

Resultaat afgerond onderzoek 2002

- Project 9700.1 "Oorzaken van verhoogde expressie van protrombine (factorII)"
- Project 2001.2 "Het belang van het gen dat codeert voor het CYP2C9 enzym voor de instelling van patiënten op acenocoumarol"

Project 9700.1 "Oorzaken van verhoogde expressie van protrombine (factorII)"

A. Vraagstelling onderzoek

Dit project was vooral gericht op het verkrijgen van inzicht in de regulatie van het protrombine gen, omdat een verhoogde protrombine-spiegel het risico van trombose in de aderen vergroot. Ons doel was gericht op het vinden van de oorzaken van het hoge protrombine niveau in bepaalde trombosepatiënten en het karakteriseren van de bijbehorende

mechanismen. Binnen het project kunnen we een drietal hoofdlijnen onderscheiden. Zo hebben wij onderzoek verricht naar:

1. De wijze waarop o.a. de G20210A mutatie in het protrombine-gen leidt tot hogere protrombine-niveaus (zie onderdelen 1.1 en 1.2 hier beneden).
2. Andere, al dan niet erfelijke factoren, die een rol spelen bij het ontstaan van verhoogde protrombine spiegels (2.1 en 2.2).
3. De exacte organisatie van het regulerende gedeelte (de promoter/enhancer) van het protrombine gen (3).

B. Welke delen van de vraagstelling werden tijdens de projectduur beantwoord?

1.1. Een belangrijk deel van het onderzoek in dit project was gericht op een eerder gevonden mutatie in het protrombine gen, een G naar A verandering op positie 20210. Deze G20210A mutatie gaat gepaard met verhoogde protrombine spiegels én een twee- tot drievoudig verhoogd tromboserisico. Het werkingsmechanisme van deze mutatie was echter nog onduidelijk. De G20210A mutatie is gelegen op de laatste nucleotide van het protrombine mRNA, de zgn. polyadenyleringsplaats. We hebben het gebied rondom positie 20210 van een G- en van een A-allel zowel in enkelvoud als in duplo achter een luciferase reporter-gen gekloneerd. Vervolgens werd het effect van de mutatie bekeken op zowel RNA- als eiwit-niveau. De luciferase-productie bleek afhankelijk te zijn van de nucleotide op de 20210-positie, waarbij een A meer eiwit produceerde dan een G (net als in patiënten). De dubbelconstructen (GG,AA,AG,GA) gaven een vergelijkbaar, maar duidelijker, beeld. De verhoogde eiwit-productie wordt dus door de G naar A verandering veroorzaakt, waarschijnlijk omdat deze leidt tot een sterkere polyadenyleringsplaats en daardoor tot meer RNA (ref1). Deze bevindingen zijn in overeenstemming met resultaten uit soortgelijk onderzoek (Gehring et al., Nat Genet 2001; 28:389-92). Dit mechanisme is tot nu toe alleen voor het protrombine-gen beschreven.

1.2. Tevens werd onderzoek gedaan naar nieuwe mutaties, gelegen in hetzelfde deel van het protrombine gen (op posities 20207 en 20218). Deze (zeer zeldzame) mutaties zijn gevonden in trombose patiënten en zouden mogelijk ook betrokken kunnen zijn bij het ontstaan van de trombose. De voorlopige resultaten van dit onderzoek laten geen duidelijke relatie zien tussen deze nieuwe mutaties en verhoogde expressie (ref5). Het lijkt er eerder op dat in dit geval juist wat minder protrombine wordt gevormd.

2.1 Hoge protrombine niveaus worden lang niet altijd veroorzaakt door de G20210A mutatie. Zeer waarschijnlijk spelen ook andere factoren nog een rol bij het ontstaan van verhoogde protrombine spiegels. Om dit te onderzoeken werden uit de LETS studie, een patiënt-controle onderzoek naar oorzaken voor veneuze trombose, alle individuen geselecteerd zónder de G20210A mutatie, maar mét een protrombine niveau boven 130% van normaal. Vervolgens werd er bij de mensen met een geïsoleerde hoge protrombine spiegel (dwz de niveaus van alle andere relevante stollingsfactoren waren normaal) naar mogelijke andere

