

Wetenschappelijk jaarverslag

Bijzonder hoogleraar Trombosestichting Nederland

Prof.dr. J.W.N. Akkerman is in 1997 aangesteld als bijzonder hoogleraar trombosebehandeling en trombosepreventie van de TSN. Zijn leerstoel is gevestigd bij de Faculteit Geneeskunde van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). Hij is werkzaam bij de afdeling Hematologie.

Zijn wetenschappelijk onderzoek is gericht op de mechanismen die activering en remming van bloedplaatjes reguleren. Een deel van het onderzoek vindt plaats aan megakaryocyten, de cellen in het beenmerg waaruit bloedplaatjes worden gevormd.

Wetenschappelijk onderzoek

Dit was gericht op de volgende projecten:

1. Insuline resistentie van Gi controle

Steun: Diabetes Fonds Nederland

Na een maaltijd stijgt het glucose gehalte van het bloed dat een activerende werking heeft op bloedplaatjes. Tegelijkertijd stijgt ook het insuline. In eerder onderzoek werd ontdekt dat insuline de activatie van plaatjes tegen gaat. Insuline bindt aan een receptor en zet dan een prikkelsysteem in werking waardoor plaatjes worden geremd. Een soortgelijke remming treedt op wanneer een patiënt met trombose het medicament clopidogrel krijgt toegediend. Insuline werkt dus ongeveer als clopidogrel. Ook werd ontdekt dat patiënten met diabetes mellitus type 2 plaatjes hebben die niet meer gevoelig zijn voor insuline. De noodzakelijke remming tijdens activatie door glucose is weggefallen. Dit verklaart waarom plaatjes van deze patiënten hypergevoelig zijn.

Trombose en arteriosclerose ontstaan niet alleen door hyperactieve bloedplaatjes. Arteriosclerose begint met een mini-ontsteking in de vaatwand. Deze is aan de binnenkant bekleed met endotheelcellen. Bij dit ontstekingsproces speelt ook de monocyt een rol. Geactiveerde endotheelcellen en monocyten produceren stoffen die de vaatwand veranderen en plaatjes aantrekken waardoor uiteindelijk arteriosclerose en trombose ontstaan. Een verstopping van een bloedvat is dan vaak het gevolg. In dit project wordt onderzocht of ook endotheelcellen en monocyten bij gezonde personen door insuline worden geremd en of die remming bij patiënten met suikerziekte verloren is gegaan, zoals eerder bij plaatjes is aangetoond. Als dit inderdaad het geval is betekent ongevoeligheid voor insuline niet alleen dat bloedplaatjes hyperactief worden, maar dat ook endotheelcellen en monocyten geactiveerd worden en veranderen in arteriosclerose vormende cellen. In dat geval moet de remming van plaatjes door insuline worden overgenomen door een andere plaatjesremmer, bijvoorbeeld clopidogrel. Tevens wordt onderzocht waardoor plaatjes bij patiënten met diabetes hun gevoeligheid voor insuline verliezen. Hiervoor worden stamcellen geïsoleerd uit bloed van een navelstreng.

Deze cellen worden in het laboratorium opgekweekt tot megakaryocyten. Dit zijn de moedercellen die in het beenmerg de bloedplaatjes maken. Tijdens het kweken zullen stoffen worden toegevoegd die vooral bij mensen met overgewicht in het bloed circuleren. Deze stoffen worden door vetcellen afgegeven aan het bloed. Misschien maken deze zogenaamde lipokinen de plaatjes ongevoelig voor insuline. In dat geval zullen in het laboratorium megakaryocyten ook hun gevoeligheid voor insuline gaan verliezen en kan precies worden onderzocht wat er mis gaat. Als deze veranderingen in kaart zijn gebracht, kan dit een basis vormen voor verder onderzoek om de hyperactiviteit van bloedplaatjes, endotheel en monocyten tegen te gaan en daarmee trombose en arteriosclerose bij patiënten met suikerziekte te voorkomen.

2. Cholesterol-rijke domeinen, centrale factoren in plaatjes adhesie en aggregatie. (met Dr. H. Heijnen)

Steun: Nederlandse Hartstichting

Een component in het plasma, dat de gevoeligheid bepaalt van bloedplaatjes voor hechting aan de beschadigde vaatwand en aggregatie aan elkaar, is cholesterol. Bij mensen met een hoog cholesterolgehalte worden bloedplaatjes overgevoelig voor activering en hechten daardoor sneller aan de beschadigde vaatwand en aan elkaar. Aangetoond is dat plaatjes cholesterol-rijke domeinen hebben waarin receptoren clusteren. De samenstelling van deze domeinen verandert wanneer plaatjes verkleven aan eiwitten uit de vaatwand. Adhesie aan Von Willebrand Factor (VWF) induceert een toename van de VWF receptor in deze domeinen terwijl adhesie aan collageen een toename van de collageen receptor (Glycoproteïne VI) induceert. Het adhesieve eiwit zorgt er dus voor dat in cholesterolrijke domeinen zijn "eigen" receptor in hogere concentratie aanwezig is, wat het activatie proces sterk bevordert. Het onderzoek is afgerond met een promotie.

3. Plaatjes preservatie door tijdelijke metabole suppressie. (met dr.W.M. Smid, Sanquin bloedbank Noord-West).

Steun: Stichting Sanquin

De huidige methoden om bloedplaatjes te bereiden voor transfusie in een patiënt met een plaatjestekort of een plaatjesfunctiestoornis zijn verre van ideaal. Een probleem is dat bij bereiding van een plaatjesconcentraat een deel van de plaatjes wordt geactiveerd. Wanneer zo'n concentraat ook nog enige dagen wordt bewaard, neemt deze activering verder toe waardoor na transfusie ongewenste effecten kunnen optreden. Het project heeft tot doel bij het bereiden van het plaatjesconcentraat en het bewaren daarna, deze activering tegen te gaan. Hiertoe worden plaatjes langs metabole weg in een stadium van verminderde energie aanmaak en verminderd energieverbruik gebracht, waardoor zij minder snel worden geactiveerd. Energiedepletie lijkt de plaatjes te beschermen tegen activatie tijdens het bewaren en bovendien afbraak door macrofagen tegen te gaan. Daarnaast is onderzocht waarom gekoeld bewaarde plaatjes na transfusie versneld worden afgebroken door macrofagen. De oorzaak wordt gezocht in clusters van de receptor voor von Willebrand Factor (Glycoproteïne Ib) die door speci-

ale receptoren op macrofagen worden herkend. Er is een methode ontwikkeld om deze clusters te meten, waarna de moleculaire mechanismen die de clustering veroorzaken konden worden opgehelderd. Het onderzoek is afgerond met een promotie.

