

Wetenschappelijk jaarverslag

Bijzonder hoogleraar Trombosesstichting Nederland

Prof.dr. J.W.N. Akkerman is in 1997 aangesteld als bijzonder hoogleraar trombosebehandeling en trombosepreventie van de Trombosesstichting Nederland. 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.

Het wetenschappelijk onderzoek in 2005 was gericht op de volgende projecten:

1. Beïnvloeding van bloedplaatjes door de insuline/glucose ratio

Steun: Diabetes Fonds Nederland en 'Fonds voor het hart'

Een onderzoek naar de rol van glucose en insuline in de regulatie van plaatjesactiviteit. Stornissen in de slagaders door trombose en arterosclerose zijn een belangrijk probleem bij suikerziekte. Hierbij spelen bloedplaatjes een grote rol. Bloedplaatjes komen onder normale omstandigheden alleen in actie bij het ontstaan van een bloeding. Plaatjes worden dan kleverig en verkleven in de wond aan de beschadigde vaatwand en aan elkaar. Er ontstaat een plaatjesprop die de wond afdicht en verder bloedverlies tegengaat. Er zijn aanwijzingen dat bij suikerziekte plaatjes geactiveerd worden zonder dat er bloedverlies is. Aangetoond werd dat bij gezonde personen insuline de plaatjes remt en dat bij patiënten met Diabetes mellitus type II deze remming is verdwenen. Dit verklaart waarom bij deze patiënten plaatjes te makkelijk worden geactiveerd. Het onderzoek werd afgerond met een promotie.

2. Plaatjes activering door geoxideerd LDL

Steun: Nederlandse Hartstichting

Geoxideerd LDL (oxLDL) is een belangrijke trombogene factor. In de atherosclerotische vaatwand wordt LDL opgenomen, geoxideerd en geaccumuleerd in macrofagen waardoor schuimcellen ontstaan die de normale fysiologie van de vaatwand ontregelen. Aangetoond is dat oxLDL plaatjes activeert en dat dit gebeurt via twee, gescheiden, activeringswegen ieder met hun eigen receptoren en activeringsmechanismen. Het onderzoek werd afgerond met een promotie.

Wetenschappelijk jaarverslag

3. Cholesterol- rijke domeinen, centrale factoren in plaatjes adhesie en aggregatie

(met Dr. H. Heijnen) Steun Nederlandse Hartstichting

Een component in het plasma die 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. Aangevoerd is dat de samenstelling van deze cholesterol 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 cholesterol rijke domeinen zijn 'eigen' receptor in hogere concentratie aanwezig is, wat het activering proces sterk bevordert. De publicatie van dit werk kreeg de prijs voor beste publicatie in het tijdschrift JTH voor de sectie bloedplaatjes in 2005. (referentie 6)

4. 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 plaatjesteekort 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 energie verbruik gebracht, waardoor zij minder snel worden geactiveerd. Energie-depletie lijkt de plaatjes te beschermen tegen activatie tijdens het bewaren en bovendien afbraak door macrofagen tegen te gaan. De voortgang van dit onderzoek is veilig gesteld middels een subsidie van de Landsteiner Stichting voor Bloedtransfusie Research.

Promoties

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

- The impact of low density lipoprotein oxidation on platelet responsiveness
S. Korporaal, Universiteit Utrecht, 19-04-05
- Platelet regulating properties of insulin revisited.
- I.Andrade Ferreira, Universiteit Utrecht, 18-05-05

Daarnaast maakte hij deel uit van de beoordelingscommissie van het proefschrift: Activation of phosphatidylinositol 3-kinase – a key regulator of platelet function. Julio Cesar Reséndiz-Nieves, Faculty of Medicine, Helsinki University, Helsinki, Finland, 30-09-05

Wetenschappelijk jaarverslag

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 Trombosestichting Nederland. Hij was lid van de Wetenschappelijk Advies Raad en wetenschappelijk eindredacteur van het tijdschrift 'Tromnibus', 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 médicale INSERM, lid van the International Advisory Board XXlth International Congress on Thrombosis and Haemostasis, Geneve 2007 en trad hij toe tot de Editorial Board van Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry. Hij was chairman XXth European Platelet Meeting, October 13-15, Ede, The Netherlands.

Daarnaast werden vele manuscripten beoordeeld voor het tijdschrift 'Journal of Thrombosis and Haemostasis' 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, Platelets.

Hij was als extern adviseur betrokken bij het beoordelen van subsidieaanvragen voor de Nederlandse Hartstichting, ZonMw, Diabetes Fonds, The British Heart Foundation, The Wellcome Trust, het Instituut voor de aanmoediging van innovatie door wetenschap en technologie in Vlaanderen (ITW), National Medical Research Council Singapore, Medical Research Council UK en het Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung FWF, Österreich. Health Research Board in Ireland en Scientific consultant National Blood Authority, UK. Tevens werd hij uitgenodigd op te treden als 'Guest editor van het tijdschrift 'Pathophysiology of haemostasis and Thrombosis': Lipids and platelet function'.