DNA veranderingen in het protrombine gen gezocht, zoals bv. in de promoter (het regulerende gedeelte van het gen). Hier werden helaas geen variaties gevonden. Vervolgens hebben we bestudeerd of er binnen onze geselecteerde groep van mensen met hoge protrombine spiegels bepaalde bekende DNA variaties (polymorfismen) in het protrombine vaker voorkwamen dan in de normale populatie. Hieruit bleek dat één polymorfisme, A19911G, geassocieerd was met hogere protrombine spiegels. Mensen met twee 19911-G genen bleken gemiddeld een 8% hogere protrombine niveau te hebben dan mensen met 19911-AA. Dit polymorfisme was niet direct geassocieerd met een trombose-risico. Er zijn wel aanwijzingen dat de combinatie van het 19911-G gen met de 20210-A mutatie op het andere chromosoom het trombose-risico verhoogt (ref2). Inmiddels zijn de resultaten uit dit onderzoek bevestigd door onafhankelijk onderzoek van een andere onderzoeksgroep (E.Pérez-Ceballos et al., British Journal of Haematology, 2002, 118, 610-614.)

2.2. Binnen dit onderdeel van het onderzoek werd ook aandacht besteed aan de karakterisatie van een 800 bp insertie/deletie polymorfisme in intron 4 van het protrombine gen. Aangezien dit polymorfisme leidt tot een grote verandering in dit intron, werden de aard van dit polymorfisme en de relatie met protrombine niveaus nader onderzocht. De insertie bleek het resultaat te zijn van een duplicatie van een deel van intron 4. Dit gebied is erg rijk aan zgn. L2 en Alu-repeats, wat mogelijk een rol gespeeld heeft bij het ontstaan van de duplicatie door recombinatie tussen twee sterk overeenkomende repeats. De duplicatie bleek niet geassocieerd met protrombine niveaus, en speelt daarom waarschijnlijk geen rol in het ontstaan van trombose (ref4).

3. Het regulerende gedeelte (de promoter/enhancer) van het protrombine gen is in detail onderzocht in dit project, omdat deze gebieden rechtstreeks verantwoordelijk zijn voor de protrombine productie. Uit eerder onderzoek was al gebleken dat de regulatie van transcriptie van het protrombine gen voor een belangrijk deel bepaald wordt door een leverspecifieke enhancer, gelegen op ongeveer 850 bp bovenstrooms van de startplaats van transcriptie. Onderzoek binnen het kader van het huidige project heeft het belang van deze enhancer bevestigd. De enhancer werd in detail gekarakteriseerd; dit heeft geleid tot de identificatie van drie transcriptiefactor-bindingsplaatsen in de protrombine enhancer. De eerste bindingsplaats bleek aan de lever-specifieke transcriptiefactor HNF4a (Hepatocyte Nuclear Factor) te binden, de tweede bindingsplaats kon door drie andere leverspecifieke transcriptiefactoren gebonden worden, nl. HNF1a en HNF3b en een derde, tot nu toe onbekende factor. De laatste bindingsplaats bond aan twee algemene, niet lever-specifieke, transcriptiefactoren, Sp1 en Sp3. Alle drie de bindingsplaatsen blijken belangrijk te zijn voor het optimaal functioneren van de enhancer. DNA-veranderingen in de tweede bindingsplaats hadden een groot effect op de transcriptie van het protrombine-gen, terwijl veranderingen op de plaatsen één en drie een wat milder, maar nog altijd duidelijk waarneembaar effect vertoonden. Een manuscript dat deze resultaten beschrijft is ingestuurd voor publicatie (ref3).