4. Preventie van plaatjesdestructie door macrofagen.

Steun: Landsteiner Stichting voor Bloedtransfusie Research
In ons eerder onderzoek is een nieuwe methode ontwikkeld om de binding van plaatjes aan macrofagen en de opname en destructie die daarop volgen in het laboratorium te meten. Meting van binding is gebaseerd op binding van fluorescent gemerkte antilichamen tegen een eiwit op plaatjes (Glycoproteïne Ib) en op macrofagen (CD14) en detectie van dubbel gemerkte celcomplexen op de FACS. Meting van fagocytose is gebaseerd op het verschijnen van mepacrine in de macrofagen waarmee plaatjes vooraf waren geïncubeerd. Uit dit onderzoek blijkt dat binding wordt gemedieerd door expressie van P-selectine op het plaatjes oppervlak en PSGL-1 (P-selectin Glycoprotein Ligand I) op de macrofaag. Fagocytose wordt gemedieerd door twee processen. Ten eerste, de expressie van fosfatidylserine (PS) op het plaatje en binding aan een onbekende receptor op de macrofaag. Ten tweede, clusters van glycoproteïne Ib op het plaatje en binding aan de receptor $\alpha 2\beta 1$ op de macrofaag. In dit project worden de moleculaire mechanismen onderzocht die tot de oppervlakte expressie van deze plaatjeseiwitten leiden. In proefdieren wordt onderzocht waarom deze veranderingen tot plaatjesafbraak leiden en wat hiertegen kan worden gedaan ten einde getransfuseerde plaatjes langer te laten circuleren.

5. Rol van de remmende collageen receptor LAIR-1 in megakaryocyten ontwikkeling en vorming van plaatjes (met Dr. L. Meyaard en Dr.P.J. Lenting)

Steun: UMC Utrecht

LAIR-1 is een receptor voor collageen met twee ITIM motieven. Dit zijn delen van een receptor waarvan remmende signalen uitgaan. De mogelijkheid bestaat dat in tegenstelling tot de activerende collageen receptoren $\alpha 2\beta 1$ en Glycoproteïne VI die beide activerend werken, stimulering van LAIR tot negatieve signalering leidt met nog onbekende gevolgen voor de ontwikkeling van de megakaryocyt en het plaatje.

Promoties

Prof.Dr. J.W.N Akkerman was promotor bij de volgende proefschriften:

- Cholesterol-rich domains, key factors in platelet adhesion and aggregation
M. van Lier, 28-02-06
- Prolonged platelet preservation by transient metabolic suppression
B.A. Badlou, 13-03-06
- The acute effects of red wine on platelet-vessel wall interactions.
D.W. De lange, 30-05-06
- Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ regulation in platelets
P.E.H.M. Litjens, 20-10-06

Daarnaast maakte hij deel uit van de beoordelingscommissie van het proefschrift:

- Mariska Rondaij
Regulation of Weibel-Palade body exocytosis in human endothelial cells.
Universiteit Utrecht, 16-10-2006
- Marijke J.E. Kuipers
Platelet receptors and procoagulant activity in thrombus formation.
Universiteit Maastricht, 13-04-06
- Jun Zhao
Subcellular localization of Epac.
Universiteit Utrecht, 12-09-2006
- Jan M.M. Heyligers
Novel strategies to improve the patency of vascular prostheses.
Universiteit Utrecht, 29-09-06
- Arieene M.W. van Marion
Different aspects of Thalidomide treatment and stem cells transplantation in Multiple Myeloma patients.
Universiteit Utrecht, 05-10-06

Werkzaamheden voor de Trombosestichting Nederland en overige werkzaamheden.

Evenals vorige jaren is prof. dr. J.W.N. Akkerman betrokken geweest bij de werkzaamheden van de TSN. Hij was lid van de Wetenschappelijk Adviesraad en wetenschappelijk eindredacteur van het tijdschrift "Trombus", een uitgave van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten, waaraan de TSN is gelieerd. Tevens was hij lid van de Advisory Board van het Journal of Thrombosis and Haemostasis, lid van the International advisory board of the Institut national de la santé et de la recherche medicale INSERM, lid van the International Advisory Board XXIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Geneve 2007 en lid van de Editorial Board van Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry.

Daarnaast werden manuscripten beoordeeld voor de tijdschriften:

American Journal of Clinical Nutrition, Atherosclerosis, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Blood, British Journal of Clinical Pathology, Circulation Research, European Journal of Biochemistry, European Journal of Pharmacology, FEBS Letters, Journal of Biological Chemistry, Journal of Thrombosis and Haemostasis, Platelets.

Hij was als extern adviseur betrokken bij het beoordelen van subsidieaanvragen voor
British Heart Foundation, Diabetes Fonds, Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung FWF, Österreich, Health Research Board Ireland, International advisor French National Research Agency (ANR-Inserm), Instituut voor de aanmoediging van innovatie door wetenschap en technologie in Vlaanderen (ITW), Medical Research Council UK, Nederlandse Hartstichting, NWO-medische wetenschappen, Österreichische Nationalbank Anniversary

Fund, Scientific consultant National Blood Authority UK, Wellcome Trust, ZonMw.

Voordrachten op uitnodiging

- Insulin signalling in Diabetes mellitus platelets. Lodz platelet conference. Lodz, Poland, 25/28-06-2006
- The interaction of lipoproteins with platelets. Graduate program "Vascular biology in medicine", Institute for prevention of cardiovascular disease. Munich, Germany, 27-09-06
- Welke plaatjes stimulators en waarom? Symposium Plaatjesaggregatie Anno 2006. 03-11-06, Leiden

Publicaties

1. Korporaal, S.J.A. and J.W.N. Akkerman. Platelet signaling induced by lipoproteins. *Cardiovascular and Hematological agents in Medicinal Chemistry* 2006; 4: 93-109
2. Andrade Ferreira, I., A.I. Mocking, M.A.H. Feijge, G. Gorter, T.W. van Haeften, J.W. M. Heemskerk and J.W.N. Akkerman. Platelet inhibition by Insulin is absent in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2006; 26: 417-422
3. Akkerman J.W.N., Fijnheer R, Velde J. Abstracts presented at the XXth European Platelet Meeting, 13-15 October, 2005, Ede, The Netherlands. *Platelets* 2006;17:108-125
4. Akkerman, J.W.N., Guest editor. The interaction between lipoproteins and platelets. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2006; 35: 269-354
5. Korporaal S.J.A. and J.W.N. Akkerman. Platelet activation by Low Density Lipoprotein and High Density Lipoprotein. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2006; 35: 270-280
6. Korporaal S.J.A. and J.W.N. Akkerman. Lipoprotein-associated proteins involved in platelet signaling. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 2006; 35: 305-313
7. Akkerman J.W.N. Thrombopoietin and platelet function. In "Platelet-mediated microvascular disturbances, major thrombosis and bleeding complications in essential thrombocythemia and polycythemia vera". *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2006; 32:295-304
8. Cauwenberghs S., M.A.H. Feijge, G. Hageman, M. Hoylaerts, J.W.N. Akkerman, J. Curvers and J.W.M. Heemskerk. Plasma ecto-nucleotidases prevent desensitization of purinergic receptors in stored platelets: importance for platelet activity during thrombus formation. *Transfusion* 2006; 46: 1018-1028
9. Badlou, B.A., Y.P. Wu, W.M. Smid and J.W.N. Akkerman. Platelet binding and phagocytosis by macrophages. *Transfusion* 2006; 46: 1432-1443
10. Badlou, B.A., G. Spierenburg, H. Ulrichs, H. Deckmyn, W.M. Smid and J.W.N. Akkerman. Role of glycoprotein Ib in phagocytosis of platelets by macrophages. *Transfusion* 2006; 46: 2090-2099