Wetenschappelijk jaarverslag

Publicaties

1. Badlou, B.A., W.M. Smid and J.W.N. Akkerman. Prolonged platelet preservation by transient metabolic suppression. *Transfusion* 2005; 45: 214-222
2. Andrade Ferreira, I. and J.W.N. Akkerman. IRS-1 and the vascular complications in diabetes mellitus. *Vitamins and hormones* 2005;70: 25-67
3. Korporaal, S.J.A., G. Gorter, H.J.M. van Rijn and J.W.N. Akkerman. Effect of oxidation on the platelet activating properties of Low Density Lipoprotein. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2005; 25: 1-7
4. Andrade Ferreira, I., A.I.M. Mocking, R. Urbanus, S.Varlack, M. Wnuk and J.W.N. Akkerman. Glucose uptake via GLUT3 in human platelets is regulated via protein kinase B. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 32625-32633
5. P.E.M.H. Litjens, G. van Willigen, G. Gorter, C. Weeterings, M.J.W. IJsseldijk, Ph.G. de Groot, E. Koivunen, C.G. Gahmberg and J.W.N. Akkerman. A tripeptide mimetic of von Willebrand factor residues 981 – 983 enhances platelet adhesion by signaling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005, 3:1274-1283
6. Lier van. M.*, F. Lee, R.W. Farndale, G. Gorter, Y. Ohno-Iwashita, J.W.N. Akkerman and H.F.G. Heijnen. Adhesive surface determines raft composition in platelets adhering under flow. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3: 2514-2525 (*young investigator award for best publication in JTH 2005, section platelets)
7. Andrade Ferreira, I., A.I. Mocking, M.A.H. Feijge, G. Gorter, T.W. van Haefen, 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* 2005 Dec 8; [Epub ahead of print]
8. Biró, E., J.W.N. Akkerman, F.J. Hoek, G. Gorter, L.M. Pronk, A. Sturk and R. Nieuwland. The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3: 2754-2763
9. Akkerman, J.W.N. Slecht en goed cholesterol. *Tromnibus* 2005; 33: 4-6
10. Akkerman, J.W.N. Verslag van de nascholingsdag van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten, zaterdag 16 april 2005, congrescentrum Orpheus te Apeldoorn. *Tromnibus* 2005; 33: 33-37
11. Akkerman, J.W.N. Secundaire plaatjesactivatie. *Tromnibus* 2005; 33: 53-56

Afgeronde projecten

2003.1 Differentiële werking van trombine-receptoren op trombusvorming

Dr. T. Lindhout

Hart- en vaatziekten Instituut van de Universiteit Maastricht (CARIM)

Subsidiebedrag: € 105.000,00

Vraagstelling onderzoek

Bij de vorming van een bloedpropje (trombus) in een beschadigd bloedvat speelt trombine een ingewikkelde rol. Trombine is betrokken bij het samenklonteren van bloedplaatjes aan de beschadigde vaatwand, zorgt ervoor dat dit propje d.m.v. fibrinedraden versterkt wordt en activeert de bloedplaatjes waardoor deze op hun beurt de vorming van trombine stimuleren. In dit project wordt de wisselwerking tussen trombine en bloedplaatjes in de vorming van een (levensbedreigende) trombus onderzocht. Hiertoe maken we gebruik van synthetische verbindingen die na opname door vaatwandcellen (endotheel) en bloedplaatjes deze cellen minder gevoelig maken voor trombine en als zodanig trombusgroei zouden kunnen voorkomen of afremmen.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

Trombine, het eindproduct van het bloedstollingproces, is een multifunctioneel enzym. Naast de pro- en antistollingseigenschappen speelt dit molecuul een rol in ontstekingsreacties, tumorgroei, trombose, en metastase. Al deze functies van trombine vinden hun oorsprong in het activeren van de trombinereceptoren PAR1 en PAR4 op een verscheidenheid aan cellen. Stoffen die geactiveerd PAR1 en PAR4 kunnen remmen zijn dus potentiële medicijnen voor de behandeling van ontstekingen, tumoren en trombose. In ons (reageerbuis) onderzoek hebben we met succes intracellulaire remmers van geactiveerd PAR1 en PAR4 gesynthetiseerd, getest op efficiëntie om cellen binnen te kunnen dringen en getest op effectiviteit in het remmen van trombine-geïnitieerde celfuncties. De hoeveelheid remmer nodig om procoagulante (trombogene) processen voor 50% te remmen (IC50) is sterk afhankelijk van de trombine concentratie. In het geval van bloedplaatjes en bij een subnanomolaire trombine concentraties is de IC50 ongeveer 1 micromolair. De remmers hadden geen invloed op de trombine-geïnduceerde vormverandering van gekweekte endotheelcellen. Dit proces volgt een intracellulaire route waar de PAR1 antagonist niet werkzaam is. Echter, mobilisatie van intracellulair calcium (een maat voor stimulering van de prikkelketen) werd evenmin geremd. Het onderzoek werd afgerond met het bestuderen van de PAR1 en PAR4 antagonisten in een muismodel waar trombose opgewekt werd in de halsslagader en in de microcirculatie. Inspuiten van de intracellulaire PAR4 antagonist voorkwam trombusvorming in de beschadigde halsslagader maar niet in beschadigde capillairen van de microcirculatie. Momenteel loopt er een onderzoek in het AMC naar de effecten van de door ons gesynthetiseerde PAR1 en PAR4 antagonisten in

Afgeronde projecten

een ontstekingsmodel. De PAR4 antagonist leidt tot een verbetering (minder leverschade en gunstig ontstekingsprofiel) wanneer muizen blootgesteld worden aan endotoxine.