C. Welke aspecten van de kennis over trombose worden met het onderzoek gediend?

Trombose is een multi-factoriële aandoening. Dit betekent dat een combinatie van verscheidene risicofactoren een rol speelt bij het uiteindelijk optreden van trombose. Deze factoren kunnen erfelijk zijn (bijvoorbeeld de Factor V Leiden mutatie, protrombine G20210A mutatie), maar ook verworven zijn (bijvoorbeeld operaties, pilgebruik, zwangerschap). Via dit project hebben wij geprobeerd een bijdrage te leveren aan het identificeren van nieuwe (genetische) risicofactoren voor veneuze trombose en het onderzoeken van daaraan gerelateerde mechanismen. Centraal hierbij stond het protrombine-gen. Onderzoek naar de protrombine mutatie (G20210A) heeft aangetoond dat deze mutatie direct betrokken is bij het ontstaan van trombose. Tijdens dit onderzoek is er meer inzicht verkregen in het werkingsmechanisme van deze mutatie. Omdat hoge protrombine niveaus slechts voor een deel verklaard kunnen worden door de aanwezigheid van de protrombine mutatie is ook onderzoek gedaan naar mogelijke andere, onbekende genetische risicofactoren. De bijdrage van het 19911-polymorfisme aan het risico van 20210A dragers is hiervan een goed

voorbeeld. Tevens werd door dit onderzoek de inzichten in de regulatie van protrombine expressie vergroot. Dit biedt mogelijk aanknopingspunten voor nieuw onderzoek, waarbij mogelijk een verdere verklaring voor de variaties in protrombine expressie tussen verschillende personen kan worden gevonden.

D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Ref1 H. Ceelie, C.C. Spaargaren-van Riel, R.M. Bertina, H.L. Vos. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene which leads to an improved poly(A) attachment site [ingestuurd voor publicatie].

Ref2 H. Ceelie, R.M. Bertina, A. van Hylckama Vlieg, F.R. Rosendaal, H.L. Vos. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. [Thromb Haemost 2001; 85:1066-70].

Ref3 H. Ceelie, C.C. Spaargaren-van Riel, M. de Jong, R.M. Bertina, H.L. Vos. Identification of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer [ingestuurd voor publicatie].

Ref4 H. Ceelie, C.C. Spaargaren-van Riel, R.M. Bertina, H.L. Vos. Characterization of a large insertion/deletion polymorphism in intron 4 of the human prothrombin gene [in voorbereiding].

Ref5 H. Ceelie, C.C. Spaargaren-van Riel, R.M. Bertina, H.L. Vos. Functional analysis of additional polymorphisms in the 3'-UTR of the human prothrombin gene [in voorbereiding].

Project 2001.2 "Het belang van het gen dat codeert voor het CYP2C9 enzym voor de instelling van patiënten op acenocoumarol"

A. Vraagstelling onderzoek

Dit onderzoek heeft betrekking op een mogelijk verband tussen het CYP2C9-genotype op de instelling van patiënten op acenocoumarol in de eerste 3-6 maanden. Het gen CYP2C9 bepaalt de 'kwaliteit' van het enzym CYP2C9, dat een belangrijke rol speelt bij de omzetting in de lever van acenocoumarol. Een slechte 'kwaliteit' betekent dat acenocoumarol trager wordt afgebroken in de lever en dat patiënten daardoor misschien 'gevoeliger' worden voor acenocoumarol. Er zijn drie genotypen onderzocht: CYP2C9*1 (= normaal), CYP2C9*2 en CYP2C9*3. Een totaal genotype bestaat uit twee zogenaamde allelen en wordt bijvoorbeeld aangeduid als CYP2C9*1/*1 (= normaal), CYP2C9*1/*2, CYP2C9*1/*3, CYP2C9*2/*2, etc. In ons onderzoek waren wij geïnteresseerd in een mogelijk verband tussen het CYP2C9-genotype en: 1. De eerste INR-meting op de 4e dag (start-INR); 2. De benodigde dosering acenocoumarol; 3. Het risico van 'over-ontstolling' (INR-waarde groter dan 6) en 4. De tijd nodig om een stabiele instelling op acenocoumarol te bereiken. Tenslotte hebben wij gekeken naar een mogelijk verband tussen het voorkomen van bloedingen en het CYP2C9-genotype.

