

## Resultaat afgerond onderzoek 2003

- Project 9800.2 "Regulatie van de transcriptie van het Proteïne S gen in verschillende weefseltypes"
- Project 2000.1 "vWF cleaving-protease activity and the clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura"
- Project 2000.3 "Weefsel-specifieke expressie van factor VIII"
- Project 2001.5 "Transcriptional regulation of the human protein C gene: in vitro and in vivo studies"
- Project 2002.1 "ESPRIT: European/Australian Stroke Prevention in Reversible Ischaemia Trial"

### Project 9800.2 "Regulatie van de transcriptie van het Proteïne S gen in verschillende weefseltypes"

#### A. Vraagstelling onderzoek

De hoofdvraag van dit onderzoek was hoe de activiteit van het Proteïne S gen geregeld wordt. Proteïne S is een eiwit dat overmatige stolling tegengaat en een tekort aan Proteïne S leidt tot een verhoogde tromboseneiging. Omdat Proteïne S door een aantal sterk verschillende weefsels, zoals b.v. lever en vaatwand, gemaakt wordt, rees de vraag hoe de productie van Proteïne S gecoördineerd wordt. Gen-activiteit start als het gen dat codeert voor dat eiwit tot boodschapper RNA (mRNA) wordt overgeschreven door middel van transcriptie. Dit mRNA wordt vervolgens vertaald in het eiwit (translatie). Hoe meer mRNA gemaakt wordt des te meer eiwit geproduceerd wordt. De promoter, die aan het begin van een gen gelegen is, is de belangrijkste regulator van de transcriptie. In een promoter worden allerlei signalen van binnen en buiten de cel geïntegreerd en omgezet in een bepaald transcriptie-niveau ofwel gen-activiteit. De promoter speelt dus een cruciale rol in het bepalen van het uiteindelijke eiwitniveau. In dit project hebben we daarom de promoter van het Proteïne S gen in detail onderzocht.

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

Werk met menselijke cellijnen die verschillende weefseltypes vertegenwoordigden toonde aan dat Proteïne S in alle cellijnen gemaakt werd, maar dat het productieniveau in het algemeen laag was. Het is opmerkelijk hoe wijdverbreid de productie van Proteïne S is. Voor de nadere karakterisatie van de Proteïne S promoter, kloneden we allereerst een DNA fragment met de promoter. Vervolgens bepaalden we de DNA-volgorde van dit 6000 baseparen (bp) grote stuk. Om de promoter te lokaliseren werd aan de voorkant van dit fragment stelselmatig DNA weggehaald. De ingekorte DNA-stukken werden, net als het volledige fragment, voor een z.g. reporter-gen geplaatst. Een reporter-gen codeert voor een eiwit waarvan de activiteit eenvoudig én nauwkeurig gemeten kan worden. Nadat de DNA-combinatie in menselijke weefselkweekcellen was ingebracht, kon de promoteractiviteit van de Proteïne S promoterfragmenten bepaald worden. Hieruit bleek dat een fragment van slechts 400 bp voldoende was voor een maximale activiteit van de Proteïne S promoter. In alle cellijnen, die model staan voor verschillende weefsels, was hetzelfde stuk verantwoordelijk voor de activiteit. Mede vanwege bovenstaande waarneming bepaalden we vervolgens de startplaatsen van transcriptie. De synthese van mRNA start doorgaans op één of meer specifieke punten in of direct na de promoter. De verdeling tussen deze punten is vaak weefsel specifiek. Met behulp van een nieuwe, zeer betrouwbare methode konden we voor het eerst de transcriptie-startpunten van het Proteïne S gen nauwkeurig in kaart brengen. Drie of vier startpunten bleken bij voorkeur gebruikt te worden, maar ook andere startplaatsen werden gevonden. De verdeling van de mRNA-startpunten vertoonde wel enige variatie over de verschillende cellijnen, maar de verschillen waren onvoldoende