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

Via dit project wordt een bijdrage geleverd aan het identificeren van trombine-receptoren op het bloedplaatje die betrokken zijn bij het tromboseproces. Het onderzoek richt zich met name op het beantwoorden van vragen over het wanneer en in welke mate deze receptoren actief worden tijdens de vorming van een trombus die het gevolg is van een beschadiging van een bloedvat (ader en slagader). Belangrijk gereedschap in dit onderzoek zijn selectieve remmers van de trombine-receptoren afhankelijkke activering van bloedplaatjes. Ons doel is om deze remmers te ontwikkelen en te testen in de reageerbuis (in vitro) maar ook in vivo. De fundamentele inzichten die hierdoor verkregen worden, kunnen op hun beurt weer aangewend worden voor het ontwikkelen van effectieve anti-trombotische middelen.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

- S.J.H. Wielders, S. Béguin, H.C. Hemker, T. Lindhout Factor XI-dependent reciprocal thrombin generation consolidates blood coagulation when tissue factor is not available. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1138-1142.
- J.F.W. Keuren, S.J.H. Wielders, E.M. Bevers, T. Hackeng, J.W.M. Heemskerk, T. Lindhout Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through Protease-Activated Receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1499-1505.
- H. van Genderen, S.J.H. Wielders, T. Lindhout, C.P.M. Reutelingsperger. Rolling and adhesion of apoptotic monocytes is impaired by loss of functional cell surface expressed P-selectin Glycoprotein Ligand-1. *J. Thromb Haemost* 2006 (geaccepteerd voor publikatie).
- A. Bennaghmouch, C.P.M. Reutelingsperger, T. Lindhout, N. Bitsch, S.J.H. Wielders, J. Narula, L. Hofstra. Real-time in vivo imaging of the kinetics of macrovascular thrombus formation. *Stroke* 2006 (revised manuscript submitted)
- S.J.H. Wielders, J.F.W. Keuren, A. Bennaghmouch, T. Hackeng, H. Deckmyn, E.M. Bevers, T. Lindhout. Intracellular PAR antagonists have anticoagulant and anti-thrombotic properties. Abstract XXth Congress Of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Sydney 2005.

Afgeronde projecten

2003.3 Identificatie van een receptor betrokken bij fibrine gemedieerde aggregatie van bloedplaatjes onafhankelijk van integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$

Dr. T. Lisman
Universitair Medisch Centrum Utrecht
Subsidiebedrag: € 106.287,00

Vraagstelling onderzoek

De hechting van bloedplaatjes aan elkaar (aggregatie) speelt een essentiële rol in hemostase en trombose. Vroeger werd gedacht dat plaatjes aggregatie uitsluitend verloopt via de receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. In vooronderzoek hebben we echter laten zien dat er een alternatieve plaatjes aggregatie weg bestaat. Deze alternatieve aggregatie weg verloopt onafhankelijk van $\alpha_{IIb}\beta_3$, en is nooit eerder ontdekt, omdat voor deze manier van aggregatie de vorming van het enzym trombine nodig is. De klassieke manier van plaatjes aggregatie verloopt echter onder condities waarin trombine vorming niet kan plaatsvinden. In dit project zoeken we naar de plaatjes receptor die deze alternatieve manier van aggregatie medieert.

Welke delen van de vraagstelling werden in het jaarverslag beantwoord?

Door middel van biochemische technieken is getracht de receptor die betrokken is bij $\alpha_{IIb}\beta_3$ -onafhankelijke aggregatie te identificeren. Ook is geprobeerd $\alpha_{IIb}\beta_3$ -onafhankelijke aggregatie te remmen met een scala aan receptor fragmenten, monoklonale antilichamen, en andere remmers. Helaas hebben beide benaderingen niet geleid tot de identificatie van de door ons gepostuleerde fibrine receptor. Het onderzoek is vervolgens een iets andere weg ingeslagen door de toevallige ontdekking van een ander nieuw mechanisme waarop trombine bijdraagt aan de vorming van een plaatjesprop. Trombine heeft vele belangrijke functies in trombose en hemostase, waaronder de activatie van plaatjes en de vorming van fibrine. In ons onderzoek hebben we laten zien dat trombine niet alleen indirect trombusvorming ondersteunt (door het activeren van plaatjes en het knippen van fibrinogeen tot fibrine), maar dat trombine ook direct betrokken is bij de vorming van een plaatjesprop. Trombine geïmmobiliseerd op glas of op een fibrine netwerk is in staat om plaatjes uit stromend bloed te vangen. Dit proces is afhankelijk van binding van trombine aan plaatjes glycoproteïne Ib en van de activatie van de PAR receptoren. De observatie dat trombine een adhesief eiwit voor bloedplaatjes is, is nieuw en verrassend, omdat trombine een oplosbaar eiwit is. Bekende adhesieve eiwitten zijn in het algemeen componenten van de extracellulaire matrix (bijvoorbeeld collageen).