B. Welke delen van de vraagstelling werden in het jaarverslag beantwoord?

Het onderzoek is uitgevoerd bij patiënten van de trombosediensten van Utrecht en 's-Hertogenbosch. Voor het onderzoek werden uitsluitend patiënten gevraagd die een startschema acenocoumarol hadden van 6-4-2 (eerste dag 6 mg, tweede dag 4 mg, derde dag 2 mg) en een eerste controle (INR-bepaling) op de vierde dag. Voor het onderzoek is van 229 patiënten het CYP2C9-genotype bepaald. De uitslagen van de genotyperingen waren: 145 x CYP2C9*1/*1 (= normaal), 34 x CYP2C9*1/*2, 4 x CYP2C9*2/*2, 42 x CYP2C9*1/*3, 2 x CYP2C9*2/*3 en 2 x CYP2C9*3/*3. Op alle vragen hebben wij in ons onderzoek een duidelijk antwoord gevonden. Er bleek een duidelijk verband te bestaan tussen het bezit van tenminste een CYP2C9*3 gen en:

1. Een hogere start-INR; gemiddeld was deze voor CYP2C9*3-dragers 0,5 eenheid hoger. De kans dat de eerste INR binnen het zogenaamde therapeutisch gebied lag (dus 'effectief'

- was), was bij dragers van CYP2C9*3 ongeveer 3 x zo groot als bij de overige patiënten.
2. Een lagere dosering. Draggers van CYP2C9*3 hadden gemiddeld een dosering acenocoumarol nodig die 0,5 mg lager was dan de overige patiënten, dit betekent ongeveer 3,5 tablet minder binnen een weekschema.
 3. Een grotere kans op 'doorschieten' van de ontstopping voor stabilisatie van de instelling op acenocoumarol wordt bereikt. Deze kans was voor CYP2C9*3 dragers ruim 5 x zo groot als voor de overige patiënten.
 4. Een kleinere kans op het bereiken van een stabiele instelling binnen de 6 maanden dat het onderzoek heeft geduurd. Deze kans was voor CYP2C9*3 dragers ongeveer 40 % kleiner dan voor de overige patiënten. Bovendien duurde het bereiken van een stabiele periode voor dragers van CYP2C9*3 die wel stabiliteit behaalden gemiddeld 15 dagen langer dan voor andere patiënten.
 5. Uit ons onderzoek blijkt verder dat het bezit van het CYP2C9*2 gen geen effect heeft op de bovengenoemde uitkomsten. Dit in tegenstelling tot het in andere landen vaak gebruikte cumarine-anticoagulans warfarine, waarbij ook dragers van het CYP2C9*2 gen anders blijken te kunnen reageren op warfarine.
 6. Wij zagen in ons onderzoek geen verschil in bloedingen tussen de genotypen. Echter, het totaal aantal bloedingen was slechts 18; het aantal patiënten was te gering om over verschillen in bloedingsrisico's uitspraken te kunnen doen.

C. Welke aspecten van de kennis over trombose worden met het onderzoek gediend?

De aspecten van de kennis over trombose die met dit onderzoek worden gediend, blijken uit de resultaten:

1. De instelling op acenocoumarol heeft te maken met het CYP2C9-genotype. Mensen die het CYP2C9*3 gen bezitten, hebben een lagere dosering nodig, schieten vaker 'door' en zijn moeilijker stabiel in te stellen. Hoewel hier niet direct uit volgt dat voortaan van alle patiënten die op acenocoumarol worden ingesteld het CYP2C9-genotype zou moeten worden bepaald, is het wel duidelijk dat dit genotype een rol speelt bij het op de juiste instelling brengen van patiënten.
2. Wat hieruit kan worden afgeleid is dat bepaalde interacties met acenocoumarol met een risico gepaard kunnen gaan dat tot nu toe niet duidelijk in kaart is gebracht. Als een goed op acenocoumarol ingestelde patiënt een geneesmiddel wordt gegeven dat het enzym CYP2C9 sterk remt -dergelijke geneesmiddelen bestaan-, wordt deze patiënt als het ware veranderd in een patiënt met een 'ander' genotype. Volgens de resultaten van ons onderzoek vergroot je daarmee de kans op uitschieters en op het (opnieuw) bereiken van een stabiele instelling.

D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Van het bovenstaande onderzoek is een tussenrapportage geaccepteerd voor publicatie als een Engelstalig abstract in de British Journal of Clinical Pharmacology onder de titel: Association between the CYP2C9*3 allele and acenocoumarol anticoagulation status.