groot om verder onderzoek te rechtvaardigen. Een zeer belangrijke observatie tijdens het onderzoek naar de startplaatsen was dat deze alleen goed konden worden bepaald in het gen zoals dat op het chromosoom zelf aanwezig is. Na klonering van het promoter-fragment bleken er namelijk geen favoriete startplaatsen meer te zijn en werd een relatief groot gebied gebruikt voor transcriptie-initiatie. Het is binnen promoteronderzoek zeer gebruikelijk om z.g. plasmide-constructen te gebruiken, waarbij de promoter voor een vreemd reporter-gen wordt gezet. Het eiwitproduct van dit gen wordt als een maat voor de promoter-activiteit gebruikt. De promoter-gencombinatie bevindt zich op een plasmide, een klein circulair stukje DNA. Deze zeer gebruikelijke techniek is uitstekend in staat om de architectuur van een promoter in detail te onderzoeken (zie verder), maar gebruikt kennelijk niet de normale startplaatsen. Wij denken dat de implicaties hiervan van groot belang zijn voor andere promoteronderzoekers". Het 400 bp grote gebied van de Proteïne S promoter is door ons nauwkeurig in kaart gebracht door de eiwitten die aan de promoter binden te karakteriseren. Deze z.g. transcriptiefactoren zijn eiwitten die de transcriptie van het gen stimuleren en zijn de belangrijkste mediators van de in- en uitwendige signalen. Voor dit deel van het onderzoek hebben we gebruik gemaakt van zogenaamde EMSA's (Electrophoretic Mobility Shift Assays). Hierbij wordt binding van een eiwit aan een kort fragment van de Proteïne S promoter zichtbaar gemaakt door een tragere beweging van het DNA-eiwit complex tijdens elektroforese. Het bindende eiwit kan geïdentificeerd worden door de aard van het gebonden fragment (transcriptiefactoren binden alleen aan bepaalde DNA-oligonucleotiden) en door antilichamen die slechts aan één transcriptiefactor kunnen binden. In dit onderzoek concentreerden we ons op transcriptie in de lever door gebruik te maken van een kernextract van de levercellijn HepG2. We konden vier gezamenlijke bindingsplaatsen voor Sp1 en Sp3 karakteriseren en elk één bindingplaats voor HNF3 (een lever-specifieke transcriptiefactor), NF-Y en voor een lid van de CREB/ATF familie van transcriptiefactoren. In vervolgonderzoek zullen we ook de data verwerken van z.g. cotransfectie-experimenten, waarin plasmiden coderend voor diverse transcriptiefactoren gezamenlijk met een Proteïne S promoter construct in een lever (HepG2) en een niet-levercellijn (HeLa) werden ingebracht. De laatste lijn werd gebruikt om de gevoeligheid van de promoter voor lever-specifieke transcriptiefactoren te testen. Cotransfectie van C/EBP, HNF3, Sp1, Sp3, p49 en AP2 stimuleerden de Proteïne S promoter, terwijl AP1, de androgen receptor en p65 juist remden. Ook deze resultaten bieden weer aanknopingspunten voor vervolgonderzoek. Tijdens de proeven met de cellen was al gebleken dat toevoeging van interleukine-6 (IL6), een belangrijke signaalstof bij ontstekingen, leidt tot een hogere Proteïne S productie. De transcriptiefactor STAT3 is vaak betrokken bij het doorgeven van het signaal van IL6 naar de genen die door IL6 worden beïnvloed. In de Proteïne S promoter konden wij een uitstekende kandidaat bindingsplaats voor STAT3 identificeren en na verandering van de lokale DNA-oligonucleotide konden we aantonen dat het inderdaad deze plek was die verantwoordelijk was voor de binding van STAT3 en daarmee voor de IL6-gevoeligheid van de Proteïne S promoter. Hierdoor komt het totale aantal bindingsplaatsen voor transcriptiefactoren in de Proteïne S promoter op tenminste acht en het aantal verschillende eiwitten dat aan de promoter bindt op minstens vijf. Uit de literatuur is bekend dat de anticonceptie-pil het trombose-risico verhoogt. Met name de z.g. derde generatiepillen verhogen het risico. Experimenten met vrijwilligsters hebben aangetoond dat het Proteïne S niveau in sliksters van derde generatiepillen relatief laag is. Dit zou een gedeeltelijke verklaring voor het toegenomen trombose-risico in pilgebruiksters kunnen zijn. Wij onderzochten daarom de gevoeligheid van de Proteïne S promoter voor 17 $\beta$ -estradiol, de biologisch actieve vorm van het estrogeen zoals dat in de pil zit. In geen van onze experimenten konden wij een gevoeligheid van de Proteïne S promoter voor 17 $\beta$ -estradiol aantonen. Dit suggereert dat het effect van de pil op het Proteïne S niveau in plasma niet door een rechtstreeks effect op de promoter wordt veroorzaakt.

