

Wetenschappelijk jaarverslag

De onderwerpen waarover verslag wordt gedaan zijn complex. De wetenschappers hebben er echter naar gestreefd het resultaat zo helder mogelijk weer te geven.

Afgeronde projecten

Projectnummer: 2004-2

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

Vraagstelling onderzoek

Factor VIII (FVIII) is belangrijk voor het goed functioneren van het bloedstollingsysteem. Een verhoogde bloedspiegel van FVIII vergroot echter de kans op trombose. Informatie over de mechanismen die het niveau van FVIII in het bloed reguleren is daarom onmisbaar. Een eiwit dat het FVIII-niveau sterk beïnvloedt is von Willebrand factor (vWF). vWF vormt in het bloed een hecht complex met FVIII en voorkomt op deze wijze een snelle verwijdering van FVIII uit de circulatie. Recent hebben wij vastgesteld dat de celreceptoren LRP en LDL-receptor (LDLR) direct betrokken zijn bij dit verwijderingsproces. Verder bleek dat vWF de binding van FVIII aan deze receptoren effectief blokkeert.

Ondanks deze beschermende werking van vWF, wordt FVIII niettemin via LDLR en LRP verwijderd uit de circulatie. Dit gegeven impliceert het bestaan van een mechanisme dat de beschermende werking van vWF kan opheffen. Of dit zo is, en zo ja, hoe dit plaatsvindt zijn belangrijke vragen binnen ons onderzoek.

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

Om de rol van vWF in het verwijderingsmechanisme van FVIII te onderzoeken, maken wij gebruik van fluorescerende varianten van FVIII. De opname van FVIII door cellen, waarop LRP of LDLR aanwezig is, kunnen wij hierdoor nauwgezet volgen. In aanwezigheid van vWF bleek de opname van FVIII door de cellen niet plaats te vinden.

Dit is in overeenstemming met onze eerdere vondst dat vWF de binding van FVIII aan LRP en LDLR blokkeert. vWF verhinderde echter niet de LRP/LDLR onafhankelijke binding van FVIII aan het oppervlak van de cel. Het kunnen opheffen van de bescherming van FVIII door vWF op het celoppervlak is dus mogelijk de sleutel in het verwijderingsmechanisme van FVIII. Door anderen is eerder vastgesteld dat vWF veel verschillende vormen (conformaties) kan aannemen in het bloed. Een conformatieverandering van gezuiverd vWF kan buiten het lichaam in gang worden gezet door de niet-lichaamseigen stof ristocetine.

In aanwezigheid van ristocetine bleek nu dat vWF niet meer in staat was de opname van FVIII door cellen te blokkeren. Dit betekent dat de beschermende werking van vWF voor FVIII wordt opgeheven wanneer vWF van conformatie verandert. Een lichaamseigen proces dat een conformatieverandering van vWF kan teweegbrengen lijkt dus de onbrekende schakel in het FVIII verwijderingsmechanisme. Mogelijk zijn er gespecialiseerde cellen in het lichaam aanwezig die specifiek voor deze taak zijn toegerust. Welke cellen dit zijn, zal in een vervolgonderzoek moeten worden vastgesteld.

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

1. Effective Factor VIII Endocytosis Is under Conformational Control of von Willebrand Factor. Alexander B. Meijer, Sigrid D. Roosendaal, Bas de Laat, Maartje van den Biggelaar, Vincent Limburg, Carmen van der Zwaan, Kees W. Rodenburg, Koen Mertens. *Blood* (2007) 110, abstract ASH 1767.
2. The Factor VIII C1 Domain Contributes To Efficient LRP/LDL Receptor Binding. Alexander B. Meijer, Vincent Limburg, Henriët Meems, Carmen van der Zwaan, Koen Mertens *J Thromb Haemost* (2007) 5, Supplement 2: abstract ISTH P-M-040.



Projectnummer: 2004-3

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

Projectleider: dr. J. Voorberg

Instelling: Sanquin Research

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 onder verschillende experimentele condities. 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.

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. (2007) Antibodies against the CUB1-2 domains of ADAMTS13 in a patient with benign monoclonal gammopathy. *Haematologica* 92, e74-76.
5. Pos W, Luken BM, Kremer-Hovinga JA, Turenhout EA, Scheiflinger F, Dong J-f, Fijnheer R en Voorberg J. Human antibodies with specificity for the spacer domain of ADAMTS13 are derived from VH1-69 germline genes. Ter publicatie aangeboden.

