

Cover Page



Universiteit Leiden

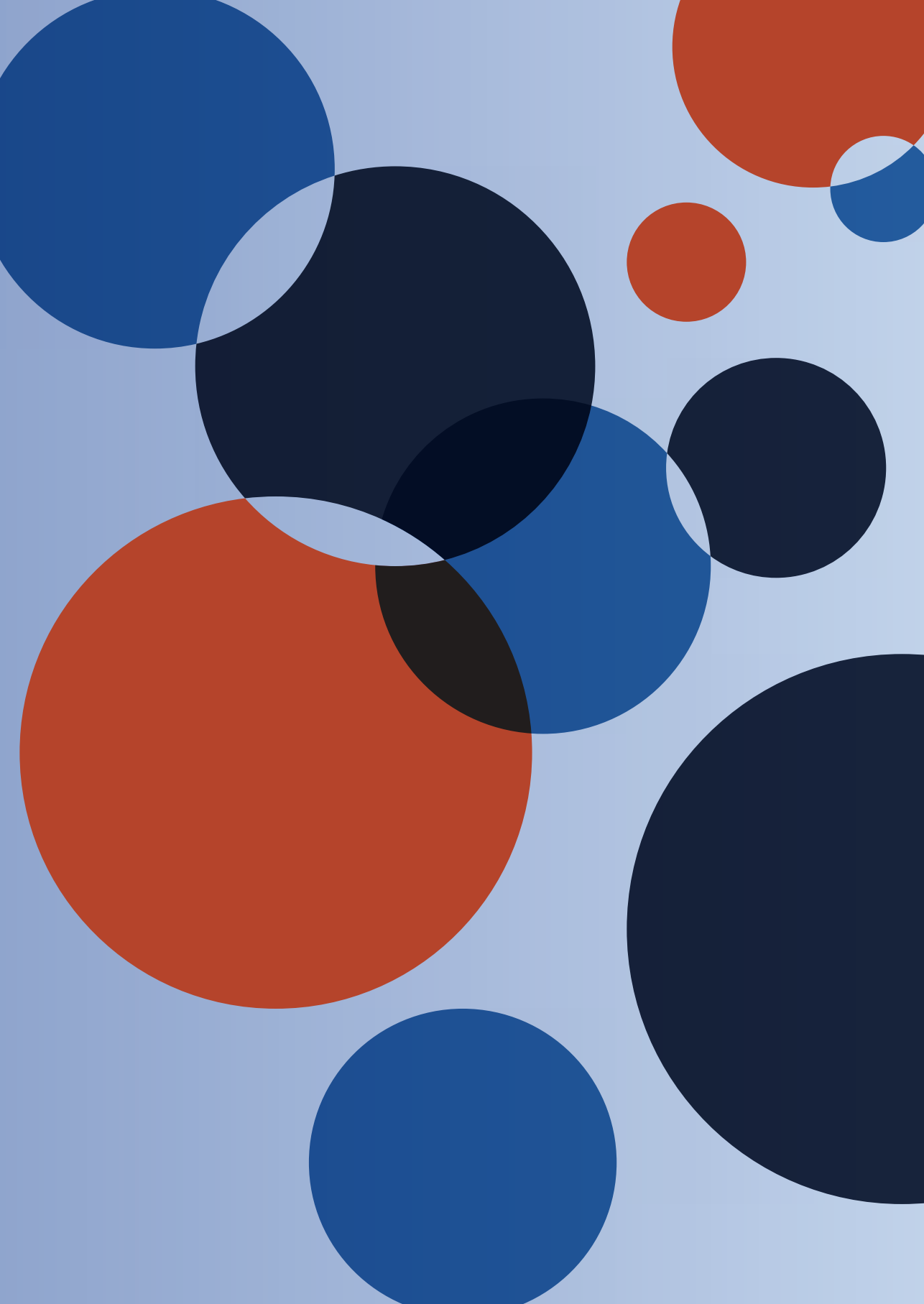


The handle <http://hdl.handle.net/1887/138822> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Tilburg, J.