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

Dankzij dit project zijn we aanzienlijk meer te weten gekomen over de regulatie van Proteïne S promoter door transcriptiefactoren. Dit vormt een degelijke basis voor verder onderzoek

omtrent de instelling van het Proteïne S niveau in plasma. Daarnaast zijn we ook veel te weten gekomen over de mogelijkheden en onmogelijkheden van ons promoter-reporter-gen modelsysteem, dat we succesvol gebruiken voor het beantwoorden van vele vragen met betrekking tot een verhoogde tromboseneiging. Hierdoor kunnen wij in de toekomst ons onderzoek beter sturen. De stimulering van de Proteïne S productie door IL-6 en het ontbreken van effecten bij 17-estradiol brengen ons weer iets dichterbij het verklaren van het optreden van trombose. Wel willen we nadrukkelijk stellen dat de effecten van deze twee signaalstoffen op de Proteïne S promoter slechts een klein onderdeel zijn van hun effecten op de stolling als geheel. Hierbij kunnen allerlei elkaar versterkende of juist uitdovende effecten optreden. Het is dus niet mogelijk om uit deze waarnemingen eenvoudig conclusies te trekken over mogelijkheden om het risico op trombose te verlagen.

#### **D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag**

Initiation of Protein S mRNA synthesis in human liver, various cells lines and Protein S promoter-reporter gene plasmids; a relaxation of start site control in the in vitro model  
C.J.F. de Wolf, R.M.J. Cupers, R.M. Bertina en H.L. Vos. Ingezonden voor publicatie.

### **Project 2000.1 "vWF cleaving-protease activity and the clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura"**

#### **A. Vraagstelling onderzoek**

- 1). een gevoelige assay te maken voor von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13) voor de diagnostiek van thrombotische thrombocytopenische purpura (TTP)
- 2). de voorspellende en diagnostische waarde van ADAMTS-13 in TTP en andere vormen van microangiopathie
- 3). de ADAMTS-13 activiteit te correleren aan merkers van endotheel cel schade in TTP

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

1). We hebben een vWF construct gemaakt met een grote gevoeligheid voor ADAMTS-13 activiteit. Met deze assay kunnen we ADAMTS-13 meten, maar blijkt bij nadere analyse ADAMTS-13 activiteit in TTP normaal te zijn. Inmiddels hebben ook anderen gevonden dat de antistoffen bij TTP deze recombinante constructen niet herkennen en niet geschikt zijn om ADAMTS-13 te meten. Inmiddels hebben wij in samenwerking met Sanguin Amsterdam (dr.J.Voorberg) recombinante ADAMTS-13 constructen tot expressie gebracht. Met deze constructen zijn we in staat om bij alle patiënten met afwezige ADAMTS-13 activiteit antistoffen te meten (1). Het is te verwachten dat we met deze bepaling snel TTP kunnen diagnosticeren en vervolgen.