11. Lee, F.A., M. van Lier, I.A.M. Relou, L. Foley, J.W.N. Akkerman, H.F.G. Heijnen and R.W. Farndale. Lipid rafts facilitate the interaction of PECAM-1 with glycoprotein VI-Fc receptor - chain complex in human platelets. *Journal of Biological Chemistry* 2006; 281: 39330-39338
12. Hoffmann, J.J.M.L., J.W.N. Akkerman, H.K. Nieuwenhuis en M.A.M. Overbeeke. *Hematologie*. Syntax Media, Arnhem, 2006
13. Akkerman, J.W.N., De betekenis van de Platelet Function Analyzer-100 in de dagelijkse diagnostiek. *Nederlands Tijdschrift voor Hematologie* 2006; 3: 133-137
14. Akkerman, J.W.N., Stress en myocard infarct. *Tromnibus* 2006; 34: 2-4
15. Akkerman, J.W.N., Verslag van de nascholingsdag van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten, zaterdag 1 april 2006, congrescentrum Orpheus te Apeldoorn. *Tromnibus* 2006; 34: 21-24
16. Akkerman, J.W.N., Insuline resistentie in plaatjes. *Tromnibus* 2006; 34: 29-31
17. Akkerman, J.W.N., Interactie tussen tumoren en bloedstolling. *Tromnibus* 2006; 34: 46-48

Projecten, gefinancierd door de Trombosesichting Nederland

Afgeronde projecten

Projectnummer: 2005.3

Titel : De rol van Vasopressine 2 Receptor en Aquaporine 2 in de regulatie van Von Willebrand factor en factor VIII spiegels en de gevolgen voor het risico op trombose.

Projectleider: Dr. H.C.J. Eikenboom

Instelling: Leids Universitair Medisch Centrum Afdeling Hematologie, subafdeling Trombose en Hemostase

Vraagstelling onderzoek:

Vasopressine, een belangrijk hormoon in ons lichaam, zorgt ervoor dat de nieren de juiste hoeveelheid vocht vasthouden, zodat we niet uitdrogen. Vasopressine doet dit door heel precies te regelen hoeveel waterkanaaltjes (Aquaporine 2, AQP2) er op ieder moment aanwezig zijn in de nieren. Via deze waterkanaaltjes wordt water uit de urine weer naar het bloed "teruggepompt". Hierdoor is het lichaam in staat om water vast te houden als we een tijd lang niet drinken, zoals 's nachts. Hoeveel vasopressine ons lichaam maakt hangt af van de hoeveelheid vocht die we innemen, de hoeveelheid zouten in ons bloed, maar ook van onze bloeddruk.

Behalve het regelen van onze wateruitscheiding zorgt vasopressine er ook voor dat ons lichaam een aantal stollingsfactoren, zoals factor VIII (FVIII) en de von Willebrand factor (VWF) afgeeft aan het bloed. Deze stollingsfactoren zorgen ervoor dat ons bloed makkelijk kan stollen op het moment dat we ons verwonden. Echter, als we te veel van deze factoren in ons bloed hebben, kan dat er toe leiden dat het bloed te veel gaat stollen ook als het niet nodig is. Dat kan weer leiden tot het verstopt raken van een bloedvat, ofwel trombose.

Sommige mensen hebben te veel FVIII en VWF in hun bloed en lopen daardoor meer risico om trombose te krijgen. We weten dat dit probleem voor kan komen bij meerdere leden van een familie en dat de oorzaken voor het probleem dus deels erfelijk bepaald kunnen zijn. Tot nu toe is nog niet zoveel bekend over de oorzaken van die verhoogde hoeveelheden FVIII en VWF in het bloed.

Zoals boven beschreven speelt vasopressine zowel een rol bij onze waterhuishouding en bloeddrukregulatie als bij de afgifte van FVIII en VWF in ons lichaam. Verstoring van de werking van vasopressine zou dus kunnen leiden tot verhoogde hoeveelheden FVIII en VWF in het bloed en van belang kunnen zijn voor het risico op trombose. We hadden daarom de volgende onderzoeksvragen:

1. Vasopressine bindt voor zijn effect aan de vasopressine 2 receptor (V2R). Wat is het effect van erfelijke variaties in de V2R op de functie van de receptor?
2. Er zijn patiënten bij wie de V2R of het waterkanaal AQP2 niet meer werken en daardoor kunnen zij water niet vasthouden en plassen ze gemiddeld tussen de 10 en 20 liter per dag. Deze ziekte noemen we nefrogene diabetes insipidus (NDI). Wat is het effect van deze afwijking op de hoogte van VWF en FVIII in het bloed?
3. Komen er ook erfelijke variaties voor in het waterkanaal AQP2 die zorgen voor hogere bloedspiegels van VWF en FVIII en wat voor invloed hebben deze variaties op het tromboserisico?
4. Welke invloed hebben hoge bloeddruk en het gebruik van bloeddrukverlagende middelen op VWF en FVIII?

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

We hebben niercellen met daarin een vasopressine 2 receptor (V2R) met een erfelijke verandering gekweekt. We hebben in dit experiment kunnen aantonen dat de erfelijke verandering in de V2R, die bij mensen aanleiding geeft tot hogere hoeveelheden FVIII en VWF in het bloed, beter vasopressine kan binden en dus beter op vasopressine reageert dan de gewone receptor. Verder hebben we een groot deel van alle Nederlandse families met de ziekte NDI onderzocht. De patiënten en hun familieleden hebben vragenlijsten beantwoord en hun bloed werd onder andere onderzocht op de hoeveelheid FVIII, VWF en vasopressine. Het lijkt erop dat dragers van NDI, vooral als het waterkanaal AQP2 niet werkt, meer VWF en FVIII hebben dan gezonde mensen. Het waterkanaal AQP2 hebben we verder onderzocht in een grote groep van 474 patiënten met trombose en 474 gezonde mensen. Een aantal variaties in de erfelijke code voor het waterkanaal AQP2 komen voornamelijk voor bij mensen die ook veel VWF en FVIII hebben en enkele van die variaties zorgen ervoor dat je 2 keer zoveel kans hebt om trombose te krijgen dan mensen zonder die variaties. Tenslotte hebben we het effect van hoge bloeddruk en het gebruik van bloeddrukverlagende medicijnen op het gehalte FVIII in het bloed onderzocht in twee grote studies. In de groep mensen jonger dan 65 jaar hebben degenen met een hoge bloeddruk ook veel FVIII. In de groep ouderen bleek dit niet zo te zijn, mogelijk doordat door de vaak slechtere conditie van de vaten de bloeddruk omlaag en FVIII juist omhoog gaat. Echter, bij iedereen die bloeddrukverlagende middelen slikt was FVIII hoger dan bij mensen die geen medicijnen slikken.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Het onderzoek heeft meer inzicht opgeleverd over de oorzaken van hoge bloedspiegels van VWF en FVIII. Bovendien heeft het onderzoek aangetoond dat de regulatie van deze stollingsfactoren deels afhangt van de waterhuishouding en de bloeddrukregulatie en dat het gebruik van bloeddrukverlagende middelen samenhangt met bloedspiegels van VWF en FVIII. Omdat VWF en FVIII een belangrijke rol kunnen spelen bij het ontstaan van trombose, heeft het onderzoek bijgedragen aan

de kennis over de oorzaken van deze ziekte. Wellicht kunnen de uitkomsten van dit onderzoek in de toekomst helpen een betere individuele risicoschatting te maken en bijdragen aan het voorkomen van een deel van de trombose gevallen.

