Busche, S. V. Ovsepian, M. Chafai, S. Kootar, D. Hornburg, L. D. Evans, S. Moore, A. Daria, H. Hampel, V. Muller, C. Giudici, B. Nuscher, A. Wenninger-Weinzierl, E. Kremmer, M. T. Heneka, D. R. Thal, V. Giedraitis, L. Lannfelt, U. Muller, F. J. Livesey, F. Meissner, J. Herms, A. Konnerth, H. Marie and C. Haass (2015). "eta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus." Nature **526**(7573): 443-447.
- Wilson, M. R. and S. B. Easterbrook-Smith (2000). "Clusterin is a secreted mammalian chaperone." Trends Biochem Sci **25**(3): 95-98.
- Wilson, M. R., J. J. Yerbury and S. Poon (2008). "Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity." Mol Biosyst **4**(1): 42-52.
- Winkler, D. T., L. Bondolfi, M. C. Herzig, L. Jann, M. E. Calhoun, K. H. Wiederhold, M. Tolnay, M. Staufenbiel and M. Jucker (2001). "Spontaneous hemorrhagic stroke in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy." J Neurosci **21**(5): 1619-1627.
- Wiseman, F. K., T. Al-Janabi, J. Hardy, A. Karmiloff-Smith, D. Nizetic, V. L. Tybulewicz, E. M. Fisher and A. Strydom (2015). "A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome." Nat Rev Neurosci **16**(9): 564-574.
- Wong, P., D. Taillefer, J. Lakins, J. Pineault, G. Chader and M. Tenniswood (1994). "Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration." Eur J Biochem **221**(3): 917-925.
- Xiong, L., S. Davidsdottir, Y. D. Reijmer, A. Shoamanesh, D. Roongpiboonsopit, S. Thanprasertsuk, S. Martinez-Ramirez, A. Charidimou, A. M. Ayres, P. Fotiadis, E. Gurol, D. L. Blacker, S. M. Greenberg and A. Viswanathan (2016). "Cognitive Profile and its Association with Neuroimaging Markers of Non-Demented Cerebral Amyloid Angiopathy Patients in a Stroke Unit." J Alzheimers Dis **52**(1): 171-178.

- Xu, F., J. Davis, J. Miao, M. L. Previti, G. Romanov, K. Ziegler and W. E. Van Nostrand (2005). "Protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor limits cerebral thrombosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(50): 18135-18140.
- Xu, F., M. L. Previti and W. E. Van Nostrand (2007). "Increased severity of hemorrhage in transgenic mice expressing cerebral protease nexin-2/amyloid beta-protein precursor." Stroke **38**(9): 2598-2601.
- Yamada, M. (2000). "Cerebral amyloid angiopathy: an overview." Neuropathology **20**(1): 8-22.
- Yang, C. R., K. Leskov, K. Hosley-Eberlein, T. Criswell, J. J. Pink, T. J. Kinsella and D. A. Boothman (2000). "Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5907-5912.
- Yerbury, J. J., S. Poon, S. Meehan, B. Thompson, J. R. Kumita, C. M. Dobson and M. R. Wilson (2007). "The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures." FASEB J **21**(10): 2312-2322.
- Young-Pearse, T. L., J. Bai, R. Chang, J. B. Zheng, J. J. LoTurco and D. J. Selkoe (2007). "A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference." J Neurosci **27**(52): 14459-14469.
- Zainaghi, I. A., L. L. Talib, B. S. Diniz, W. F. Gattaz and O. V. Forlenza (2012). "Reduced platelet amyloid precursor protein ratio (APP ratio) predicts conversion from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease." J Neural Transm (Vienna) **119**(7): 815-819.
- Zekry, D., C. Duyckaerts, J. Belmin, C. Geoffre, R. Moulia and J. J. Hauw (2003). "Cerebral amyloid angiopathy in the elderly: vessel walls changes and relationship with dementia." Acta Neuropathol **106**(4): 367-373.
- Zhang, H., Q. Ma, Y. W. Zhang and H. Xu (2012). "Proteolytic processing of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein." J Neurochem **120 Suppl 1**: 9-21.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
α	anti-
μ	mikro
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AD	<i>Alzheimer`s disease</i>
ADP	Adenosindiphosphat
Aph-1	<i>Anterior pharynx defective</i>
ApoE4	Apolipoprotein E ε4-Allel
APP	Amyloid-Vorläufer-Protein (<i>Amyloid precursor protein</i>)
Aβ	Amyloid-β Peptid
BACE1	<i>beta-site APP-cleaving enzyme 1</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLI	Bio-Layer-Interferometrie
bzw.	beziehungsweise
CLU	Clusterin
cPLA2	zytosolische Phospholipase A2
CTFα	C-terminale Fragment
DAG	1,2-Diacylglycerin
d.h.	das heißt
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activating cell sorting</i> , Durchflusszytometrie