2). Er is landelijke samenwerking opgezet om de diagnostiek en behandeling van TTP te verbeteren. Bovendien wordt bloed plasma verzameld voor wetenschappelijk onderzoek bij patiënten met verdenking TTP (Coombs negatieve hemolytische anemie, trombocytopenie) in 16 perifere ziekenhuizen en 7 academische centra. De TTP behandelaren komen 2 maal per jaar bijeen om gegevens uit te wisselen. In totaal zijn nu 98 patiënten met een microangiopathie geïnccludeerd, waarvan 34 patiënten met klassieke TTP. Bij al deze patiënten is plasma verzameld. Andere patiënten categorieën zijn hemolyse en trombocytopenie in de zwangerschap, TTP na nier of beenmerg-transplantatie, maligne hypertensie, hemolytisch uremisch syndroom, maligne ziekten en autoimmuun ziekten. De analyse laat zien dat met ADAMTS-13 activiteit TTP zeer betrouwbaar is vast te leggen (sensitiviteit 96%, specificiteit 100%) (2,3,4). Bovendien voorspelt ADAMTS-13 activiteit de respons op plasmawisseling. De antistof detectie, zoals genoemd onder 1, wordt nog uitgevoerd.

3). Endotheelcel schade is gemeten in 9 TTP patiënten. Longitudinaal zijn verschillende klinische parameters vast gelegd (5,6).

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

Thrombotische thrombocytopenische purpura (TTP) is een ziektebeeld met trombose in de kleine haarvaten. Hierdoor kan het bloed niet goed naar de organen stromen en ontstaan er bloedingen, nier problemen en neurologische complicaties. De behandeling bestaat uit het geven van donor plasma waardoor de trombose stopt en stolsels weer worden opgelost. Wij hebben de factor (=ADAMTS-13) bestudeerd die in het patiënten bloed ontbreekt waardoor de stolling ontstaat. Hiermee kan TTP in een vroeg stadium worden gediagnosticeerd en kunnen we de hoeveelheid donor plasma die nodig is beter bepalen. Onbehandeld is de mortaliteit van TTP hoog. Onmiddellijke behandeling met donor plasma is levensreddend. Indien de diagnose niet of te laat wordt gesteld dan kan de patiënt in een zeer slechte toestand raken en zelfs overlijden. Met de bepaling van ADAMTS-13 wordt het mogelijk om met zeer hoge gevoeligheid TTP vast te stellen. ADAMTS-13 breekt von Willebrand factor af. Indien von Willebrand niet goed wordt afgebroken dan ontstaat TTP. Met alle academische centra en 16 perifere ziekenhuizen is er samenwerking opgezet om de waarde van deze nieuwe bepaling te meten (Landelijke TTP werk groep). De resultaten in 98 patiënten met een TTP-gelijkend ziektebeeld laat zien dat de voorspellende waarde van het ADAMTS-13 gehalte hoog is. Tot nu toe is er slechts een enkele patiënt geweest waarbij normale ADAMTS-13 activiteit werd gemeten en toch een TTP werd geconstateerd. In alle andere gevallen had de test een goede voorspellende waarde. De kans dat iemand een TTP heeft wordt in meer dan 96% van de gevallen goed voorspeld. In de toekomst zal dit consequenties hebben voor het snel en correct voorspellen van TTP en zal de patiënt sneller en beter kunnen worden behandeld.

### **D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag**

1. B.M. Luken, E.A.M. Turenhout, R.Fijnheer, J.Voorberg. The spacer domain of ADAMTS-13 contains a major binding site for antibodies in patients with acquired TTP, submitted.

2. Franx A, Huisjes AJM, Schiphorst ME, Bruinse HW, Fijnheer R. Von Willebrand Factor-cleaving protease (VWF-CP) activity to discriminate between HELLP-syndroom and pregnancy-associated TTP. Hypertens Pregnancy 2002;21 (Suppl 1):S94.

3. F.Verheijen, Fijnheer R. Thrombotische thrombocytopenische purpura. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 2004, geaccepteerd voor publicatie.

4. J. J. Hulstein, C. N. Rison, M. C. Kappers-Klunne, R. J. Hene, A. Franx, Ph. G. de Groot, A. Brand, R. Fijnheer. ADAMTS-13 activiteit bepaling in de diagnostiek bij thrombotische microangiopathie. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 2004, geaccepteerd voor publicatie.