Literatuurpublicaties

De volgende abstracts zijn ingediend voor het congres van de International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) in Geneve in juli 2007 over respectievelijk vraagstellingen 1, 3 en 4:

- Nossent AY, Robben JH, Deen PMT, Rosendaal FR, Bertina RM, Eikenboom HCJ. Functionality of the vasopressin 2 receptor variation G12E as modifier of von Willebrand factor and factor VIII levels.
- Nossent AY, Eikenboom HCJ, Vos HL, Bertina RM, Rosendaal FR. Aquaporin 2 gene variations, levels of von Willebrand factor and factor VIII and the risk of venous thrombosis.
- Nossent A, Smith NL, Eikenboom HCJ, Bertina RM, Rosendaal FR, Psaty BM. Association of blood pressure and factor VIII in Leiden thrombophilia study (LETS) and cardiovascular health study (CHS).

Volledige manuscripten betreffende de drie bovengenoemde abstracts en over het onderzoek van vraagstelling 2 zijn in voorbereiding en zullen naar verwachting alle vier in de eerste helft van 2007 worden ingediend.

Lopende projecten

Projectnummer: 2004.1

Titel : Modulatie van de lysosofatidaat homeostase in het atheroom: een nieuwe strategie ter preventie van trombotische complicaties na plaqueruptuur

Projectleider: Prof. Dr. E.A.L. Biessen en Prof. Dr. Th.J.C. Van Berkel

Instelling: Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, afdeling Biofarmacie/Therapeutische Gen Modulatie, Universiteit Leiden, Leiden

Vraagstelling onderzoek

Scheuring van een vaatwandvernauwing (plaque) kan ertoe leiden dat materiaal vanuit deze plaques in direct contact komt met de bloedsomloop wat de bloedstolling kan activeren met als mogelijk gevolg bloedvatafsluiting en hartinfarct. Met name vetten zoals het lysosofatidaat (LPA) in deze plaques zijn verantwoordelijk voor het in gang zetten van de bloedstolling. Vooronderzoek heeft aangetoond dat verschillende sleutelfactoren in de aanmaak, afbraak en signaaloverdracht van LPA gedurende de plaqueontwikkeling toe- of afnemen en dat dit gepaard gaat met een netto ophoping en effect van LPA in de plaque.

Door correctie van het verstoorde evenwicht in de LPA huishouding door gen/drug therapie kan de accumulatie van dit vet in de plaque verminderd worden, wat het bloedstolling bevorderende karakter van de plaque en daarmee de kans op complicaties als gevolg van bloedstolling zal verminderen. In dit project zal het therapeutische perspectief van deze benadering onderzocht worden.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

In 2006 hebben we het effect van LPA onderzocht op de atherosclerose en plaatjesfunctie in een muizenstam met een verhoogd cholesterol gehalte. LPA werd daarbij langs twee wegen toegediend: via injectie in de buikholte en ter plekke van de atherosclerotische plaque. De eerste strategie leidde weliswaar tot verhoogde LPA bloedspiegels maar sorteerde geen effect zowel op de ontwikkeling als op de stabiliteit van de plaque. Analyse van bloedplaatjes in LPA behandelde muizen liet ook geen effect zien. Daarentegen bleek lokale toediening van LPA ter plekke van de plaque te leiden tot een verslechtering van de plaquestabiliteit en zelfs tot bloedingen in de plaque. Dit is mogelijk terug te voeren op een verhoogde activering van mestcellen in het vaatweefsel, waarvan we eerder al hebben aangetoond dat dit vergelijkbare verschijnselen teweegbracht. Dit zou erop kunnen wijzen dat lokale medicamenteuze remming van LPA een geschikte aanpak zou kunnen zijn om de stabiliteit van de plaque te herstellen.

Daarnaast is een studie uitgevoerd naar de effecten van een op LPA gelijkend vetmolecuul, sphingosine 1-phosphate (S1P), dat net als LPA door geactiveerde bloedplaatjes wordt uitgescheiden en zich bindt aan specifieke eiwitten (de zogenaamde Edg receptoren). Toediening van een synthetische analoog van S1P, FTY-720, bleek de plaqueontwikkeling aanzienlijk af te remmen en dit was te wijten aan een selectieve onderdrukking van het immuunsysteem. De S1P analoog bleek tot onze verrassing geen noemenswaardige effecten uit te oefenen op de bloedstolling.

Ten slotte zijn er voor verschillende sleutelfactoren in de aanmaak en/of afbraak van LPA virale vectoren ontwikkeld die de expressie van de betreffende factor kunnen stimuleren of onderdrukken. Deze vectoren zijn voor een groot deel reeds getest op functionaliteit en zullen in 2007 worden toegepast in beschikbare muizenmodellen teneinde de rol van het betreffende enzym in de opstapeling van LPA in de plaque en daarmee in trombotische complicaties van atherosclerose te bepalen. Deze studies zullen naar verwachting niet alleen veel inzicht opleveren in de regulatie van LPA in de plaque, maar mogelijk ook nieuwe kandidaten voor therapeutische behandeling.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Onze studie naar de effecten van LPA, na systemische toediening van LPA, toont aan dat niet alle bronnen van LPA leiden tot een verhoogde bloedstolling en veranderingen in plaquesamenstelling (die zouden kunnen wijzen op een verhoogde trombogeniciteit). Juist lokale blootstelling van hoog-risico weefsels zoals de atherosclerotische plaque aan LPA blijkt de gevoeligheid voor plaatjesaggregatie en bloedingen negatief te beïnvloeden. Daarnaast toont onze studie aan dat S1P therapie anders dan verwacht hoegenaamd niet tot veranderingen leidt in plaatjesfunctie, maar wel in het immuunsysteem.

Literatuurpublicaties

Full papers

- Bot M*, Nofer JR*, Brodde M, Taylor PJ, Salm P, Brinkmann V, Van Berkel T, Assmann G, Biessen EAL. FTY720, a synthetic sphingosine 1-phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*. 2007; 115(4): 501-508. (*equally contributing authors)
- Bot M, Nofer JR, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophospholipids: edging up towards atherosclerosis. *Future Lipidol*. (submitted)
- Bot I, Bot M, Saulnier-Blache JS, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. Manuscript in preparation

Published abstract

- Bot M, Bot I, Saulnier-Blache JS, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. *Circulation*. 2005; 112(17):II-290. (AHA 2005, poster presentation)
- Bot M, Bot I, Saulnier-Blache JS, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. *Atherosclerosis supplements*. 2006; 7(3):230. (IAS 2006, poster presentation)
- Bot M, Bot I, De Jager SC, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophosphatidic Acid: a Two-Faced Key Actor in Atherogenesis. *Circulation*. 2006; 114(18):II-341. (AHA 2006 oral presentation)

Projectnummer: 2004.2

Titel: Factor VIII's escape from LRP-dependent clearance: Reappraisal of the role of VWF
Projectleider: A.B. Meijer
Instelling: Sanquin Research, Amsterdam

Vraagstelling onderzoek

Factor VIII (FVIII) is een belangrijk eiwit voor het goed functioneren van het bloedstollingssysteem. Een verhoogde bloedspiegel van dit stollingseiwit is echter geassocieerd met een verhoogde kans op trombose. Informatie over de mechanismen die het niveau van FVIII in het bloed reguleren is daarom onmisbaar. Een eiwit dat de bloedspiegel van FVIII sterk kan beïnvloeden is von Willebrand factor (VWF). VWF vormt in het bloed een hecht complex met FVIII en vertraagt op deze wijze de zeer snelle verwijdering van FVIII uit het bloed.