Afgeronde projecten

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

Een beter begrip van de mechanismen waarop plaatjes aan een beschadigde vaatwand en aan elkaar hechten is essentieel voor het ontwerpen van nieuwe anti-trombotische medicamenten. In dit onderzoek hebben we laten zien dat trombine plaatjes kan aantrekken via glycoproteïne Ib op het plaatje. We stellen voor dat het blokkeren van de interactie tussen trombine en glycoproteïne Ib een mogelijk nieuwe strategie voor de behandeling van (arteriële) trombose is. Een potentieel voordeel van deze antitrombotische strategie ten opzichte van de strategieën die reeds in de kliniek worden gebruikt, is dat specifiek een enkel aspect van het bloedplaatje geremd wordt, terwijl het nog mogelijk blijft een bloedplaatje op andere manieren te activeren. De bloedplaatjesfunctie wordt dus niet volledig lam gelegd, waardoor de kans op bloedingen geassocieerd met deze antitrombotische strategie potentieel verlaagd is ten opzichte van conventionele behandelings methoden.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

- Weeterings C., Adelmeijer J., Myles T., de Groot P.G., Lisman T. Glycoprotein Ib α -Mediated Platelet Adhesion and Aggregation to Immobilized Thrombin Under Conditions of Flow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006, in press.
- Lisman T., Weeterings C., de Groot P.G. Platelet aggregation: involvement of thrombin and fibrin(ogen). *Front Biosci.* 2005 Sep 1;10:2504-17.

Afgeronde projecten

2003.4 Nature and relevance of the instability of activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

Dr. J.C.M. Meijers

Academisch Medisch Centrum Amsterdam

Subsidiebedrag: € 101.070,00

Vraagstelling onderzoek

Een hartinfarct of een beroerte zijn het gevolg van afsluitingen van bloedvaten door bloedstolsels. Deze afsluitingen veroorzaken weefselbeschadiging in het hart of de hersenen. Bij het ontstaan van een stolsel ofwel trombus, speelt het bloedstollingsstelsel een belangrijke rol. Onder normale omstandigheden worden stolsels (trombi) opgelost door het zogenaamde fibrinolytische systeem, de fibrinolyse. De bloedstolling en de fibrinolyse moeten dus goed op elkaar zijn afgestemd. Indien dit niet het geval is dan kan een trombus of juist een bloeding ontstaan. TAFI (Trombine-actieveerbare fibrinolyse remmer) is een eiwit dat deze balans bewaakt. De actieve vorm van TAFI, TAFIa, remt het oplossen van een stolsel. Op deze manier voorkomt het dat een stolsel te vroeg weer afgebroken wordt. TAFIa wordt echter spontaan inactief. Het is alleen niet duidelijk hoe dit gebeurt. Het doel van dit onderzoek is uit te zoeken welk stuk van TAFI regelt of TAFIa actief dan wel inactief is.

Welke delen van de vraagstelling werden in het jaarverslag beantwoord?

TAFI is een inactief pro-enzym. Trombine knipt een stukje van TAFI af, waardoor het actieve TAFIa ontstaat. TAFIa is een labiel enzym; het verliest zijn activiteit door een vormverandering. We weten niet welke bouwstenen (aminozuren) van TAFI hierbij betrokken zijn. Carboxypeptidase B is een eiwit dat erg op TAFIa lijkt. Op basis van de driedimensionale structuur van CPB dacht men dat de aminozuren isoleucine 182 en 183 belangrijk zijn bij het inactief worden van TAFIa. Daarom hebben we een mutant eiwit gemaakt waar deze aminozuren veranderd zijn in aminozuren die CPB op diezelfde positie heeft. Dit leidde echter niet tot een stabiel TAFIa, maar wel tot een TAFI vorm die moeilijker geactiveerd kon worden. Blijkbaar zijn aminozuur 182 en 183 betrokken bij het actief worden van TAFI in plaats van het inactief worden van TAFIa.

Daarnaast hebben we gekeken of er gebieden zijn in TAFI die heel anders zijn opgebouwd dan overeenkomende gebieden in CPB. In twee van deze gebieden (aminozuur 293 tot 333 en 293 tot 401) hebben we alle aminozuren van TAFI die afweken van die in CPB, vervangen door die van CPB.