Projectnummer: 2004-4

Titel project: Selectie van functionele DNA-variaties met behulp van mini-gen constructen

Projectleiders: dr. Hans L. Vos en
dr. Marieke C.H. de Visser

Instelling: subafdeling Trombose en
Hemostase, Eindhoven Laboratorium voor
Experimentele Vasculaire Geneeskunde,
Leids Universitair Medisch Centrum

Vraagstelling onderzoek

Het wordt steeds duidelijker dat de kans op veel zogenaamde ouderdomsziekten (reuma, suikerziekte, vaatlijden) gedeeltelijk door variatie in genen wordt bepaald. Ook voor trombose is dat het geval. Wij proberen momenteel nieuwe risicogenen op te sporen binnen de GIFT-studie (Genetica In Familiaire Trombose). Binnen een risicogen kunnen echter een aantal gezamenlijk overervende veranderingen optreden, wat de identificatie van de verantwoordelijke DNA-variant bemoeilijkt. Doel van het huidige project was om het gebruik van mini-genen hiervoor te onderzoeken. Mini-genen zijn genfragmenten die bij voorkeur slechts één verandering bevatten en functioneel getest kunnen worden. Door de effecten van een variant te vergelijken met het normale DNA kan het effect van de variant op de gen-functie onderzocht worden. Als modelveranderingen hebben we gekozen voor de zeer milde 19911A/G-variatie in het protrombinegen en voor een ernstige verandering in het Proteïne C-gen.

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

In het verslagjaar hebben we ons vooral geconcentreerd op de DNA-verandering in het Proteïne C-gen. Deze verandering is verantwoordelijk voor een ernstig tekort van het antistollingseiwit Proteïne C in de patiënt, waarschijnlijk door een onvolledige rijping van het boodschapper RNA.



Dit zorgt voor de vertaling van een gen in een eiwit. Voor het mini-gen werd een aanzienlijk deel van het Proteïne C-gen gebruikt. Tot onze verrassing bleek dat dit gedeelte niet normaal kon functioneren, ondanks het feit dat het een aantal voor de RNA-rijping essentiële gebieden van het gen (exons en introns) bevatte. Eén van de drie introns kon niet, zoals gebruikelijk is, uit het RNA verwijderd worden. Pas na verdere uitbreiding van het Proteïne C mini-gen kon normale rijping worden waargenomen. Dit heeft ons geleerd dat introns, waarvan vaak wordt aangenomen dat ze min of meer onafhankelijk functioneren, voor een correcte rijping vaak toch afhankelijk zijn van andere, niet direct flankerende delen van het RNA.

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

Het verkregen resultaat heeft ons voorzichtiger gemaakt ten aanzien van het gebruik van mini-genen voor het vinden van ziekteveroorzakende DNA-veranderingen.

Dit betekent concreet dat we voor het testen van functionele veranderingen niet op slechts één systeem kunnen vertrouwen, maar verschillende testsystemen moeten gebruiken. We hebben binnen ons laboratorium al een alternatief systeem ontwikkeld, dat gebruikmaakt van zogenaamde luciferase reporter-genen. Deze test is op een iets ander principe gebaseerd, waardoor ze ook in het geval van een onvolledige rijping van het boodschapper-RNA een werkbaar resultaat opleveren. Beide systemen kunnen voor allerlei ziektes worden ingezet en zijn daarmee uiteraard ook geschikt voor het onderzoek van trombose. We hopen met deze systemen in de komende jaren nog diverse DNA-veranderingen te karakteriseren, die het tromboserisico verhogen.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

Een samenvatting van het protrombinedeel van ons werk is door middel van een voordracht gepresenteerd op de twee jaarlijkse meeting 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. Manuscripten over de protrombine-constructen en de Proteïne C-verandering zijn in voorbereiding.



Projectnummer: 2005-2

Titel project: De rol van vitamine K in stabiliteit van stolling
 Projectleider: dr. F.J.M. van der Meer
 Instelling: Leids Universitair Medisch Centrum

Vraagstelling onderzoek

Vitamine K is nodig voor het maken van stollingseiwitten. De werking van antistollingsmiddelen berust op remming van hergebruik van vitamine K in het lichaam. De stollingseiwitten in het bloed kunnen nu minder goed gemaakt worden en het bloed stolt minder goed. Het gevolg is minder kans op trombose.