In het verleden hebben wij vastgesteld dat de "klaringsreceptor", LRP genaamd, direct betrokken is bij het verwijderingsproces. Het werkmodel is dat FVIII eerst aan het oppervlak van de cel bindt. Bij een voldoende hoge FVIII concentratie op het celoppervlak, wordt dit eiwit overgedragen aan LRP dat zich ook op het celoppervlak bevindt. FVIII wordt vervolgens opgenomen en afgebroken door de cel met behulp van LRP.

Uit eerder onderzoek bleek dat VWF de binding van FVIII aan LRP kan blokkeren. Ondanks de aanwezigheid van VWF in het bloed wordt FVIII niettemin verwijderd via de klaringsreceptor. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat het VWF-FVIII complex eerst dissocieert waarna FVIII kan binden aan LRP. Of dit plaatsvindt, en zo ja, op welke wijze zijn openstaande vragen binnen het onderzoek. De doelstelling van ons onderzoek is daarom het ophelderen van de rol van VWF in het klaringsmechanisme van FVIII.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Om de rol van VWF in het verwijderingsmechanisme van FVIII te onderzoeken, dient het proces van opname van FVIII door cellen te worden gevolgd. Wij maken hiervoor gebruik van varianten van FVIII en VWF die een unieke fluorescente zender bevatten. De verschillende kleuren die door de zenders worden uitgestraald, stellen ons in staat om met behulp van fluorescentiemicroscopie de individuele eiwitten te volgen op het oppervlak van (of in) levende cellen waarop LRP aanwezig is.

Uit resultaten van een recent onderzoek binnen ons laboratorium kon worden geconcludeerd dat een tweede receptor (die verwant is aan LRP) mogelijk met LRP samenwerkt bij het verwijderen van FVIII uit het bloed. Of deze receptor, genaamd LDL receptor, ook alleen FVIII kan opnemen en of VWF dit proces kon remmen was nog onduidelijk. Om deze reden hebben wij tevens het opnameproces van FVIII onderzocht door cellen met daarop de LDL receptor.

Tijdens het onderzoek bleek al snel dat de aanwezigheid van de fluorescentiezender in FVIII nauwelijks de functie van het eiwit aantast. De opname van FVIII door muizencellen met daarop LRP en hamstercellen met daarop LDL receptor, bleek efficiënt te verlopen. Dit resultaat leverde voor het eerst het directe bewijs dat ook de LDL receptor actief FVIII kan opnemen. In de slipstream van dit onderzoek hebben wij het gedeelte van FVIII geïdentificeerd waarmee FVIII niet alleen aan de receptoren bindt maar ook aan de cel. Dit konden wij vaststellen met een antistof fragment dat zowel de binding aan de receptoren blokkeert als de binding van FVIII aan het celoppervlak. VWF bleek eveneens de opname van FVIII door de eerder genoemde cellen tegen te gaan. Of VWF alleen de binding aan de receptoren blokkeert of ook de binding aan het celoppervlak is op dit moment nog onduidelijk. In het laatste geval dient het FVIII-VWF complex in het bloed te dissociëren voordat FVIII kan binden aan het oppervlak van de cel. Deze laatste punten worden op dit moment nader onderzocht.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Het niveau van FVIII in het bloed dient sterk te worden gereguleerd. Het ontbreken van het eiwit kan bijvoorbeeld leiden tot een ernstige bloedingsneiging. Daar tegenover staat dat een verhoogde FVIII bloedspiegel is geassocieerd met een verhoogde kans op trombose. Het begrijpen van de mechanismen, die het niveau van FVIII in het bloed reguleren, kan daarom van belang zijn bij het bestrijden van trombotische

aandoeningen die hun oorzaak vinden in een verhoogde FVIII bloedspiegel.

Literatuurpublicaties

Deze studie heeft nog niet geleid tot een publicatie.

Projectnummer: 2004.3

Titel: Functionele analyse van humane monoclonale antistoffen gericht tegen ADAMTS13 bij patiënten met trombotische trombocytopenische purpura.

Projectleider: Dr. J. Voorberg

Instelling: Stichting Sanquin Research, Amsterdam

Vraagstelling onderzoek

Trombotische trombocytopenische purpura (TTP) is een levensbedreigende aandoening die veroorzaakt wordt door overmatige klontering van bloedplaatjes in de haarvaten. Bij de meeste patiënten met TTP worden antistoffen gericht tegen circulerend ADAMTS13 aangetroffen. ADAMTS13 is een eiwit dat betrokken is bij het knippen van Von Willebrand factor (VWF) polymeren. Deze polymeren worden door endotheelcellen, die de bekleding van de vaatwand vormen, uitgescheiden en direct daarna in kleinere stukjes geknipt door ADAMTS13. Door de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen ADAMTS13 circuleren er bij patiënten met TTP zeer lange VWF polymeren die bijdragen aan de vorming van bloedplaatjesrijke stolsels in de haarvaten. Doel van dit onderzoek is om te bestuderen op welke wijze de antistoffen gericht tegen ADAMTS13 interfereren met het knippen van VWF polymeren.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Om te kunnen onderzoeken op welke wijze antistoffen gericht tegen ADAMTS13 interfereren met het knippen van VWF polymeren hebben we allereerst een serie humane monoclonale antistoffen gericht tegen ADAMTS13 geïsoleerd. De eigenschappen van 2 van de 5 humane monoclonale antistoffen die representatief zijn voor antistoffen zoals die voorkomen bij patiënten met TTP zijn uitgebreid bestudeerd. Beide monoclonale antistoffen remmen het knippen van VWF polymeren door ADAMTS13. Biochemische analyses hebben aangetoond dat beide antistoffen de binding van ADAMTS13 aan VWF remmen. Hierdoor kan ADAMTS13 de VWF polymeren niet meer volledig knippen waardoor kleine plaatjesrijke stolsels ontstaan bij patiënten met TTP. Eén van de geproduceerde humane monoclonale antistoffen is gebruikt voor het opzetten van een assay voor de detectie van circulerend ADAMTS13.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Het in het kader van dit project uitgevoerde onderzoek heeft aangetoond dat tegen ADAMTS13 gerichte antistoffen de binding van ADAMTS13 aan VWF verhinderen. Dit mechanisme ligt hoogstwaarschijnlijk ten grondslag aan het ontstaan van bloedplaatjesrijke stolsels in de haarvaten van

patiënten met TTP. Met de uit dit project voortgekomen antistoffen is een assay voor circulerend ADAMTS13 opgezet. Deze assay kan ingezet worden voor het bepalen van circulerend ADAMTS13 bij patiënten met TTP en bij patiënten met andere vasculaire afwijkingen. Door het isoleren van humane monoclonale antistoffen zijn we er achter gekomen dat de tegen ADAMTS13 gerichte antistoffen bij verschillende patiënten erg veel op elkaar lijken. Dit was bij aanvang van dit project nog niet bekend. We willen dit in de toekomst verder uitzoeken en we hopen dat dit onderzoek nieuwe aanknopingspunten voor de diagnostiek en wellicht ook voor de behandeling van patiënten met TTP zal opleveren.