Vervanging van aminozuur 293 tot 333 resulteerde in een nog labieler TAFIa dan normaal. Door aminozuur 293 tot 401 te vervangen door CPB aminozuren konden we inderdaad een stabiel TAFIa maken. We weten nu dus dat het laatste stuk van TAFI erg belangrijk is bij het inactief worden van TAFIa.

Daarna hebben we kleinere stukjes vervangen, maar dat leidde niet tot een stabiel TAFIa.

Afgeronde projecten

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

Wanneer de balans tussen bloedstolling en stolselafbraak verstoord is, is TAFI een mogelijk aangrijpingspunt om de balans te herstellen. Een stabielere TAFIa zal een stolsel beter beschermen tegen afbraak en dus een neiging tot bloeden voorkomen. Een minder stabiel TAFIa kan aan de andere kant voorkomen dat een stolsel te lang blijft zitten, zoals bij trombose. Het is dan ook belangrijk dat we goed begrijpen hoe TAFI werkt en hoe het actief en inactief wordt, zodat we hierop kunnen aangrijpen als het nodig is.

Dit onderzoek heeft niet alleen aangetoond dat de aminozuren 182 en 183 een rol spelen bij het actief worden van TAFI, maar ook dat het laatste stuk van TAFI belangrijk is voor de stabiliteit van het actieve TAFIa. Het verder ophelderen van het mechanisme dat leidt tot activiteit en inactiviteit van TAFIa kan belangrijk zijn voor het ontwikkelen van nieuwe behandelstrategieën om een verstoorde balans tussen het stollen van bloed en het afbreken van bloedstolsels te herstellen.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

- P.F. Marx, S.R. Havik, J.A. Marquart, B.N. Bouma, J.C.M. Meijers (2004) Generation and characterization of a highly stable form of activated thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J. Biol. Chem.* 279:6620-6628.
- P.F. Marx, S.R. Havik, B.N. Bouma, J.C.M. Meijers (2005) Role of isoleucine residues 182 and 183 in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *J. Thromb. Haem.* 3(6):1293-1300

Lopende projecten

2004.1 Modulatie van de lysosofatidaat homeostase in het atheroom: een nieuwe strategie ter preventie van trombotische complicaties na plaqueruptuur

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

Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, afdeling

Biofarmacie/Therapeutische Gen Modulatie, Universiteit Leiden, Leiden

Subsidiebedrag: € 198.200,00

Startdatum: 1 september 2004. Looptijd: 4 jaar

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 werden in het verslagjaar beantwoord?

Analyse van de vetsamenstelling van muizenplaques liet zien dat ook in ons muizenmodel voor hart- en vaatziekten LPA ophoping plaatsvindt en wel in dezelfde mate als in humane plaques (van 0.9 naar 37.6 pmol LPA/mg weefsel), wat aantoont dat ons model representatief is voor de humane situatie. Een pilotstudie liet zien dat afwezigheid van een enzym in de aanmaak van LPA en arachidonzuur (cPLA2IVA) in circulerende ontstekingscellen voldoende lijkt om de plaqueontwikkeling af te remmen.

Verder is gevonden dat chronische toediening van LPA via injectie in de buikholte gedurende de plaqueontwikkeling verrassend genoeg resulteerde in een verminderde plaquegroei. Lokale toediening van LPA ter plekke van de plaque daarentegen leidde tot een lichte verlaging van de stabiliteit van en bloedingen in de plaque. Mogelijk speelt hierbij ook een rol dat de bloedplaatjes na lokale toediening van LPA minder gevoelig lijken voor plaatjesactivatoren zoals ADP. 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.

Tenslotte is een studie uitgevoerd naar de effecten van een op LPA gelijkend vetmolecuul, sphingosine 1-phosphate (S1P) dat net als LPA door

Lopende projecten

geactiveerde bloedplaatjes wordt uitgescheiden. Toediening van een synthetische analoog van S1P, FTY-720, remt de plaqueontwikkeling door onderdrukking van het immuunsysteem zonder noemenswaardige effecten op de bloedstolling.

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

Onze studie naar de effecten van LPA na toediening van LPA via de buikholte toont aan dat niet alle bronnen van LPA leiden tot een verhoogde bloedstolling. Juist lokale blootstelling van hoog-risico gebieden zoals de plaque blijkt te resulteren in een veranderde gevoeligheid voor plaatjesaggregatie en bloedingen.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

- Bot I., Bot M., Saulnier-Blache J.S., Van Berkel T.J.C., Biessen E.A.L. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. Manuscript in preparation/ Thesis Bot I, Modulation of Atherothrombotic Factors: Novel Strategies for Plaque Stabilization, 2005 September; 77-88.
- Nofer J.R., Bot M., Brodde M., Brinkmann V., Assmann G., Biessen E.A.L. FTY720, a synthetic sphingosine 1-phosphate (S1P) analogue, inhibits development of atherosclerosis in LDL-receptor-deficient mice. Submitted Published abstract
- Bot M., Bot I., Saulnier-Blache J.S., Van Berkel T.J.C., Biessen E.A.L. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. Circulation. 2005; 112(17):II-290.