Het antistollingseffect (de INR) kan echter sterk wisselen. Bij een te lage INR stolt het bloed nog te veel met meer kans op trombose. Een te hoge INR verhoogt de kans op bloedingen. De hoeveelheid vitamine K die we met de voeding opnemen in ons lichaam verschilt van dag tot dag. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat mensen die weinig vitamine K eten 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 de schommelingen in de INR kunnen verminderen en dus de antistolling stabiel kan worden door mensen die antistollingsmiddelen gebruiken elke dag extra vitamine K te laten gebruiken.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

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

De groep die de extra vitamine K had gekregen bleek minder schommelingen in de INR te hebben dan de groep die de placebo had gekregen. Patiënten die extra vitamine K hadden gebruikt waren 90% van de tijd binnen de INR streefwaarden terwijl de mensen in de placebogroep 86% van de tijd binnen de INR-streefwaarden waren. Zowel lage als hoge INR uitslagen kwamen iets minder voor bij de vitamine K-gebruikers.

De conclusie van het onderzoek is dus dat het inderdaad mogelijk is de schommelingen in de INR te verminderen door een kleine hoeveelheid extra vitamine K te gebruiken tijdens antistollingsbehandeling.

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

Hoewel al lange tijd bekend is dat de voeding invloed heeft op de behandeling met antistollingsmiddelen, ontbreken tot op heden praktische adviezen aan patiënten. Het geven van extra vitamine K aan mensen die worden behandeld met antistollingsmiddelen lijkt een effectieve manier om de stabiliteit van antistolling te vergroten. De effectiviteit en de veiligheid van de behandeling met antistollingsmiddelen zullen hierdoor naar alle waarschijnlijkheid toenemen.

Voordat het geven van extra vitamine K daadwerkelijk in de dagelijkse praktijk kan worden toegepast moet met verder onderzoek aangetoond worden dat niet alleen de schommelingen in de INR verminderen maar dat ook het aantal tromboses en bloedingen minder wordt.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

1. Rombouts EK, Rosendaal FR, van der Meer FJM. The effect of vitamin K supplementation on anticoagulant treatment. *J Thromb Haemost.* 2006; 4:691-692.
2. Rombouts EK, Rosendaal FR, van der Meer FJM. Daily vitamin K supplementation improves anticoagulant stability. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2043-2048.



Projectnummer: 2005-3

Titel project: 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, en dat kan 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 hiervoor 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 zou 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 trombose risico?
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 twee 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 mensen jonger dan 65 jaar hebben degenen met een hoge bloeddruk ook veel FVIII. In 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 trombosegevallen.

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.



Projectnummer: 2006-1

Titel project: Zijn trombosegerelateerde antifosfolipiden antistoffen ook pathogeen?

Projectleider: Bas de Laat

Instelling: Sanquin, afdeling Plasma Eiwitten

Vraagstelling onderzoek

Het antifosfolipidensyndroom kenmerkt zich door herhaaldelijke episodes van trombose en (bij vrouwen) herhaaldelijke miskramen. Naast deze symptomen moeten er om de diagnose antifosfolipidensyndroom te kunnen stellen ook specifieke autoimmuun-antistoffen in het bloed aanwezig zijn. De huidige studie heeft als doel duidelijkheid te verschaffen in het pathogene karakter van antifosfolipiden antistoffen.

Nog steeds is er onduidelijkheid over welke antistoffen wel een risico op trombose met zich meebrengen en welke niet. Het polyklonale karakter (meerdere soorten antistoffen in een patiënt) van antifosfolipiden antistoffen is een van de belangrijkste redenen voor het ontbreken van een consensus wat betreft het ziekmakende vermogen van antifosfolipiden antistoffen. Antifosfolipiden antistoffen herkennen verschillende plasma-eiwitten. Er wordt nu verondersteld dat antistoffen tegen het eerste deel van plasma eiwit beta2-glycoproteïne I het beste is geassocieerd met trombose. Maar doordat in 1 patiënt verschillende antistoffen aanwezig zijn, is dit niet zeker.

Door middel van het apart construeren en testen van de verschillende antistoffen afkomstig van 1 patiënt (getest voor meerdere patiënten) zullen we met meer zekerheid kunnen zeggen welke antistoffen het ziekmakende vermogen hebben.