Title: The role of solute carrier family 44 member 2 in the pathophysiology of venous thrombosis

Issue date: 2021-01-07



NEDERLANDSE SAMENVATTING

7

Het bloedstollingsstelsel in ons lichaam is van cruciaal belang gezien dit er voor zorgt dat bloedverlies beperkt blijft bij beschadigingen van de vaatwand. De bloedstolling, ook wel hemostase genoemd, is een zeer complex proces waarbij verschillende componenten betrokken zijn waaronder de vaatwand, bloedplaatjes en stollingsfactoren. Een balans tussen pro en anti-stollingsfactoren is hierbij essentieel en een verstoring in deze balans kan zorgen voor bloedingen dan wel overmatige stolling dit laatste wordt ook wel trombose genoemd. Trombose kan in zowel slagaderen als in venen voorkomen, maar dit proefschrift richt zich op veneuze trombose. Deze ziekte heeft een incidentie van 1-2 personen per 1000 mensen per jaar en heeft daarmee een grote weerslag op de gezondheidszorg. Patiënten met veneuze trombose, en ook mensen met een verhoogd risico voor het krijgen van deze ziekte, worden vaak (preventief) behandeld met anticoagulantia. Deze behandelingen zijn echter niet zonder risico, nu deze inspelen op de stolling en daarom kunnen leiden tot bloedingen. Verder onderzoek naar veneuze trombose is nodig, om nieuwe inzichten te verkrijgen in de pathofysiologie en om daarmee te komen tot eventuele nieuwe therapieën zonder bloedingsrisico.

Veneuze trombose kent verschillende omgevingsrisicofactoren zoals leeftijd, overgewicht en co-morbiditeit zoals bijvoorbeeld COVID-19. Daarnaast speelt ook erfelijke belasting een belangrijke rol. Om een beter inzicht te verwerven in de wijze waarop genen bijdragen aan het risico op ziektes met een genetisch element kan men zogenaamde *genome wide association studies* (GWAS) uitvoeren. Binnen deze studies worden genetische variaties vergeleken tussen een aangedane groep en een gezonde controlegroep om zo te kijken of bepaalde varianten geassocieerd zijn met een ziekte. In 2015 zijn de bevindingen van een GWAS-meta-analyse gepubliceerd, waar werd gekeken naar veneuze trombose. Deze bevindingen vormen de basis voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek. Variaties op 6.751.884 plekken in het genoom werden gemeten in 7.507 patiënten met veneuze trombose versus 52.632 gezonde controles. Deze studie associeerde negen varianten met dit ziektebeeld. Het merendeel hiervan betreft bekende risicofactoren voor veneuze trombose, zoals factor V Leiden mutatie en bloedgroep O. Echter werden er ook twee varianten in genen gevonden die nog niet eerder geassocieerd zijn met veneuze trombose namelijk TSPAN15 en SLC44A2. SLC44A2 staat voor *solute carrier family 44 member 2* ook wel *choline transport like protein-2* (CTL-2). Gebaseerd op overeenkomsten van SLC44A2 met SLC44A1, wat choline transport faciliteert, wordt er gedacht dat SLC44A2 eenzelfde transportfunctie heeft, echter er ontbreekt hiervoor solide bewijs in de literatuur. SLC44A2 is aanwezig op verschillende weefsels, waaronder ook het endotheel, wat de vaatwand bedekt en daarom een belangrijke speler is in trombose. Ook is dit eiwit aanwezig op verschillende soorten bloedcellen, zoals neutrofielen en bloedplaatjes. Deze bloedcellen worden recentelijk steeds vaker in verband gebracht met de pathofysiologie van veneuze trombose. Verder is er bekend dat SLC44A2 een rol speelt in twee aan veneuze trombose ongerelateerde ziekte namelijk, transfusie gerelateerde acute longschade (TRALI) en gehoorverlies. De variatie in SLC44A2 welke geassocieerd is met veneuze trombose, rs2288904, codeert voor het in TRALI betrokken HNA3-A/B antigeen aanwezig op het SLC44A2 eiwit. Het doel van het onderzoek beschreven