g	Gramm
GP1Ib/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
GPGR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GT	Glanzmann-Thrombasthenie
h	Stunden
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
IZB	Intrazerebrale Blutungen
kD	Kilodalton
L	Liter
LRP1	Lipoprotein-verwandte Protein 1
LRP 2	Lipoprotein-verwandte Protein 2 (Megalin)
M	Molar
MCI	<i>Mild Cognitive Impairment</i>
MD	Molekulardynamik
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Nct	Nicestrin
NFTs	neurofibrillary tangles
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren

Pen-2	Präsenilin-Verstärker
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PHF	<i>paired helical filaments</i>
PLCγ2	Phospholipase Cγ2
PKC	Proteinkinase C
PS1 und PS 2	Präsenilin-1 und -2
PSEN1	Presenelin 1
PSEN 2	Presenelin 2
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
SFKs	Src-Familienkinasen
SNPs	Single-Nukleotid-Polymorphismen
TA	Thromboxan-A ₂ -Rezeptor
TXA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor
z.B.	zum Beispiel
ZAA	Zerebrale Amyloidangiopathie (<i>cerebral amyloid angiopathy, CAA</i>)
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histopathologische Charakteristika der AD.....	3
Abbildung 2: Proteolytische Prozessierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP).	4
Abbildung 3: Amyloid-Kaskaden-Hypothese.	6
Abbildung 4: Thrombozytäre Prozesse in der Hämostase.....	12
Abbildung 5: Thrombozytäre P2-Rezeptoren.	13
Abbildung 6: Konformationszustand von Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ während der Aktivierung und Ligandenbindung.	15
Abbildung 7: Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -vermitteltes <i>Outside-in signaling</i>	16

Eigene Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

- (1) Gowert NS, Krüger I, Klier M, **Donner L**, Kipkeew F, Gliem M, Bradshaw NJ, Lutz D, Köber S, Langer H, Jander S, Jurk K, Frotscher M, Korth C, Bock HH, Elvers M. Loss of Reelin protects mice against arterial thrombosis by impairing integrin activation and thrombus formation under high shear conditions. *Cell Signal*. 2017 Dec;40:210-221.
- (2) Gowert NS, Klier M, Reich M, Reusswig F, **Donner L**, Keitel V., Häussinger D, Elvers M. Defective Platelet Activation and Bleeding Complications upon Cholestasis in Mice. *Cell Physiol Biochem* 2017. April 21, 41:2133–2149
- (3) **Donner L**, Elvers M. Platelets in Thrombotic and Non-Thrombotic Disorders. *Pathophysiology, Pharmacology and Therapeutics: an Update*, 2017 ISBN: 978-3-319-47460-1. Chapter: Platelets and Neurodegenerative Diseases.
- (4) **Donner L**, Fälker K, Gremer L, Klinker S, Pagani G, Ljungberg LU, Lothmann K, Rizzi F, Schaller M, Gohlke H, Willbold D, Grenegard M, Elvers M. Platelets contribute to amyloid- β aggregation in cerebral vessels through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ -induced outside-in signaling and clusterin release. *Sci Signal*. 2016 May 24;9(429):ra52.
- (5) Jarre A, Gowert NS, **Donner L**, Münzer P, Klier M, Borst O, Schaller M, Lang F, Korth C, Elvers M. Pre-activated blood platelets and a pro-thrombotic phenotype in APP23 mice modeling Alzheimer's disease. *Cell Signal*. 2014 Sep;26(9):2040-50.
- (6) Gowert NS, **Donner L**, Chatterjee M, Eisele YS, Towhid ST, Münzer P, Walker B, Ogorek I, Borst O, Grandoch M, Schaller M, Fischer JW, Gawaz M, Weggen S, Lang F, Jucker M, Elvers M. Blood platelets in the progression of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2014 Feb 28;9(2):e90523.