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

Op basis van de uitkomst in verschillende testen waarmee de antifosfolipiden antistoffen worden gedetecteerd, hebben we enkele patiënten geselecteerd. Uit het bloed van deze patiënten zijn de cellen geïsoleerd die verantwoordelijk zijn

voor het maken van de antistoffen. Uit reeds 3 patiënten is het genetisch materiaal geïsoleerd dat codeert voor de antistoffen. Van 2 patiënten is nu een bank (library) aangelegd. Na een aantal stappen zijn er antistoffen geproduceerd en geselecteerd die heel beta2-glycoproteïne I herkennen (ongeacht waar op het eiwit) en antistoffen die specifiek domein I (eerste gedeelte, trombosegerelateerd) van beta2-glycoproteïne I herkennen. We hebben gevonden dat binnen 1 patiënt zowel cellen aanwezig zijn die antistoffen maken die domein I herkennen als andere gedeeltes van beta2-glycoproteïne I. Verder is het interessant dat tot nu toe alle beta2-glycoproteïne I herkende antistoffen kunnen worden gedifferentieerd van alle domein I herkende antistoffen gebaseerd op het genetisch materiaal.

Ondanks het beëindigen van de subsidie zal de komende maanden dit onderzoek worden voortgezet om ook de andere vragen te beantwoorden.

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

Door middel van het karakteriseren van verschillende antilichamen afkomstig van antifosfolipidenpatiënten hebben we reeds meer inzicht gekregen in de immunologie van het antifosfolipidensyndroom. We hebben sterke aanwijzing dat door middel van het genetisch materiaal (toekomstige) patiënten beter kunnen diagnosticeren. Doordat we het onderzoek nog voortzetten kunnen we in de nabije toekomst het project afsluiten waarna we met zekerheid kunnen zeggen hoe en welke antistoffen trombose kunnen veroorzaken. Hierdoor ontstaan er mogelijk nieuwe aanknopingspunten voor onderzoek naar het ontstaan van antifosfolipiden antistoffen doordat we dan mogelijk weten wat de echte trombosegerelateerde antistoffen zijn.

Verder is er reeds belangstelling getoond door diagnostische bedrijven naar de patiëntenafgeleide monoklonale antistoffen. Door deze antistoffen als controle te gebruiken in diagnostische testen zal dit de specificiteit voor trombose verhogen, en assays van verschillende bedrijven homogeniseren.



De resultaten van het uitgevoerde onderzoek leveren een bijdrage aan het verbeteren van de diagnostiek van antifosfolipidengerelateerde trombose. Op termijn kan hierdoor mogelijk de behandeling van deze groep patiënten verder geoptimaliseerd worden.

Literatuurpublicaties

N.v.t.

Lopende projecten

Projectnummer: 2004-1

Titel project: Modulatie van de lysofosfatidaat 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

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 lysofosfatidaat (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/drugtherapie kan de accumulatie van dit vet in de plaque worden verminderd, wat het bloedstollingsbevorderende 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 worden onderzocht.

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

In het afgelopen jaar heeft drs. Bot, AIO op dit project, gewerkt aan vier deellijnen:

- 1) Nu aangetoond is dat het LPA-gehalte van de atherosclerotische plaque zowel in de muis als in de mens toeneemt gedurende het ziekteproces hebben we in 2007 onderzocht wat het effect hiervan zou zijn op het ziekteproces in een muizenmodel voor atherosclerose. LPA werd daarbij toegediend via injectie in de buikholte

of ter plekke van de atherosclerotische plaque. De eerste strategie resulteerde zoals verwacht in verhoogde LPA-bloedspiegels en bevorderde daarnaast de ontwikkeling van een instabiele plaque. Lokale toediening van LPA ter plekke van de plaque bleek ook te leiden tot een verslechtering van de plaquestabiliteit en zelfs tot bloedingen in de plaque. Dit is deels terug te voeren op een verhoogde activering van mestcellen in het vaatweefsel, aangezien de effecten niet optraden na toediening van een farmacologische activatieremmer van mestcellen. Dit zou erop kunnen wijzen dat lokale medicamenteuze remming van LPA perspectief zou kunnen bieden voor verbetering van de stabiliteit van de plaque. Deze resultaten staan beschreven in een manuscript dat ter beoordeling is uitgestuurd (1).