Lopende projecten

2004.2 Factor VIII' escape from LRP-dependent clearance: Reappraisal of the role of vWF

Dr. A.B. Meijer

Stichting Sanquin Bloedvoorziening Amsterdam

Subsidiebedrag: € 126.404,00

Startdatum: 1 november 2004. Looptijd: 2 jaar

Vraagstelling onderzoek

Bloedstollingsfactor VIII (FVIII) is een onmisbaar eiwit voor het goed functioneren van de bloedstolling. Een eiwit dat de bloedspiegel van FVIII sterk kan beïnvloeden is von Willebrand factor (vWf). vWf vormt een hecht complex met FVIII en voorkomt op deze wijze dat FVIII zeer snel uit het bloed wordt verwijderd. In ons laboratorium hebben wij in het recente verleden een eiwit geïdentificeerd dat direct betrokken is bij dit verwijderingsproces. Verder hebben wij aangetoond dat vWf de binding van FVIII aan deze zogenaamde 'klaringsreceptor' efficiënt kon tegengaan. Ondanks de aanwezigheid van vWf in het bloed wordt FVIII niettemin verwijderd via deze receptor. Een mogelijke verklaring is dat het vWf-FVIII complex eerst dissocieert, waarna FVIII kan binden aan de klaringsreceptor. 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 werden in het verslagjaar beantwoord?

Om de rol van vWf in het verwijderingsmechanisme van FVIII te onderzoeken, dient het proces van opname van FVIII door cellen (die FVIII afbreken) te worden gevolgd. Wij maken hiervoor gebruik van varianten van FVIII en vWf die een unieke fluorescente sensor bevatten. De verschillende kleuren die door de sensoren worden uitgestraald, stellen ons in staat om met behulp van fluorescentie-microscopie de individuele eiwitten te volgen op het oppervlak van (of in) levende cellen. Deze unieke meetmethode kan de vraag beantwoorden of, en zo ja, hoe vWf de opname van FVIII door cellen beïnvloed. De eerste fase van ons onderzoek heeft zich vooral toegespitst op de constructie en zuiveren van de fluorescerende varianten van FVIII en vWf. De aanwezigheid van de fluorescentie sensor bleek nauwelijks de functionaliteit van vWf en FVIII te verstoren. De initiële resultaten van deze studie toonden verder aan dat fluorescentie-microscopie een krachtige techniek is om de celbinding en internalisatie van FVIII te kunnen volgen. Bij muizencellen, waarop de klaringsreceptor aanwezig is, leek vWf de celbinding van FVIII te kunnen remmen. In de tweede fase van de studie wordt nu de rol van vWf in het FVIII klaringsmechanisme nader onderzocht. Hierbij wordt tevens gebruik gemaakt van cellen die model staan voor het humane systeem. Gezien de initiële resultaten van de eerste fase verwachten wij inzicht te krijgen in de rol van vWf in het klaringsmechanisme van FVIII.



Lopende projecten

Welke aspecten van de kennis over trombose worden 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 bloedingneiging. Daartegenover 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 bloed reguleren, kan daarom van belang zijn bij het bestrijden van trombotische aandoeningen die hun oorzaak vinden in een verhoogde FVIII bloedspiegel.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Deze studie heeft nog niet geleid tot een publicatie.



Lopende projecten

2004.3 Functionele analyse van humane monoclonale antistoffen gericht tegen ADAMTS-13 bij patiënten met trombotische trombocytopenische purpura

Dr. J. Voorberg

Stichting Sanquin Bloedvoorziening Amsterdam

Subsidiebedrag: € 126.404,00

Startdatum: 1 maart 2005. Looptijd: 2 jaar

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 ADAMTS-13 aangetroffen. ADAMTS-13 is een eiwit dat betrokken is bij het knippen van Von Willebrand Factor (VWF)polymeren. VWF polymeren worden door endotheelcellen (die de bekleding van de vaatwand vormen) uitgescheiden en direct daarna in kleinere stukjes geknipt door ADAMTS-13. Door de aanwezigheid van antistoffen gericht tegen ADAMTS-13 circuleren er bij patiënten met TTP zeer lange VWF polymeren die bijdragen aan de vorming van bloedplaatjes rijke stolsels in de haarvaten. Doel van dit onderzoek is om te bestuderen op welke wijze de antistoffen gericht tegen ADAMTS-13 interfereren met het knippen van VWF polymeren.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