5. TR de Wit, R Fijnheer, S Kersting, R.J. Hene, HJ Brinkman, JA.van Mourik. Endothelial cell damage is not the primary event in TTP. (Thesis TR de Wit, Utrecht 2003).

6. Romani De Wit T, Fijnheer R, Brinkman HJ, Kersting S, Hene RJ, van Mourik JA. Endothelial cell activation in thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP): a prospective analysis. Br J Haematol. 2003;123:522-7.

### **Project 2000.3 "Weefsel-specifieke expressie van factor VIII"**

#### **A. Vraagstelling onderzoek**

Factor VIII is een van de bloedstollingsfactoren die niet alleen in de lever maar ook in andere organen, zoals de nier, long of milt wordt gesynthetiseerd. Het is echter niet duidelijk hoeveel

factor VIII door deze organen wordt geproduceerd en of dit factor VIII überhaupt wel in de bloedbaan terecht komt. Het doel van dit onderzoek is de hepatische- en extra-hepatisch synthese van factor VIII nader te beschrijven en inzicht te verkrijgen in de oorzaak van sterk fluctuerende factor VIII spiegels bij diverse aandoeningen, zoals trombose en ontstekingen.

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

D.m.v. histochemisch onderzoek en kwantitatieve factor VIII mRNA analyses werd bij proefdieren (muis, varken) nader onderzocht welke organen betrokken kunnen zijn bij de extra-hepatische factor VIII synthese. Potentieel belangrijke factor VIII-producerende organen zijn, behalve de lever, de nier en de milt. In de lever zijn m.n. de sinusoidale endotheelcellen verantwoordelijk voor de factor VIII productie; de identiteit van factor VIII-synthetiserende cellen in de nier en milt hebben we nog niet ondubbelzinnig kunnen vaststellen. In de nier zijn vermoedelijk glomerulaire cellen betrokken bij de synthese. Het belang van extra-hepatische factor VIII synthese wordt onderstreept door de waarneming dat het chirurgisch verwijderen van de lever geen, of zelfs een stimulerend effect op de factor VIII synthese lijkt te hebben. (Dier-experimenteel onderzoek uitgevoerd in samenwerking met de Afdeling Chirurgie van het AMC). Ook de waarneming dat transplantatie van beenmergcellen van een gezonde muis bij factor VIII-deficiënte muizen leidt tot factor VIII expressie in diverse organen, waaronder long en milt, maar niet de lever, onderstreept het extra-hepatische synthese concept. (Onderzoek uitgevoerd in samenwerking met het Laboratorium voor Experimentele Inwendige Geneeskunde, AMC). Onderzoek naar factor VIII synthese bij patiënten met leverinsufficiëntie, een aandoening waarbij de plasma factor VIII spiegel meestal sterk verhoogd is, bood aanknopingspunten voor het mechanisme dat verantwoordelijk is voor de stijging van de factor VIII spiegel. Bij een aantal leveraandoeningen bleek het factor VIII mRNA gehalte van het zieke weefsel duidelijk verlaagd te zijn, ondanks de verhoogde plasma factor VIII spiegel. Deze waarnemingen suggereren dat andere organen de factor VIII synthese hebben overgenomen. Omdat ook de synthese van LRP (een receptor die betrokken is bij de verwijdering van factor VIII uit de bloedbaan) in de lever verlaagd was, kan niet worden uitgesloten dat de verhoogde factor VIII spiegel bij leveraandoeningen mede het gevolg is van een verminderde klaring door LRP. Deze veronderstelling wordt ondersteund door de waarneming dat bij een hemofilie A patiënt (factor VIII tekort) die leed aan een ernstige leverfunctiestoornis, de overleving van toegediend factor VIII duidelijk langer was dan de gemiddelde overleving van factor VIII. Ook werd voor het eerst geconstateerd dat bij levercirrhose de hepatische synthese van von Willebrand factor, een eiwit dat in de bloedbaan factor VIII stabiliseert, verhoogd is. Dit verschijnsel kan mede verklaren waarom de plasmaconcentratie van factor VIII verhoogd is bij deze aandoening.