Literatuurpublicaties

1. Luken BM, Turenhout EA, Kaijen PH, Greuter MJ, Pos W, van Mourik JA, Fijnheer R and Voorberg J. (2006) Amino acid regions 572-579 and 657-666 of the spacer domain of ADAMTS13 provide a common antigenic core required for binding of antibodies in patients with acquired TTP. *Thromb Haemost* 96, 295-301.
2. Luken BM, Kaijen PH, Turenhout EA, Kremer Hovinga JA, van Mourik JA, Fijnheer R, Voorberg J. (2006) Multiple B-cell clones producing antibodies directed to the spacer and disintegrin/thrombospondin type-1 repeat 1 (TSP1) of ADAMTS13 in a patient with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost* 4, 2355-2364.
3. Tjernberg P, Vos HL, Spaargaren-van Riel CC, Luken BM, Voorberg J, Bertina RM, Eikenboom JC (2006) Differential effects of the loss of intrachain- versus interchain-disulfide bonds in the cystine-knot domain of von Willebrand factor on the clinical phenotype of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 96, 717-724.
4. Riksen NP, Luken BM, Klasen IS, Voorberg J, Crama N, van Deuren M. Antibodies against the CUB1-2 domains of ADAMTS13 in a patient with benign monoclonal gammopathy. Ter publicatie aangeboden.
5. Luken BM, Pos W, Turenhout EA, Kremer-Hovinga JA, Dong J-f, Fijnheer R en Voorberg J. Human VH1-69 germ line encoded anti-spacer domain antibodies that develop in patients with acquired TTP, interfere with the binding of ADAMTS13 to VWF. Manuscript in voorbereiding.

Projectnummer: 2004.4

Titel: Selectie van functionele DNA-varianties met behulp van mini-gen constructen.

Projectleiders: Dr. Hans L. Vos/Dr. Marieke C.H. de Visser
Instituut: Leids Universitair Medisch Centrum, Eindhoven Laboratorium voor Experimentele Vasculaire Geneeskunde, Trombose en Hemostase.

Vraagstelling onderzoek

Trombose in de aderen van bijvoorbeeld het been wordt gedeeltelijk door erfelijke DNA varianties veroorzaakt. Factor V Leiden en de 20210G->A verandering in het gen voor protrombine zijn bekende voorbeelden van DNA varianties die

bijdragen aan het trombose-risico. Het is echter duidelijk dat er nog een aantal onbekende erfelijke risicofactoren zijn. Wij proberen die op te sporen binnen de GIFT-studie (Genetica In Familiare Trombose). Dit is een studie naar risicofactoren van broers en zusters die op relatief jonge leeftijd (voor het 45ste levensjaar) trombose hebben gehad. De identificatie van trombose-bevorderende variaties in ons DNA vindt plaats via de karakterisatie van genvarianten die met een trombose-risico samengaan. Een dergelijke genvariant kan echter nog een aantal verschillende DNA-veranderingen bevatten. Het is doorgaans niet eenvoudig te voorspellen welke van deze variaties werkelijk verantwoordelijk is voor het waargenomen effect. Identificatie van de oorzakelijke variant is echter noodzakelijk voor een goed begrip van het ontstaan van trombose. Doel van het huidige project was om de mogelijkheden van de identificatie van trombose-bevorderende DNA-veranderingen met behulp van functie-gerichte testen van mini-genen te onderzoeken. Mini-genen zijn functionele genfragmenten die rond een te onderzoeken DNA-verandering gelegen zijn. Dankzij enige technische kunstgrepen kunnen deze fragmenten op vergelijkbare wijze in weefselkweekcellen actief zijn als een normaal gen, dat vaak te groot is om op deze wijze onderzocht te worden. Door de effecten van de DNA-variant te vergelijken met die van de normale bouwsteen op die positie kan onderzocht worden of de DNA-variant de gen-functie beïnvloedt. In een goed model-systeem zal alleen de functionele variant een (hopelijk duidelijke) verandering veroorzaken. Binnen het huidige onderzoek hebben we het nut van mini-genen vergeleken met dat van een ander type DNA-constructen, de zogenaamde reporter-constructen, waarbij het genfragment de productie van een ander, eenvoudig detecteerbaar eiwit (de reporter) reguleert. Als model-veranderingen hebben we voor de minigenen de functionele 19911A/G variatie in het laatste intron van het protrombine-gen en een vermoedelijke mutatie in intron 4 van het Proteïne C gen gekozen.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

De nu beschikbare resultaten van de mini-gen constructen en van de reporter-constructen bleken in hoge mate vergelijkbaar, wat aangeeft dat beide systemen goed gebruikt kunnen worden om de gevolgen van DNA-varianten te onderzoeken. In beide gevallen kunnen we zowel effecten van de 20210G->A als de 19911A->G verandering aantonen, die beide bijdragen aan het trombose-risico. Beide veranderingen leiden tot (iets) hogere protrombine-niveaus in het bloed door een verbeterde verwerking in de cel van het onrijpe boodschapper-RNA, dat een essentiële tussenstap vormt tussen het protrombine-gen en het uiteindelijke eiwit. Het is echter niet zo dat de beide veranderingen elkaars effect versterken.

Sommige DNA-veranderingen hebben effecten die niet met reporter-constructen en wel met mini-genen zijn te onderzoeken. De mutatie in het Proteïne C gen is daar een voorbeeld van. De gevolgen van deze verandering strekken zich waarschijnlijk over een zo'n groot deel van het gen uit dat het om technische redenen niet meer mogelijk is om repor-

ter-constructen te gebruiken. We hebben hiervoor dus een mini-gen gemaakt dat we momenteel aan het onderzoeken zijn.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

De keuze van het juiste modelsysteem is van het grootste belang bij het onderzoek naar de gevolgen van mogelijk trombose-bevorderende DNA-veranderingen. Het ideale modelsysteem combineert eenvoud van toepassing met een zo goed mogelijke benadering van de situatie in ons lichaam. Dit zijn echter moeilijk verenigbare voorwaarden. Het is dus noodzakelijk een compromis te zoeken dat een relevant en overtuigend resultaat produceert en dat toch relatief eenvoudig toegepast kan worden. Door de ervaringen die we binnen het huidige en eerdere project(en) hebben opgedaan, zijn we inmiddels steeds beter in staat om de juiste keuzes te maken ten aanzien van het meest toepasselijke modelsysteem. We hopen dan ook dat we in de toekomst relatief snel kunnen inzoomen op de functionele DNA-verandering in een kandidaatgebied. Identificatie van de werkelijk verantwoordelijke variant is namelijk essentieel voor een goed begrip van de mechanismen die tot trombose leiden.

Literatuurpublicaties

Er is een samenvatting van het protrombine-deel van ons werk ingestuurd naar de tweejaarlijkse internationale vergadering van de International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH):

The effect of the intronic prothrombin 19911G allele on 3' end mrna processing in relation to the 20210G> a polymorphism. H.H. A. G. M. van der Putten, C. C. Spaargaren-van Riel, R. M. Bertina, H. L. Vos. Het is nog niet bekend of dit een voordracht of een poster zal worden.