2) Uit eerder onderzoek was al gebleken dat LPA verhoogd aanwezig is in de plaque. In vervolgonderzoek hebben we door middel van lipidomicatechnologie aan weten te tonen dat vooral die varianten van LPA in de plaque ophopen die een hoge capaciteit bezitten tot plaatjesactivatie. Met deze bevinding hebben we dit studiedoel inmiddels ook afgerond en een manuscript waarin onze bevindingen beschreven staan is inmiddels opgesteld (2).

3) Tevens is een studie uitgevoerd naar de effecten van een op LPA gelijkend vetmolecuul, sphingosine 1-phosphate (S1P). In 2006 hadden we al laten zien dat toediening van een S1P analoog, FTY720, een gunstig effect sorteerde op de plaqueontwikkeling, zonder de trombose negatief te beïnvloeden (3,4). In 2007 is onderzoek verricht naar een afbraakenzym voor S1P. Een muizenstam is gegenereerd waarin bloedcellen dit enzym missen. Dit gebrek vertaalde zich in een aanzienlijke verhoging van de S1P-concentratie; niet alleen in het bloed maar ook in diverse lymfeweefsels. De plaqueontwikkeling in de muizen bleek aanzienlijk vertraagd, hetgeen deels te wijten was aan een verlaging van de cholesterolconcentratie in het bloed en deels aan een selectieve onderdrukking van het immuunsysteem. De resultaten worden momenteel gecompileerd tot een manuscript (5).

4) Ten slotte wordt er op dit moment onderzoek verricht aan virale vectoren die sleutelfactoren in de aanmaak van LPA kunnen stimuleren of onderdrukken. Onze studies hebben laten zien dat niet alle factoren die we in (2) geïdentificeerd hadden als relevant, geschikt zijn als target. De meest veelbelovende kandidaat voor LPA-interventie lijkt ons op dit moment phospholipase D (autotaxine), een LPA-producerend enzym met een breed werkingsprofiel, dat wordt uitgescheiden door diverse cellen in de plaque en ook in de bloedbaan terecht kan komen. Deze vector is al getest op functionaliteit en wordt op het moment toegepast in beschikbare muizenmodellen teneinde de rol van het betreffende enzym te bepalen in de opstapeling van LPA in en de trombogeniciteit van de plaque te bepalen. Voor dit laatste zijn we een samenwerking aangegaan met dr. Van Heemskerck (Maastricht) die over een model beschikt voor atherotrombose-onderzoek.

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

Onze studie naar de effecten van LPA toont aan dat vooral lokale blootstelling van hoogrisico-weefsels zoals de atherosclerotische plaque aan LPA de gevoeligheid voor plaatjesaggregatie en bloedingen negatief lijkt te beïnvloeden. Verder blijkt ook dat er in de plaque ophoping plaatsvindt van varianten van LPA die in hoge mate in staat zijn tot plaatjesactivatie. Daarnaast toont onze studie aan dat verandering van het metabolisme van het gerelateerde lipide S1P anders dan verwacht hoegenaamd niet tot veranderingen leidt in plaatjesfunctie, maar wel in cholesterolmetabolisme en het immuunsysteem.

Literatuurpublicaties

Full papers:

1. Bot M, Bot I, Lopez-Vales R, Saulnier-Blache JS, Van De Lest CHA, Helms JB, David S, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Atherosclerotic Lesion Progression Changes Lysophosphatidic Acid Homeostasis to Favor Its Accumulation. Manuscript in preparation.



2. Bot M, Bot I, De Jager SCA, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophosphatidic Acid: a Two-Faced Key Actor in Atherogenesis. Manuscript in preparation.
3. 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).
4. Bot M, Nofer JR, Van Berkel TJC, Biessen EAL. Lysophospholipids: edging up towards atherosclerosis. *Future Lipidol*. 2007; 2(3): 341-356.
5. Bot M, Bot I, Westra M, De Jager SCA, Van Berkel TJC, Van Veldhoven PP, Nofer JR, Biessen EAL. Haematopoietic Absence of Sphingosine-1-Phosphate Lyase Decreases Atherosclerotic Lesion Development in LDL-Receptor Deficient Mice. Manuscript in preparation.