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

Een verhoogde plasma factor VIII concentratie is een risicofactor voor trombose. Dit onderzoek heeft een bijdrage geleverd tot ons inzicht in de rol die diverse organen en cellen spelen bij zowel de biosynthese van factor VIII als de synthese van eiwitten die de bloedspiegel van factor VIII reguleren.

### **D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag**

M.J. Hollestelle, T. Thinnes, K. Crain, J.K. Kruijt, T.J.C. van Berkel, D.J. Loskutoff, J.A. van Mourik. Tissue distribution of factor VIII gene expression in vivo; a closer look. Abstract, International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) 2001. (Thrombosis and Haemostasis).

M.J. Hollestelle, H.G.M. Geertzen, I.H. Straatsburg, T.M. van Gulik, J.A. van Mourik. Factor VIII expression in liver disease. Abstract, ISTH 2003 (Journal of Thrombosis and Haemostasis).

M.J. Hollestelle, R.G.M. Geertzen, T.M. van Gulik, J.A. van Mourik. Expression and regulation of factor VIII synthesis in liver disease. Abstract, The American Society of Hematology (ASH) 2003. (Blood).

M.J. Hollestelle, H.G.M. Geertzen, I.H. Straatsburg, T.M. van Gulik, J.A. van Mourik. Factor VIII expression in liver disease. Thromb Haemost 2004;91:267-75.

S.H.H.F. Schoenmakers, M.J. Hollestelle, J.C.M. Meijers, C.A. Spek, P.H. Reitsma, J.A. van Mourik. Hematopoietic stem cell derived factor VIII. Publicatie in voorbereiding.

## **Project 2001.5 "Transcriptional regulation of the human protein C gene: in vitro and in vivo studies"**

### **A. Vraagstelling onderzoek**

De doelstelling van dit project is het beter karakteriseren van de transcriptionele regulatie van het humane proteïne C gen. Hiertoe hebben we ons een drietal vragen gesteld:

1. Welke transcriptie factor bind in vivo aan de HNF-1/HNF-6 bindingsplaats?
2. Welke transcriptie factoren binden aan de gekarakteriseerde enhancer (pCE2) die direct naast de transcriptie start site gelegen is?
3. Zijn de evolutionair geconserveerde gebieden in de proteïne C promotor mogelijk functioneel doordat er transcriptie factoren aan binden.

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

Gedurende de laatste periode van het project hebben we ons bezig gehouden met de onderdelen 2 en 3. Ten einde vraag 2 te beantwoorden hebben we in het eerste jaar van het project alle benodigde kloneringen van het gist-one-hybrid systeem tot een goed eind gebracht. In deze laatste fase van het project hebben we m.b.v. een ratte cDNA bank getracht transcriptie factoren te karakteriseren die specifiek aan het pCE2 gebied binden. Deze screening leverde 73 kolonies op bij gebruik making van wildtype pCE2 en slechts 45 kolonies bij gebruik making van een gemuteerde pCE2 (van de mutatie is bekend dat de onbekende transcriptie factoren niet meer binden). Uit al deze kolonies, die potentieel transcriptie factoren bevatten die binden aan pCE2, is vervolgens DNA geïsoleerd. Helaas bleken de 'positieve' kolonies geen plasmides voor transcriptie factoren te bevatten maar voornamelijk plasmides coderend voor ribosomale eiwitten. Het 'lekken' van het gist-one-hybrid systeem lijkt hiervoor verantwoordelijk maar ongeacht de reden moeten we concluderen dat we aan het eind van het project nog steeds niet weten welke transcriptiefactoren binden aan pCE2. Teneinde vraag 3 te beantwoorden hebben we een groot aantal gel-shift experimenten uitgevoerd. In deze experimenten is het mogelijk om te bepalen of bepaalde DNA gebieden specifiek transcriptiefactoren binden. Voor alle evolutionair geconserveerde gebieden geldt dat we geen specifieke binding van transcriptiefactoren hebben kunnen aantonen. Hieruit concluderen we dat de evolutionair geconserveerde gebieden niet van (groot) belang zijn voor de transcriptionele activiteit van het proteïne C gen.