in dit proefschrift is om inzichten te verkrijgen in de manier waarop SLC44A2 een rol speelt in veneuze trombose. Dit om de pathofysiologie van dit ziektebeeld verder te ontdekken en, eventueel, nieuwe kandidaten voor therapeutische strategieën te vinden. De belangrijkste bevindingen van het onderzoek zijn hieronder uiteengezet.

Het in dit proefschrift beschreven onderzoek maakt gebruik van zeer recent gegenereerde muis welke deficiënt is voor het *Slc44a2*-gen. Deze zogenaamde *knockout* muismodellen zijn een veelgebruikte strategie in biomedisch onderzoek om de functie van genen te bestuderen. In **hoofdstuk 2** van dit proefschrift wordt dit nieuwe muismodel voor het eerst bekeken vanuit het oogpunt van de bloedstolling, met als doel om een mogelijke rol van dit gen hierin te vinden. Bloedplasma van *Slc44a2*-deficiënte muizen vertoont geen afwijking in de vorming van trombine; een cruciaal eiwit in de stolling. Ook is de genexpressie van stollings (gerelateerde) genen niet verschillend in muizen zonder SLC44A2. Von Willebrand factor (VWF) is een belangrijk stollingseiwit, wat zich bevindt in het plasma, het endotheel en de bloedplaatjes, allemaal belangrijke spelers in de hemostase. Wij vinden een verlaging van VWF-levels in plasma van ~15% in SLC44A2-deficiënte muizen. Het onderzoek laat zien dat SLC44A2 aanwezig is op bloedplaatjes maar dat het de aggregatie van bloedplaatjes niet beïnvloedt. Om naar de interactie tussen bloedplaatjes, stolling en de vaatwand te kijken is vaatschade geïnduceerd in de *Slc44a2*-deficiënte muis en de accumulatie van zowel bloedplaatjes als fibrine (het eindproduct van de stolling) gemeten. Een opmerkelijke bevinding is dat muizen zonder SLC44A2 een minder sterke reactie hebben op deze vaatschade in vergelijking met wildtype controle muizen. Hiermee bevestigen we de uit de GWAS volgende link tussen SLC44A2 en veneuze trombose. De bevindingen in dit hoofdstuk laten zien dat onder fysiologische omstandigheden, dus zonder pro-trombotische trigger, SLC44A2 geen groot effect heeft op verschillende aspecten van de bloedstolling (VWF-levels uitgezonderd). Ook dit is in overeenkomst met de GWAS waar variaties in het *SLC44A2*-gen geen effect hebben op de verschillende gemeten parameters voor hemostase in mensen.

In **hoofdstuk 3** gaan we van de fysiologische naar de pathofysiologische situatie, waarbij we *Slc44a2*-deficiënte muizen blootstellen aan twee verschillende modellen van veneuze trombose met als doel te kijken of SLC44A2 trombose beïnvloedt. In het eerst toegepaste model in dit hoofdstuk wordt de aanmaak van twee anti-stollingsfactoren (antitrombine en proteïne C) in de lever geremd door middel van siRNA. Als gevolg ontstaan er meerdere bloedstolsels in de grote venen van de kaak/hoofd van de muis. Wanneer wij dit model toepassen op muizen met *Slc44a2*-deficiëntie, zien wij geen verschil in het ontstaan van deze bloedstolsels. Wel is zichtbaar dat na de vorming van bloedstolsels, het aantal neutrofielen in het bloed hoger is bij muizen zonder SLC44A2 ten opzichte van controlemuizen. Het is bekend dat neutrofielen de incidentie van trombose niet beïnvloeden in dit model. Dit motiveerde ons om een tweede model voor veneuze trombose toe te passen, waar deze bloedcellen wel een belangrijke rol spelen; het stenose model. Voor dit model wordt door middel van een chirurgische ingreep een ligatuur geplaatst om de onderste holle ader waardoor er een 90% reductie van de bloedstroom ontstaat. 48 uur na het plaatsen van de