Published abstract:

1. 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).
2. 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).
3. 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: 2004-5

Titel project: 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 ongewenst vormen van bloedstolsels, bestaand uit onder andere 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 aderverkalking 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 bijvoorbeeld 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 door middel van 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- β 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

1. 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]
2. 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 project: The role of the endothelial cell protein C receptor in the regulation of coagulation and inflammation

Projectleider: prof dr. T. van der Poll en prof. dr. M.M. Levi

Instelling: Academisch Medisch Centrum (AMC); Center for Infection and inflammation (CINIMA), Center for Experimental and Molecular Medicine (CEMM)

Vraagstelling onderzoek

Bij ernstige ontstekingen zoals een longontsteking of bloedvergiftiging wordt de bloedstolling geactiveerd. Hoe meer bloedstolling bij een patiënt met een dergelijke ontsteking, hoe groter de kans is om te overlijden.

Proteïne C (PC) is een eiwit met een sterk antistollende werking. Hiernaast lijkt het ook direct actief tegen ontstekingen. PC moet om werkzaam te kunnen zijn eerst worden geactiveerd. Het geven van geactiveerd proteïne C (APC) als medicijn aan patiënten met een ernstige ontsteking, blijkt de kans om te overlijden te verkleinen. De rol en het belang van door het lichaam zelf gemaakt APC is echter nog niet bekend. Voor de activering van PC is een bepaald eiwit genaamd de endotheliale PC receptor (EPCR) van belang. 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. Ondanks het belang van de EPCR voor de vorming van APC is over de rol van EPCR in ontsteking nog weinig bekend.

Onze onderzoeksgroep heeft al veel onderzoek gedaan op het grensgebied van bloedstolling en ontsteking. 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.

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

We hebben onderzocht of de aanwezigheid van veel of juist geen EPCR op de bloedvatwand tot verschillende uitkomsten in longontsteking leidt. Dit lijkt niet het geval te zijn: dieren met veel of geen EPCR hebben evenveel bacteriën in de longen en evenveel ontsteking na 48 uur. Toch heeft het hebben van geen of juist heel veel EPCR op de bloedvatwand wel invloed op de hoeveelheid stolling in de long tijdens longontsteking. Dat APC toch een belangrijke rol speelt, maar misschien vooral in de bloedbaan en minder in de long, blijkt uit proeven waarin we muizen PC hebben weggevangen; muizen met veel minder APC in de long en in de bloedbaan hebben minder bacteriën in de bloedbaan.

Omdat het medicijn APC vooral wordt gegeven aan mensen die bij hun longontsteking een bloedvergiftiging hebben en omdat de rol van stolling tijdens bloedvergiftiging mogelijk heel anders is dan tijdens longontsteking, hebben we ook onderzocht of het hebben van veel EPCR invloed heeft als je muizen direct inspuit met bacteriën. In dit model blijkt EPCR wel degelijk van groot belang; meer EPCR op de bloedvatwand geeft meer uitgroei van de bacteriën, mogelijk omdat de afweerreactie door EPCR teveel wordt gedempt. Of dit inderdaad de achterliggende oorzaak wordt momenteel onderzocht. Ook onderzoeken we hoe de bloedstolling zich gedraagt in dit model. Verder gaan we bekijken wat het effect is van veel EPCR los in de bloedbaan en of dit hetzelfde werkt als of juist tegengesteld aan veel EPCR op de bloedvatwand. Ook gaan we mogelijk kijken wat nu het effect is van het toedienen van APC als er heel veel EPCR aanwezig is. Hierover zijn nog geen gegevens bekend. Verder wordt het nu interessant te kijken naar de rol van EPCR in bloedvergiftiging die door andere soorten bacteriën wordt veroorzaakt.



In een model van een andere ernstige ontsteking, namelijk buikvliesontsteking, bleek de EPCR ondanks een eerste veelbelovend experiment, niet duidelijk van belang te zijn. Momenteel onderzoeken we hoe de bloedstolling zich gedraagt in dit model.

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 stollingsactivatie kan dermate fors zijn, dat de patiënt er zelfs aan overlijdt. Kennis over de samenhang tussen ontsteking en bloedstolling is van belang, niet alleen om stollingsfactoren op het spoor te komen die een rol spelen in ontsteking, maar ook om te begrijpen hoe de bloedstolling op zijn beurt wordt beïnvloed door ontsteking. 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 en overmatige ontsteking in infectieziekten, maar zou ook kunnen leiden tot betere behandeling van trombose buiten de setting van ontsteking.