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

Afwijkingen in het proteïne C gen die leiden tot proteïne C deficiëntie zijn sterk geassocieerd met een toename in het trombose risico. Dit duidt erop dat proteïne C een zeer belangrijke (zo niet de belangrijkste) factor is bij het ontstaan van trombose. Dit project heeft als doelstelling het verdiepen van de onze inzichten betreffende de transcriptionele regulatie van het medisch zeer relevante proteïne C gen. Aangezien de transcriptionele regulatie van het proteïne C gen een belangrijke determinant is voor plasma proteïne C waarden en daardoor

dus trombotisch risico zullen de behaalde resultaten bijdragen aan het beter begrijpen van proteïne C geassocieerde trombose. Daarnaast is het zeer waarschijnlijk dat het mechanisme waarmee plasma proteïne C niveaus worden gereguleerd vergelijkbaar zal zijn met het mechanisme voor andere vitamine K afhankelijke stollingsfactoren (Factor VII, factor IX, etc).

#### **D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag**

Geen

### **Project 2002.1 "ESPRIT: European/Australian Stroke Prevention in Reversible Ischaemia Trial"**

#### **A. Vraagstelling onderzoek**

Welke behandeling is het meest effectief in het voorkomen van een herhaalde uiting van harten vaatziekten bij mensen die reeds een TIA of een klein herseninfarct hebben doorgemaakt, veroorzaakt door een bloedpropje (thrombus) in één van de slagaders in het hoofd:

- A) orale antistollingsmiddelen
- B) aspirine 30-325 mg/dag + dipyridamol 400 mg/dag of
- C) alleen aspirine 30-325 mg/dag

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

ESPRIT is een lopend onderzoek, dat naar verwachting in 2007 afgerond zal worden. Patiënten die een TIA of een klein infarct hebben doorgemaakt wordt gevraagd deel te nemen. Er wordt geloot in welke behandelingsgroep (A, B of C) zij ingedeeld worden. Ze krijgen de desbetreffende medicatie en worden één keer per half jaar opgeroepen voor een controlebezoek bij hun neuroloog. Tijdens die bezoeken wordt een vragenlijst doorgenomen waarbij geïnventariseerd wordt of de patiënt in de afgelopen periode een nieuwe uiting van hart- en vaatziekten heeft doorgemaakt. Als dat zo is wordt dit uitgebreid gerapporteerd aan het centrale trialbureau in Utrecht, waar de gegevens verwerkt worden. Een onafhankelijke commissie van medisch specialisten beoordeelt of de patiënt inderdaad een nieuwe uiting (zogenoeten 'eindpunt') heeft doorgemaakt. De eindpunten in ESPRIT zijn een beroerte en/of hersenbloeding, een hartinfarct, een retinainfarct of -bloeding, een bloeding elders in het lichaam, amputatie als gevolg van vaatlijden of overlijden. Op dit moment (april 2004) doen er ruim 2700 patiënten uit 83 ziekenhuizen in Europa, Australië, Azië en Amerika mee aan ESPRIT. Bij hen zijn 507 eindpunten gerapporteerd, waarvan er 447 definitief beoordeeld zijn. Dit zijn 182 beroertes, 21 hersenbloedingen, 43 andere bloedingen, 31 hartinfarcten, 52 overledenen als gevolg van hart- en vaatziekten, 50 overledenen niet als gevolg van hart- en vaatziekten, 6 retinabloedingen en -infarcten, 5 amputaties en 57 gemelde eindpunten die door de eindpuntcommissie als 'geen eindpunt' beoordeeld werden. Omdat de onderzoekers 'geblindeerd' zijn en dus niet weten welke medicatie de patiënten die een eindpunt doormaakten gebruiken, kunnen er nog geen verschillen in effectiviteit tussen de verschillende behandelingsgroepen gerapporteerd worden. Wel zijn er 3 interimanalyses uitgevoerd door een onafhankelijke 'Data Monitoring Committee', welke leidden tot het advies het onderzoek voort te zetten. Een eerdere, vergelijkbare trial (SPIRIT) is voortijdig gestopt omdat er in de groep patiënten die met orale antistollingsmiddelen behandeld werd meer hersenbloedingen optraden dan in de andere groepen. In ESPRIT krijgen de patiënten een lagere dosis antistollingsmiddelen (INR ingesteld op 2.0 tot 3.0). Uit een tussentijdse analyse is vooralsnog niet gebleken dat zij een grotere kans hebben op een hersenbloeding dan patiënten uit de andere 2 behandelingsgroepen. Verwacht wordt dat de eerste eindresultaten eind 2005 behaald zullen worden en de laatste in 2007.