ligatuur is het aldus ontstane bloedstolsel significant kleiner in *Slc44a2*-deficiënte muizen ten opzichte van de controlemuizen. Tevens bevatten deze bloedstolsels minder bloedplaatjes. *Ex vivo* experimenten wijzen uit dat dit niet het gevolg is van een veranderende adhesie van bloedplaatjes aan VWF. Wanneer we ons meer richten op de initiatie van trombusvorming, na 6 uur stenose, is het effect van SLC44A2 nog uitgesprokener. Verder is zichtbaar dat veranderingen in uitscheiding van ontstekingsfactoren door het endotheel, activatie van bloedplaatjes, aggregatie van bloedplaatjes aggregatie en neutrofiel-activatie niet ten grondslag liggen van het waarneembare effect op trombose. Samenvattend laten de studies beschreven in **hoofdstuk 3** zien dat SLC44A2 duidelijk bijdraagt aan trombose in de muis. Door de verschillende waarnemingen bij de twee verschillende modellen kunnen wij concluderen dat het effect van SLC44A2 niet door stolling is gemedieerd, wat in lijn is met de bevindingen beschreven in **hoofdstuk 2**. De duidelijke invloed van SLC44A2 in het stenose model, leidt tot de hypothese dat deze invloed via een cellulair mechanisme plaatsvindt.

Bloedplasma bevat verschillende eiwitten waaronder de stollingsfactoren, complementfactoren, en talloze eiwitten betrokken bij de immuun response. Om een goed beeld te krijgen over fysiologie en pathofysiologie in cardiovasculair onderzoek is het meten van plasma-eiwitten cruciaal. Een groot obstakel hier is dat traditionele metingsmethoden lang niet voor alle eiwitten beschikbaar zijn, voornamelijk in het geval van eiwitten in muizen. Ook vereisen de traditionele methoden veelal een groot plasmavolume, wat nadelig is gezien muizen een klein bloedvolume hebben. In **hoofdstuk 4** is daarom een nieuw platform voor het meten van plasma-eiwitten gebruikt wat gebaseerd is op massaspectrometrie. In een plasma *sample* worden bij deze methode eiwitten enzymatisch gefragmenteerd en aan de hand van de massa van de peptide kunnen deze eiwitten vervolgens worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. Traditionele massaspectrometrie heeft echter een beperkte exactheid en daarom gebruiken wij een zogenaamde *targeted approach* waarbij 375 eiwitten in het plasma kunnen worden gekwantificeerd met een hoge precisie doormiddel van stabiele isotopen-gelabelde peptide standaarden. Eerst wordt gekeken naar het effect van trombose op de plasma-eiwitten, waarbij we kijken naar het eerder benoemde model waarbij trombose ontstaat als gevolg van de remming van de aanmaak van antistollingsfactoren. Veneuze trombose heeft hier een sterk effect, met voornamelijk verschillen in de plasma hoeveelheid van eiwitten betrokken bij ontstekingen en eiwitten aanwezig in rode bloedcellen. Om inzicht te vergaren in een eventueel effect van SLC44A2 op plasma-eiwitten, is dezelfde techniek toegepast op muizen deficiënt voor *Slc44a2*, zonder de introductie van trombose. In deze groep muizen, waarin beide seksen (man en vrouw) zijn geïnccludeerd, heeft sekse een grotere invloed dan SLC44A2. Voor *Slc44a2*-deficiëntie zijn er twee eiwitten welke verschillend zijn binnen beide sekse namelijk *glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1* en *thrombospondin-1*. Voor beide eiwitten is geen directe rol in de bloedstolling bekend. Wel zijn deze betrokken bij cellulaire mechanisme in neutrofielen en bloedplaatjes respectievelijk. Het ontbreken van een effect van SLC44A2 op de plasmahoeveelheid van eiwitten betrokken bij de stolling is in overeenstemming met de bevindingen van **hoofdstuk 2** en met de bevindingen van de GWAS. Concluderend, in dit hoofdstuk een nieuwe technologie voor