Literatuurpublicaties

De meeste genoemde onderzoeken zijn nog niet helemaal ‘af’ en derhalve is er nog geen sprake van volledige publicaties met originele data. Wel zijn enkele van de data gepubliceerd als abstract en voor een posterpresentatie of orale presentatie geselecteerd op congressen en wetenschappelijke vergaderingen en zijn van onze hand twee reviews gepubliceerd over de samenhang tussen trombose en ontsteking.

Publicaties:

Schouten M, Wiersinga WJ, Levi M, Van der Poll T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol.* 2008 Mar;83(3):536-45. Epub 2007 Nov 21.
Hofstra JJ, Schouten M, Levi M. Thrombophilia and outcome in severe infection and sepsis. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Sep;33(6):604-9. Review.

Abstract & orale presentatie:

Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion reduces bacterial dissemination in murine pneumococcal pneumonia but aggravates systemic pneumococcal disease. Nederlandse Vereniging voor Trombose en Hemostase, Koudekerke, Apr 2008.

Schouten M, Van 't Veer C, Esmon CT, Levi M, Van der Poll T. Protein C depletion transiently enhances bacterial outgrowth and inflammation but does not impact on survival in *E. coli* peritonitis. Internistendagen, Maastricht, Apr 2008.

Abstract & posterpresentatie:

Schouten M, Van 't Veer C, Levi M, Esmon CT, Van der Poll T. Endogenous protein C inhibits pulmonary coagulation but facilitates bacterial dissemination in the early phase of pneumococcal pneumonia in mice. International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH), Geneva, Jul 2007.



Projectnummer: 2005-4

Titel project: Factor VII activating protease (FSAP): functional implications of the 'Marburg-1' polymorphism
Projectleider: Prof. dr. K. Mertens
Instelling: Stichting Sanquin Bloedvoorziening

Vraagstelling onderzoek

Het 'Factor Seven Activating Protease' (FSAP) is een in bloed voorkomend eiwit dat in 1996 ontdekt is. De functie ervan is onduidelijk. Sommige onderzoekers rapporteerden een rol bij het opruimen van stolsels in de bloedbaan (de fibrinolyse). Anderen vonden een stimulerend effect op de bloedstolling, door middel van de activering van stollingsfactor VII. Hierdoor heeft het eiwit de naam FSAP gekregen. Sindsdien hebben andere onderzoekers weer andere biologische effecten gevonden, zoals een regulerende rol bij vorming van atherosclerotische plaques.

44

Het 'Marburg-1' polymorfisme is een mutatie in het gen dat voor FSAP codeert. Deze komt bij ongeveer 5-10% van de westerse bevolking voor. In die gevallen circuleert een variant van FSAP in het bloed. Welke consequenties dit heeft is onduidelijk. Immers, zolang de biologische rol van het 'normale' FSAP onzeker is, valt niet te voorspellen wat het belang van de Marburg-1 mutatie kan zijn. Deze vragen vormen het uitgangspunt van dit project.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

De eerste vraag betreft de rol van FSAP. Het is bijzonder lastig FSAP in zuivere vorm uit bloed te isoleren. Daardoor bleef onduidelijk of de in de literatuur beschreven effecten wel toegeschreven konden worden aan FSAP zelf, of aan een verontreiniging ervan. Daarom hebben wij gebruik gemaakt van recombinant FSAP dat in zoogdiercellen geproduceerd is. Dit FSAP werd volledig gezuiverd en daarna omgezet in de geactiveerde vorm ervan. Tot onze verrassing bleek geactiveerd recombinant FSAP in het geheel niet in staat te zijn om gezuiverd factor VII te activeren.

Onder extreme condities kon het echter wel factor VII in kleinere fragmenten knippen. Dit leidt niet tot activering, maar juist tot inactivering van factor VII. Evenmin leidde toevoeging van geactiveerd FSAP aan bloedplasma tot een versnelling van de vorming van het stollingsenzym trombine. Een rol van FSAP in de stollingscascade is daarmee uiterst onzeker geworden. Wel vonden wij aanwijzingen dat FSAP de binnenkant van de vaatwand (het endotheel) kan activeren. Ook is een rol in de fibrinolyse nog mogelijk.