Om te bestuderen op welke wijze antistoffen gericht tegen ADAMTS-13 interfereren met het knippen van VWF polymeren hebben we allereerst een aantal humane monoclonale antistoffen geïsoleerd. Hierbij hebben we gebruik gemaakt van de antistofproducerende cellen van patiënten met TTP. Via een aantal stappen is de genetische informatie die codeert voor de verschillende antistoffen achterhaald. Daarna is deze informatie gebruikt om de verschillende antistoffen te produceren in zoogdiercellen. Op deze wijze is een panel van monoclonale antistoffen verkregen dat representatief is voor de antistoffen die circuleren bij patiënten met TTP. Allereerst is bestudeerd aan welk deel van ADAMTS-13 de antistoffen binden. Het merendeel van de geïsoleerde antistoffen is gericht tegen slechts een klein stukje van ADAMTS-13, het zogenaamde 'spacer' domein. Eerdere studies suggereren dat dit domein betrokken is bij de binding van ADAMTS-13 aan VWF. Eén van de geïsoleerde antistoffen is gericht tegen een ander gebied op ADAMTS-13. Van de verschillende antistoffen worden nu grote hoeveelheden geproduceerd die gebruikt zullen worden voor functionele studies. Daarnaast zullen de geproduceerde antistoffen gebruikt worden voor het opzetten van een assay voor de detectie van circulerend ADAMTS-13.

Lopende projecten

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

Het in dit project beschreven onderzoek geeft informatie met betrekking tot de wijze waarop humane pathogene antistoffen het knippen van VWF polymeren door ADAMTS13 verhinderen. De verkregen antistoffen worden eveneens gebruikt voor het opzetten van een diagnostische bepaling voor ADAMTS-13. Naar verwachting zal het in dit project beschreven onderzoek een bijdrage leveren aan een beter begrip met betrekking tot het ontstaan van bloedplaatjes-rijke stolsels in de haarvaten van TTP patiënten met circulerende antistoffen gericht tegen ADAMTS-13.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

- Luken B.M., Turenhout E.A.M., Kaijen P.H.P., Greuter M.J., van Mourik J.A., Fijnheer R., Voorberg J. Amino acid regions 572-579 and 657-666 of the spacer domain provide a common antigenic core for binding of anti-ADAMTS13 antibodies in patients with acquired TTP. Ter publicatie aangeboden.
- Luken B.M., Kaijen P.H.P., Turenhout E.A.M., van Mourik J.A., Fijnheer R., Voorberg J. Multiple B cell clones producing antibodies directed to the spacer and disintegrin/TSR1 domains of ADAMTS13 in acquired TTP. Ter publicatie aangeboden.

Lopende projecten

2004.4 Selectie van functionele DNA-varianties met behulp van mini-gen constructen

Dr. H.L. Vos

Leids Universitair Medisch Centrum

Subsidiebedrag: € 60.158,00

Startdatum: 1 juni 2005. Looptijd: 2 jaar

Vraagstelling onderzoek

Het blijkt dat DNA-veranderingen die bijdragen aan ziekte ook in gen-gebieden kunnen liggen die niet voor een eiwit coderen, bijvoorbeeld in introns. In dit project vergelijken we het experimentele nut van mini-genen, die een gen-fragment met een intron bevatten, met een aanpak waarbij alleen het intron gekloneerd is in het luciferase-gen van de vuurvlieg. Dit laatste is eerder door ons onderzocht en heeft bepaalde voor- en nadelen. Het menselijk protrombine-gen wordt in beide gevallen als testgen gebruikt. Hoge protrombine-niveaus in het bloedplasma zijn een risicofactor voor trombose. Het protrombine-gen kan twee DNA-veranderingen bevatten die het plasmaniveau en daarmee het tromboserisico verhogen, namelijk de sterke risicofactor 20210G->A en de zwakkere 19911A->G verandering. De 19911A->G variatie is in het laatste, dertiende intron van het protrombine-gen gelegen. Het minigen-systeem is met name geschikt om de wederzijdse beïnvloeding van de twee DNA-veranderingen te onderzoeken.

Welke delen van de vraagstelling werden in de verslagperiode beantwoord?

Er zijn constructen gemaakt met daarin intron 13 geflankeerd door de volledige exons 13 en 14. Alle mogelijke combinaties van de 19911A/G verandering in intron 13 en de 20210G/A variatie op de laatste positie van intron 14 zijn hierbij gemaakt. Het gehele construct staat onder de controle van de zeer sterke cytomegalovirus promoter en bevat een kunstmatig startcodon. Hierdoor kan het gedeeltelijke protrombine-gen toch tot een eiwitje vertaald worden. Dit laatste is van groot belang om de stabiliteit van het resulterende boodschapper RNA te garanderen. Het blijkt dat de aanwezigheid van de 20210A mutatie tot een relatief veel grotere productie van rijp mRNA leidt, terwijl er aanwijzingen zijn dat de 19911G verandering de verwijdering van het intron uit het voorloper-RNA bevordert. Momenteel wordt de invloed van de 19911-variantie op de rijping van het boodschapper RNA rond de 20210-positie onderzocht, zodat duidelijk zal worden of deze twee veranderingen elkaar inderdaad beïnvloeden. Ook zullen we zo nauwkeurig mogelijk de niveaus van het (intron-bevattende) voorloper-RNA en van het rijpe mRNA bepalen.