het meten van plasma-eiwitten voor het eerst toegepast in cardiovasculair onderzoek gebruikmakend van muismodellen en zijn hiermee nieuwe inzichten verkregen in de effecten van trombose, sekse en SLC44A2 op deze eiwitten.

In bovenstaande hoofdstukken bestuderen wij het effect van SLC44A2 op hemostase, trombose en plasma-eiwitten waarbij wij gebruikmaken van een muismodel. In **hoofdstuk 5** worden deze bevindingen teruggebracht naar de mens waarbij de rol van SLC44A2, en specifiek het daarop aanwezige antigen HNA-3, in humane cellen is bestudeerd. Bevindingen vanuit het onderzoek naar TRALI, een ziekte waar SLC44A2 ook een rol speelt, duiden er op dat SLC44A2 via HNA-3 kan binden aan VWF en dat deze binding wordt beïnvloed door de variatie geassocieerd met trombose; rs2288904. Om dit verder te bestuderen is in HEK293T cellen, een veelgebruikt cel model in biomedisch onderzoek, SLC44A2 met HNA3-A of HNA3-B ingebracht. Vervolgens is in een model wat de stroming van het bloed door bloedvaten nabootst, gekeken naar de binding van deze cellen aan VWF. Cellen met HNA3-A vertonen een verhoogde binding ten opzichte van HNA3-B. Dit is tevens zichtbaar wanneer hetzelfde experiment wordt uitgevoerd met humane neutrofielen met HNA3-A of HNA3-B. Deze verhoogde binding kan resulteren in neutrofiel activatie na blootstelling aan een stimulus. Neutrofiel activatie kan leiden tot het uitscheiden van DNA wat een net (ook wel neutrofiële extracellulaire vallen (NETs)) vormt waar bloedcellen aan kunnen binnen. Deze NETs zijn recentelijk in verband gebracht met een verhoogd risico op trombose. Om de invloed van SLC44A2 op neutrofiel/vaatwand interactie te verifiëren, is gekeken naar de invloed van SLC44A2 op de interactie van neutrofielen en venen in de muis. Hier is zichtbaar dat neutrofielen van *Slc44a2*-deficiente muizen inderdaad minder aan de vaatwand kleven.

Samenvattend tonen de studies beschreven in dit proefschrift aan dat SLC44A2 in muizen geen effect heeft op de hemostase en de hoeveelheid van stollingseiwitten, met de uitzondering van een kleine verlaging in von Willebrand factor. Dit is in overeenstemming met bevindingen dat SLC44A2 geen invloed heeft op de ernst van de trombose in een model voor veneuze trombose, welke gevoelig is voor veranderingen in de bloedstolling. SLC44A2 heeft wel een invloed op een model waarvan bekend is dat bloedcellen en voornamelijk neutrofielen een belangrijke rol spelen. Hieruit kan de conclusie worden getrokken dat SLC44A2 via cellulaire mechanismen trombose beïnvloedt. In de studies met menselijke cellen is zichtbaar dat SLC44A2 een neutrofiel/VWF-interactie medieert, wat tot activatie van deze immuun cellen en het uitscheiden van NETs kan leiden. Deze studies hebben bijgedragen aan het ontrafelen hoe de nieuwe erfelijke factor SLC44A2 bijdraagt aan de ontwikkeling van veneuze trombose. Hierdoor begrijpen we beter hoe veneuze trombose ontstaat met hopelijk in de nabije toekomst concrete aanknopingspunten voor een alternatieve, betere en veiligere behandelingsstrategie voor veneuze trombose.