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

Het onderzoek is direct te vertalen naar de alledaagse praktijk met betrekking tot het

voorkomen van trombose bij patiënten die al bewezen hebben een verhoogd risico op trombose te hebben omdat ze een TIA of een herseninfarct hebben doorgemaakt.

#### **D. Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag**

- Major Ongoing clinical trials in Stroke. Iedere 4 maanden.
- Gorter JW, De Schryver ELLM, Algra A. Preventie van vasculaire complicaties na cerebrale ischemie door arteriële oorzaak; het ESPRIT-onderzoek: milde antistollingstherapie, combinatiebehandeling met acetylsalicylzuur plus dipyridamol of behandeling met alleen acetylsalicylzuur? Ned Tijdschr Geneesk 1998;142(6):316-318.
- Gorter JW, De Schryver ELLM, Algra A. Sekundärprävention nach ischämischem zerebralen Insult; die ESPRIT- Studie: niedrig dosierte Antikoagulation, Kombinationstherapie mit Acetylsalicylsäure / Dipyridamol oder Monotherapie mit Acetylsalicylsäure? Der Nervenarzt - 1999; 70: 368-370.
- De Schryver ELLM, Gorter JW, Algra A, van Gijn J et les investigateurs d'ESPRIT. Prévention de complications vasculaires après ischémie cérébrale d'origine artérielle. Etude ESPRIT: anticoagulation modérée, association aspirine - dipyridamole ou aspirine seule? La Revue de Médecine Interne 1999; 20:397-9.
- De Schryver ELLM, on behalf of the ESPRIT group. Design of ESPRIT: an international randomized trial for secondary prevention after non-disabling cerebral ischaemia of arterial origin. Cerebrovasc Dis 2000; 10: 147-150.
- E.L.L.M. De Schryver. ESPRIT: Protocol Change. Cerebrovasc Dis 2001;11:286.
- ESPRIT, European /Australian Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial - Protocol. Published on the Lancet website: <http://www.thelancet.com/>
- Algra A, De Schryver ELLM, Van Gijn J, Kappelle LJ, Koudstaal PJ. Oral anticoagulants versus Antiplatelet Therapy for Preventing Further Vascular Events After Transient Ischemic Attack or Minor Stroke of Presumed Arterial Origin. Cochrane review. Stroke 2003 34(1): 234-5
- De Schryver ELLM, Algra A, Van Gijn J. Cochrane review: Dipyridamole for Preventing Major Vascular Events in Patients with Vascular Disease. Stroke 2003 34(8): 2072-80
- De Schryver ELLM, on behalf of the European/Australian Stroke Prevention in Reversible Ischaemia Trial (ESPRIT) Group. Dipyridamole in Stroke Prevention; Effect of Dipyridamole on Blood Pressure. Stroke 2003 34(10): 2339-42
- The European/Australasian Stroke Prevention in Reversible Ischaemia Trial (ESPRIT) Study Group. Oral Anticoagulation in Patients After Cerebral Ischaemia of Arterial Origin and Risk of Intracranial Hemorrhage. Stroke 2003 34(10): e45-e47
- ESPRIT: Safety and Efficacy of Oral Anticoagulation-a Rebuttal. Stroke 2003 34(10)