Een manuscript over de protrombine-constructen is in voorbereiding.

Projectnummer: 2004.5

Titel: The role of amyloid in haemostasis
Projectleider: Dr. M.F.B.G. Gebbink
Instelling: Laboratorium voor Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht

Vraagstelling onderzoek

Trombose is het ongewenste vormen van bloedstolsels, bestaand uit o.a. het eiwit fibrine, die de bloedtoevoer naar vitale organen kunnen verhinderen. Het ontstaan van deze stolsels is onder andere een slecht verklaard symptoom van infecties en kanker en kan op zich levensbedreigende gevolgen hebben. Normaal wordt het stolsel opgeruimd door een enzym, tPA genaamd. Dit enzym wordt actief in de aanwezigheid van fibrine. Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat tPA ook actief wordt in de aanwezigheid van veel andere eiwitten. Wij hebben ontdekt dat tPA in het algemeen eiwitten herkent die moeten worden opgeruimd. Deze eiwitten zijn verouderd en/of misvormd. Dergelijke eiwitten liggen vaak ten grondslag aan ouderdomsziekten, zoals aderver-

kalking en de ziekte van Alzheimer (dementie). Doel van het onderzoek is om het nieuwe inzicht in het mechanisme van activatie van tPA en gelijkaardige enzymen te doorgronden. Hierdoor hopen wij bij te kunnen dragen aan de kennis over trombose. Op basis van ons onderzoek kan nieuwe therapie worden ontwikkeld om de kans op trombotische complicaties bij verschillende ziektebeelden te verminderen.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Patiënten met systemische amyloidose, een ziekte waarin verkeerd gevouwen eiwitten zich ophopen, vertonen onverklaarbare bloedingen. Wij hebben gevonden dat het opruimsysteem voor fibrine in deze patiënten constant actief is. Hierdoor worden vermoedelijk te weinig stolsels gevormd en hebben de patiënten een bloedingsneiging.

J. Thrombosis and Haemostasis (2007), in press.

Wanneer bloed in aanraking komt met bijv. glas, gaat het stollen. Dit komt omdat factor XII het vreemde oppervlak 'ziet', maar de manier waarop is onduidelijk. Factor XII lijkt erg veel op tPA en wij hebben gevonden dat het ook actief wordt in aanwezigheid van verkeerd gevouwen eiwitten, die zich onder andere op oppervlakken kunnen vormen. Deze kennis draagt onder andere bij aan het begrijpen van de trombotische complicaties die zich afspelen in haemodialyse en als gevolg van implantaties. Artikel in voorbereiding. Resultaten gepresenteerd (2 presentaties) op de ISTH meeting in Sydney (2005).

Omdat wij hebben gevonden dat tPA en factor XII actief worden door verkeerd gevouwen eiwitten, hebben wij uitgezocht hoe deze enzymen verkeerd gevouwen eiwitten herkennen. Zij doen dit middels het zogenaamde finger-domein. Deze nieuwe kennis zou een bijdrage kunnen leveren aan therapie tegen trombose. Artikel gepland midden-eind 2007.

tPA wordt actief in de aanwezigheid van verkeerd gevouwen eiwitten, maar tegelijkertijd ook in de aanwezigheid van fibrine. Hierdoor hebben wij ons gericht op de structuur van fibrine en gevonden dat deze zeer sterke overeenkomsten vertoont met die van verkeerd gevouwen eiwitten (zogenaamde amyloide cross-structuur). Wij denken dat deze structuur een zeer oud, maar functioneel, opruimsignaal voor eiwitten omvat. Door dit beter te begrijpen, hopen wij meer invloed te kunnen uitoefenen op het sneller en beter opruimen van ongewenste bloedstolsels. Studie wordt verder uitgewerkt.

Verkeerd gevouwen eiwitten, die tPA activeren, kunnen immuunresponsen in muizen oproepen. Dit betekent dat tPA als 'verklikker' kan dienen om ongewenste immuunreacties te voorkomen. Artikel in Journal of Biological Chemistry (2006).

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Het ontstaan van ongewenste bloedstolsels door activiteit

van factor XII.

Het opruimen van bloedstolsels door tPA en het achterliggende fibrinolytisch systeem.

Literatuurpublicaties

A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals.

J Biol Chem. 2007 Jan 26;282(4):2229-36. Epub 2006 Nov 29.

PMID: 17135263 [PubMed - in process]

Increased PAP Levels Indicate Activation of the Fibrinolytic System in Systemic Amyloidoses

Accepted for publication in the Journal of Thrombosis and Haemostasis

doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02457.x

Projectnummer: 2005.1

Titel: The role of the endothelial cell protein C receptor in the regulation of coagulation and inflammation

Projectleiders: prof dr. T. van der Poll & prof. dr. M.M. Levi
Instituut: Academisch Medisch Centrum (AMC); Center for Infection and inflammation (CINIMA), Centerr for Experimentale and Molecular Medicine (CEMM)

Vraagstelling onderzoek

Bij ernstige ontstekingen zoals een long- of nierbekkenontsteking of bloedvergiftiging wordt de bloedstolling geactiveerd. Hoe meer de bloedstolling bij een patiënt met een dergelijke ontsteking, hoe groter de kans is om aan deze ziekte te overlijden. Proteïne C is een eiwit met een sterk antistollende werking. Hiernaast lijkt het ook direct actief te zijn tegen ontstekingsreacties. Hoe precies is nog niet duidelijk. Proteïne C moet om werkzaam te kunnen zijn eerst worden geactiveerd. Voor de activering van lichaamseigen proteïne C is de endotheliale proteïne C receptor (EPCR) van belang, dit is een eiwit dat het proteïne C bindt en het vervolgens dusdanig verandert, dat het actief wordt.

EPCR komt vooral voor op het endotheel, dit is de binnenbekleding van het bloedvat, maar bevindt zich ook los in de bloedbaan en op andere lichaamscellen. Over de rol van de EPCR in ontstekingsziekten is echter nog weinig bekend. Het geven van geactiveerd proteïne C (APC) als medicijn aan patiënten met een ernstige ontsteking, blijkt de kans om te overlijden kleiner te maken. De rol en het belang van door het lichaam zelf gemaakt APC is echter eveneens nog niet bekend.

Onze onderzoeksgroep heeft veel belangstelling voor het grensgebied van ontsteking en bloedstolling en heeft al veel onderzoek gedaan op dit gebied. In dit project onderzoeken we hoe ernstige ontstekingen en bloedstolling verlopen, wanneer er heel veel aan de cel gebonden of oplosbaar EPCR of juist helemaal geen EPCR in het lichaam aanwezig is. Dit doen we door muizen te onderzoeken die dusdanig genetisch zijn veranderd dat ze aan deze eigenschappen voldoen. Het inzicht dat dit onderzoek zal opleveren in de rol van de EPCR bij ontstekingsziekten kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën bij ernstige ontstekingen

maar ook bij andere ziektes waarin sprake is van een verhoogde bloedstolling en hierdoor trombose.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

We hebben onderzocht of de aanwezigheid van veel of juist geen EPCR tot verschillende uitkomsten in longontsteking door bacteriën leidt. Dit lijkt niet het geval te zijn; dieren met veel of geen EPCR hebben evenveel bacteriën in de longen en evenveel ontsteking. We weten nog niet zeker of de EPCR inderdaad niet van belang is in longontsteking of dat er iets anders aan de hand is, bijvoorbeeld dat door de ziekte de EPCR inactief wordt gemaakt. Dat zoeken we momenteel uit door de bloedstolling te meten en door te onderzoeken op welk celtype precies EPCR zit in longontsteking. Als dit is uitgezocht kunnen we verder gaan met het onderzoeken van de rol van EPCR in modellen die uitgaan van ziekte van de long.