De tweede vraag betreft het effect van de Marburg-1 mutatie. Deze variant van FSAP is ook als recombinant eiwit geproduceerd. In overeenstemming met onze werkhypothese bleek deze variant van FSAP verminderd actief te zijn. In hoeverre dit implicaties heeft voor de eventuele rol van FSAP in de fibrinolyse en als activator van endotheel is nog onduidelijk. Dit staat centraal in de laatste fase van dit project.

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

Onze bevinding dat FSAP, anders dan de naam suggereert, geen relevante factor VII activator lijkt te zijn, is niet alleen verrassend, maar heeft ook belangrijke consequenties. Immers, daarmee heeft ook de Marburg-1 variant zijn relevantie voor de stollingscascade grotendeels verloren. Dit verklaart ook waarom diverse klinische studies tot nu toe geen verband konden aantonen tussen het Marburg-1 polymorfisme en het risico op trombose. Het is echter nog te vroeg om te concluderen dat FSAP en trombose niets met elkaar te maken hebben. Immers, een effect op de fibrinolyse en op de vaatwand kunnen in dit kader ook belangrijk zijn. In de resterende fase van het project hopen wij daarover meer te leren.

Literatuurpublicaties

Stavenuiter F, et al., The Marburg-1 mutation reduces the autocatalytic activity of Factor Seven Activating Protease (FSAP) J. Thromb. Haemostasis 2007, 5 Suppl. 2, Abstract O-W-088.



Projectnummer: 2006-2

Titel project: Generating and characterization of multiplex assays for coagulation and fibrinolytic parameters
Projectleider: Dr. J.C.M. Meijers
Instelling: Academisch Medisch Centrum

Vraagstelling onderzoek

Verhoogde niveaus van stollingsfactoren zijn risicofactoren voor veneuze en arteriële trombose. Het belang van screening van trombosepatiënten voor de verschillende stollingsfactoren is echter onduidelijk. Aangezien de stollingsfactoren onderdeel uitmaken van het stollingsstelsel waarin de componenten elkaars functie kunnen beïnvloeden, zijn grote studies nodig die alle factoren kunnen bepalen. Met de huidige testen is dat moeilijk, omdat die bewerkelijk zijn en relatief grote hoeveelheden bloed nodig hebben. Daarom willen we in het huidige onderzoek testen opzetten en karakteriseren om stollingsfactoren te kunnen bepalen in een multiplex opzet. Dat betekent dat er in één test meerdere stollingsfactoren tegelijkertijd uit één monster worden bepaald. Met behulp van deze nieuwe multiplex testen wordt het mogelijk om belang en samenhang van bekende risicofactoren te verduidelijken, en (nieuwe) risicofactoren voor veneuze en arteriële trombose te identificeren.

Welke delen van de vraagstelling werden in het verslagjaar beantwoord?

In dit jaar (8 maanden onderzoek) werden assays overgezet op het bead-systeem dat gebruikt wordt voor het multiplex systeem. De eerste factoren die getest zouden worden zijn die van het antistollingsstelsel en daarvan kwamen de volgende factoren in aanmerking: totaal en vrij proteïne S, C4b-bindingseiwit, proteïne C, proteïne C inhibitor, proteïne Z, tissue factor pathway inhibitor en proteïne Z-afhankelijke protease inhibitor. De verschillende testen werden individueel opgezet. Hierna werden de testen in verschillende combinaties bij elkaar gebracht. Hieruit bleek dat een aantal factoren niet met elkaar te combineren viel omdat de antistofcombinaties niet samengingen of

omdat er voor de test een andere verdunning gebruikt moest worden van het te testen plasma. De uiteindelijk opgezette multiplex test kon de volgende factoren analyseren: proteïne C, proteïne C inhibitor, totaal proteïne S en vrij proteïne S. Deze multiplex test werd gevalideerd en daaruit bleek dat de test niet goed reproduceerbaar was. Variaties tot 50% kwamen voor, en dat is onacceptabel voor implementatie in de praktijk. Door de compositie van buffers te veranderen en aanpassingen te maken in andere testvariabelen zal in het resterende deel van het onderzoek getracht worden om de testvariatie te reduceren.

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

Met behulp van multiplex testen wordt het mogelijk om belang en samenhang van bekende risicofactoren te verduidelijken, en nieuwe risicofactoren voor veneuze en arteriële trombose te identificeren.

Literatuurpublicaties tot en met het jaarverslag

N.v.t.