Kongressbeiträge

- (1) Lili Donner, Lothar Gremer, Antje Willuweit, Knut Fälker, Magnus Grenegard, Dieter Willbold, Holger Gohlke, Margitta Elvers. Blood platelets bind A β peptides via Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and induce amyloid- β aggregation in cerebral vessels. Poster. **Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases. 2017**, Düsseldorf, Deutschland.
- (2) Lili Donner, Lothar Gremer, Antje Willuweit, Dieter Willbold, Holger Gohlke, Margitta Elvers. A β binding to blood platelets via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is responsible for the formation of vascular A β plaques. Poster. **The International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH). 2017**, Berlin, Deutschland
- (3) Lili Donner, Lothar Gremer, Antje Willuweit, Dieter Willbold, Holger Gohlke, Margitta Elvers. A β binding to blood platelets via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ is responsible for the formation of vascular A β plaques. Poster. **13th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. 2017**, Wien, Österreich
- (4) Lili Donner, Knut Fälker, Stefan Klinker, Lothar Gremer, Giulia Pagani, Barbara Bomke, Holger Gohlke, Dieter Willbold, Magnus Grenegard, Margitta Elvers. Blood platelets contribute to the formation of Amyloid deposits in cerebral vessels via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ induced outside-in signaling and clusterin release. Poster. **82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2016**. Mannheim, Deutschland
- (5) Lili Donner, Knut Fälker, Stefan Klinker, Lothar Gremer, Giulia Pagani, Holger Gohlke, Dieter Willbold, Magnus Grenegard, Margitta Elvers. Blood platelets contribute to the formation of Amyloid deposits in cerebral vessels via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ induced outside-in signaling and clusterin release. Vortrag. **UK Platelet Meeting 2015**. Leicester, UK
- (6) Lili Donner, Knut Fälker, Stefan Klinker, Giulia Pagani, Liza U. Ljungberg, Lothar Gremer, Holger Gohlke, Dieter Willbold, Magnus Grenegard, Margitta Elvers. Blood platelets contribute to the formation of amyloid- β deposits in cerebral vessels via integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ induced outside-in signaling and clusterin release. Vortrag. **BMFZ-Meeting 2015**. Düsseldorf, Deutschland

Danksagung

Mein erster Dank richtet sich an meine Betreuerin Frau Prof. Dr. Margitta Elvers. Zum einen möchte ich mich für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas dieser Dissertation und zum anderen für die Förderung meiner wissenschaftlichen Arbeit durch die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen bedanken.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Willbold für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Unterstützung des Projekts danken.

Bei Dr. Lothar Gremer möchte ich mich für die Unterstützung des Projekts und für wissenschaftliche Diskussionen bedanken.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich für den Rückhalt in guten wie in schlechten Zeiten bedanken. Danke für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und für diverse unterhaltsame Diskussionen.

Ich danke der guten Seele unseres Labors, der MTA Martina Spelleken, die stets ein offenes Ohr für uns alle und immer eine Lösung für alle Probleme hat.

Für das zügige Korrekturlesen und für die Versorgung mit Schokoriegeln möchte ich mich herzlich bei Dani (Briggi) bedanken.

Mein riesengroßer Dank gilt jedoch meiner Familie und meinen Freunden, die während dieser Zeit mich bedingungslos unterstützt, aufgemuntert und an mich geglaubt haben. Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, den