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

Het huidige project is vooral van fundamentele aard en heeft twee hoofddoelen; ten eerste de vaststelling van de meest geschikte systemen voor het onderzoek naar niet-coderende DNA-veranderingen, met name die in



Lopende projecten

introns zijn gelegen, en ten tweede de opheldering van het moleculaire mechanisme van DNA-veranderingen die het tromboserisico verhogen. Wij verwachten in de komende jaren nog een aantal risico-genen te vinden en we willen dan het gereedschap klaar hebben liggen om in die genen de functionele verandering te identificeren en het bijbehorende werkingsmechanisme vast te stellen. Dit laatste kan van belang zijn bij risicobeheersing. We zijn al in staat geweest de opgedane kennis rond functionele niet-coderende DNA-veranderingen te gebruiken bij het ophelderen van een ander niet-coderende variatie, die in het fibrinogeen gamma gen gelegen is.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Het onderzoek naar het mini-gen systeem heeft nog niet tot een publicatie geleid.

Lopende projecten

2005.5 De rol van Amyloid in hemostase

Dr. M.F.B.G. Gebbink

Universitair Medisch Centrum Utrecht

Subsidiebedrag: € 121.500,00

Startdatum: 1 januari 2005. Looptijd: 2 jaar

Vraagstelling onderzoek

Amyloid is een verzamelnaam voor ophoping van afgedankte eiwitten in organen. Amyloid heeft een karakteristieke structuur, crossbeta, genaamd die zeer schadelijk is. Veel ziekten, waaronder de Ziekte van Alzheimer en diabetes, gaan gepaard met de vorming van amyloid. De vorming van amyloid wordt veroorzaakt doordat deze afgedankte eiwitten gaan klonteren en onvoldoende worden opgeruimd. Onze onderzoeksgroep doet onderzoek naar mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de herkenning en afbraak van eiwitaggregaten.

Wij hebben in het verleden gevonden dat tPA, het enzym dat van belang is voor het opruimen van een bloedstolsel, wordt gestimuleerd door amyloid. Verder vooronderzoek suggereerde een belangrijke rol voor de crossbeta structuur in hemostase omdat ook in een bloedstolsel deze structuur werd gevonden. Het doel van deze studie was om uit te zoeken hoe de vorming van amyloid tot stand komt en hoe deze bijdraagt aan de vorming en afbraak van een bloedstolsel.

Welke delen van de vraagstelling werden in het jaarverslag beantwoord?

Met behulp van diverse technieken hebben we kunnen onderbouwen dat zich in een bloedstolsel de crossbeta structuur vormt. Tevens hebben we vastgesteld dat het enzym (factor XII) dat verantwoordelijk is voor bloedstolling, zoals die optreedt als gevolg van contact met een lichaamsvreemd oppervlak (bijvoorbeeld glas), wordt geactiveerd door amyloid. We vonden dat in tegenstelling tot wat dusver werd aangenomen het lichaamsvreemde oppervlak niet direct het enzym activeert. Oppervlakken die stolling stimuleren blijken amyloid te induceren. Omdat de natuurlijke stimulator van het enzym nog niet bekend is, suggereren onze bevindingen dat dit enzym de eiwitaggregaten met amyloide eigenschappen herkent. Daarmee zou het een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan het opruimen van dergelijke ophopingen. tPA en factor XII lijken sterk op elkaar en blijken dus beide te binden aan amyloid. We zijn in staat gebleken om uit te zoeken welk deel van het eiwit hierbij betrokken is. Dit bleek het zogenaamde 'vinger' domein te zijn. In samenwerking met het Academisch Ziekenhuis Groningen konden we verhoogde bloedspiegels aantonen in bloed van patiënten met een amyloid gerelateerde ziekte. Onze resultaten ondersteunen het concept amyloid een belangrijke rol speelt bij hemostase. In het vervolgonderzoek proberen we amyloid te bepalen in het bloed van patiënten met (een verhoogde kans op) trombose. Daarnaast zullen we op basis van onze nieuwe kennis nieuwe middelen testen om trombose te voorkomen. De eerste resultaten suggereren dat het 'vinger' remmend werkt.

Lopende projecten

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

Bij veel ziektebeelden, zoals diabetes, bacteriële infecties, kanker, en uiteraard aderverkalking treden trombotische complicaties op. De oorzaak van deze complicaties wordt slecht begrepen. Er zijn sterke aanwijzingen dat activatie van twee serine proteases die in het bloed voorkomen een belangrijke rol spelen. Het onderzoeksproject is erop gericht om de oorzaak van de activatie van deze twee eiwitten op te helderen. Wij hebben inmiddels gevonden dat deze twee eiwitten worden gestimuleerd door amyloid; eiwitklonten die bij veel ziekten, zoals de ziekte van Alzheimer en diabetes, veel schade veroorzaken. Deze resultaten hebben nieuw inzicht verschaft in het ontstaan van trombose. Op basis van ons onderzoek kan nieuwe therapie worden ontwikkeld om de kans op trombotische complicaties bij deze ziektebeelden te verminderen.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Het onderzoek heeft nog niet tot publicaties geleid.