Ander onderzoek dat we gedaan hebben suggereert dat APC wel degelijk van belang is in longontsteking; dieren bij wie het eiwit PC was geblokkeerd hadden in de vroege fase van hun ziekte meer bloedstolling in de long en in het bloed, maar minder bacteriën in het bloed en in de organen.

In een model van buikvliesontsteking bleek de EPCR wel duidelijk van belang; meer EPCR en hierdoor waarschijnlijk meer APC leidde tot minder bacteriën in het bloed en minder ontsteking. We zijn hier op een interessante rol voor de EPCR in ontsteking gestuit. Momenteel doen we aanvullende experimenten om te zien hoe het werkt.

Verder zijn we momenteel bezig een model op te zetten om de rol van de EPCR te bepalen in bloedvergiftiging. Ook zijn we bezig een methode te ontwikkelen waardoor muizen tijdelijk een verhoogde hoeveelheid oplosbaar EPCR in het bloed hebben. Zo hopen we ook de rol van dit oplosbare EPCR in ontstekingsziekten en bloedstolling te kunnen onderzoeken.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

De modellen die wij onderzoeken zijn modellen voor ziekten die bij de mens gepaard gaan met activering van de bloedstolling. Deze kan dermate fors zijn, dat de patiënt er zelfs aan overlijdt. Kennis over de samenhang tussen ontsteking en bloedstolling is van belang om stollingsfactoren op het spoor te komen die een rol spelen in ontsteking, maar ook om te begrijpen hoe de bloedstolling wordt beïnvloed door ontsteking, soms met ernstige gevolgen. Het EPCR / PC – systeem speelt een centrale rol op dit snijvlak tussen ontsteking en trombose. Kennis over de rol van EPCR in ontsteking en hiermee gepaard gaande bloedstolling zou kunnen leiden tot betere therapieën tegen overmatige bloedstolling in ontstekingsziekten maar zou ook kunnen leiden tot betere behandeling van trombotische ziekten buiten de setting van ontsteking.

Literatuurpublicaties

Geen van de onderzoeken is nog helemaal “af” en daarom is er nog geen sprake van publicaties. De data over E. coli peritonitis zijn ingediend als abstract voor het belangrijkste

congres op gebied van bloedstolling, het twee-jarlijkse congres van de International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) in Genève in juli 2007.

Projectnummer: 2005.2

Titel: De rol van vitamine K in stabiliteit van antistolling

Projectleider: dr. F.J.M. van der Meer

Instituut: Leids Universitair Medisch Centrum, afdeling Hematologie

Vraagstelling onderzoek

Het lichaam heeft vitamine K nodig voor een goede bloedstolling. Vitamine K zit vooral in groenten, maar ook in olie, vetten, melkproducten en vlees. Eén molecuul vitamine K wordt meerdere keren gebruikt, waardoor tekorten eigenlijk weinig voorkomen. Antistollingsmedicijnen werken door dit hergebruik van vitamine K tegen te gaan. Het gevolg is een minder efficiënte bloedstolling en een kleinere kans op trombose.

Een groot nadeel van antistollingsmedicijnen is dat het antistollingseffect sterk kan wisselen. De mate van antistolling kan worden gemeten in het laboratorium en wordt uitgedrukt als de INR. Bij een te lage INR stolt het bloed nog te veel en is de kans op trombose verhoogd. Een te hoge INR verhoogt de kans op bloedingen. Het doel van ons onderzoek is om een zo stabiel mogelijk antistollingseffect te verkrijgen, zonder veel lage of hoge INR-uitslagen.

De hoeveelheid vitamine K in het lichaam beïnvloedt dus direct het effect van de antistollingsmedicijnen op de bloedstolling. Omdat onze voeding van dag tot dag verschilt, verschilt ook de hoeveelheid vitamine K die we opnemen in ons lichaam. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat mensen die antistollingsmedicijnen gebruiken en weinig vitamine K eten gevoeliger zijn voor een wisselende vitamine K inname en meer schommelingen in hun INR hebben. Als er meer vitamine K wordt gegeten zullen deze schommelingen dus af kunnen nemen. In deze studie wilden wij daarom onderzoeken of een stabielere antistolling kan worden bereikt door mensen die antistollingsmedicijnen gebruiken elke dag een vitamine K supplement te laten innemen.

Welke delen van de vraagstelling zijn beantwoord en op welke wijze?

Twee groepen van elk 100 mensen werden met elkaar vergeleken. Eén groep kreeg naast de antistollingsmedicijnen elke dag een capsule met vitamine K. De andere groep kreeg een capsule die er hetzelfde uitziet, maar geen werkzame stof bevat (een placebo). De studiemedicatie werd gedurende een half jaar gebruikt. Hierna werd de stabiliteit van de antistollingsbehandeling tussen de twee groepen vergeleken.

De groep die het vitamine K supplement had gekregen was stabiel ingesteld dan de groep die de placebo had gekregen. Patiënten in de placebo groep waren 86% van de tijd binnen de INR-streefwaarden, tegenover 90% in de vitamine K groep. Zowel lage als hoge INR uitslagen kwamen iets minder voor in de vitamine K groep.

Welke aspecten van de kennis over trombose zijn met het onderzoek gediend?

Hoewel al lange tijd bekend is dat de voeding invloed heeft op de behandeling met antistollingsmedicijnen, ontbreken tot op heden praktische adviezen aan patiënten. Het geven van een vitamine K supplement aan patiënten die worden behandeld met antistollingsmedicijnen lijkt een effectieve strategie om de stabiliteit van antistolling te vergroten. De effectiviteit en de veiligheid van de behandeling met antistollingsmedicijnen zullen hierdoor naar alle waarschijnlijkheid toenemen. Verder onderzoek is nodig voordat het geven van een vitamine K supplement daadwerkelijk als behandeling kan worden toegepast.

Literatuurpublicaties

Rombouts EK, Rosendaal FR, van der Meer FJM. The effect of vitamin K supplementation on anticoagulant treatment. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:691-692.

Rombouts EK, Rosendaal FR, van der Meer FJM. Daily vitamin K supplementation improves anticoagulant stability. Submitted for publication.

Projectnummer: 2005.4

Titel: Factor VII activating protease (FSAP): functional implications of the 'Marburg-1' polymorphism

Projectleider: prof.dr. K. Mertens

Instituut: Stichting Sanquin, Afd. Boeldstolling, Amsterdam

Het bovengenoemde project startte 1 juni 2006. Op de datum van het opvragen van de voortgangsverslagen bleek het niet mogelijk een voortgangsverslag samen te stellen gezien de korte looptijd van het project.