

Regulation of thrombin formation via the protein C pathway in normal and hypercoagulable states

Citation for published version (APA):

Nicolaes, G. A. F. (1997). *Regulation of thrombin formation via the protein C pathway in normal and hypercoagulable states*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19970529gn>

Document status and date:

Published: 01/01/1997

DOI:

[10.26481/dis.19970529gn](https://doi.org/10.26481/dis.19970529gn)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

Haemostasis and thrombosis are two closely related processes with a common origin. Haemostasis is a physiological process in which blood loss from damaged blood vessels is limited and stopped by formation of a thrombus. In the case of thrombosis, a pathological condition, the haemostatic balance is disturbed. This can lead to formation of thrombi at locations in the body where, and at times when no thrombus formation is needed. Unwanted formation of thrombi can lead to obstruction of the circulation which can have many consequences. Chapter 1 reviews the general hypotheses for the formation of blood clots under both physiological and pathophysiological conditions. Several components of the haemostatic system are described which function in the formation and regulation of thrombin, a serine protease that plays a pivotal role in haemostasis. Furthermore, the structure, activation, function and inactivation of FV, a non-enzymatic protein cofactor which is required for efficient generation of thrombin, is discussed. Particular attention is given to APC-mediated down-regulation of FVa cofactor activity in individuals with a Arg \rightarrow Gln amino acid replacement at position 506 in the FV molecule (FV_{Leiden}, APC resistance). Acquired APC resistance, a phenomenon that has arisen since the general acceptance of screening for APC resistance by functional methods, is discussed in the last part of this chapter.

Chapter 2 describes the activation of FV by meizothrombin, a reaction intermediate formed during prothrombin activation. In this study, a recombinant meizothrombin (R155A meizothrombin) was used in which Arg¹⁵⁵ was replaced by Ala. This mutation prevents autocatalytic removal of the fragment 1 domain and allows studies on the functional activity of intact meizothrombin. In the presence of negatively charged phospholipid vesicles R155A meizothrombin was a potent activator of FV which activated FV with rate constants similar to those obtained for activation of FV by thrombin. Gel electrophoretic analysis of R155A meizothrombin- and thrombin-catalyzed activation of FV showed differences in the rates of cleavage of the susceptible peptide-bonds of FV by these two activators. However, FVa molecules obtained after full activation by R155A meizothrombin and thrombin were identical. It is concluded that during the initial phase of prothrombin activation, meizothrombin may play an important role in *in vivo* FV activation.

In chapter 3, the kinetics of inactivation of purified normal plasma FVa and FVa from an individual homozygous for the Arg⁵⁰⁶ \rightarrow Gln were studied. To this end, functional assays, probing the FVa cofactor activity, as well as immunoblot analysis were used. This study resulted in a model for the inactivation of FVa in which FVa loses its cofactor activity by APC-catalyzed

cleavage in the heavy chain domain of FVa in the presence of phospholipid vesicles via random cleavages of peptide bonds at positions Arg³⁰⁶ and Arg⁵⁰⁶. Cleavage at Arg⁵⁰⁶ is, however, characterized by a ~ 25 times higher second order rate constant (k_{cat}/K_m). This implies that at low FVa concentrations the peptide bond at Arg⁵⁰⁶ is cleaved at a ~ 20 times faster rate than cleavage at Arg³⁰⁶. Likewise, initial cleavage of a low concentration of FVa by APC is ~ 20 times faster in normal FVa than in FVa^{R506Q} since in the latter FVa, Arg⁵⁰⁶ is not present and cleavage occurs only at Arg³⁰⁶. It also demonstrates that FVa^{R506Q} is not fully resistant to inactivation by APC. Cleavage at Arg⁵⁰⁶ in normal FVa yields a reaction intermediate that possesses 40% cofactor activity in prothrombin activation mixtures containing 5 nM FXa. It is shown that the expression of cofactor activity of the intermediate is a function of the FXa concentration present in the FVa assay system that is used to monitor the loss of cofactor activity in prothrombin activation. This demonstrates that Arg⁵⁰⁶-cleaved FVa is impaired in its ability to interact with FXa. Similar kinetic analyses were performed for reaction systems that did not contain phospholipid vesicles. In these systems it was observed that most prominently in case of FVa^{R506Q}, cleavage at Arg⁶⁷⁹ also contributes to the observed loss of cofactor activity upon incubation with APC.

The knowledge about the mechanism of APC-catalyzed inactivation of FVa, obtained from the experiments presented in chapter 3 was used for the design of a chromogenic prothrombinase-based assay for the detection of APC-resistance (chapter 4). In this method, FV present in 1000-fold diluted plasma sample was activated with thrombin and subsequently incubated with phospholipids in the absence or presence of APC. After a fixed time interval FVa is quantified via determination of its cofactor activity in the prothrombinase complex. The percentage of remaining FVa cofactor activity, in the incubation with APC, relative to the incubation without APC, enables discrimination between plasma samples obtained from normal, heterozygous- or homozygous APC-resistant individuals. The test was optimized for the detection of normal, heterozygous- or homozygous APC-resistant individuals and the sensitivity and specificity obtained were both 100%, implying full correlation with DNA-based methods. The observed residual FVa activities for the different plasmas tested corresponded well with residual activities that were calculated on basis of rate constants of inactivation, presented in chapter 3. The test can be performed on any sample, provided that a sufficient amount of FV is present. Moreover, conditions that are known to hamper or influence functional detection of APC-resistance by clotting time-based methods (such as heparin treatment, oral anticoagulation, coagulation

factor deficiencies, pregnancy, use of oral contraceptives or the presence of lupus anticoagulants) do not interfere with the outcome of our test.

In chapter 5 the focus of research shifts from the study of the anticoagulant function of APC in model systems, to systems which contain platelet poor plasma. The effect of APC on the extrinsic and intrinsic pathways of coagulation in plasma from normal and APC-resistant individuals was studied by measuring the time integral of thrombin generation (endogenous thrombin potential, ETP) determined via chromogenic methods. It is shown that the reduction of the ETP by APC can be inferred from the ratio of endlevels of α_2 -macroglobulin-thrombin complexes, in the presence and absence of 50 nM APC: α_2 M-IIa_{+APC} / α_2 M-IIa_{-APC}. Since the α_2 M-IIa complex possesses amidolytic activity on small chromogenic substrates, the ratio, called APC-sensitivity ratio can be determined from two amidolytic measurements of the final levels of α_2 M-IIa complex, both in the presence and in the absence of APC. Division of the obtained ratio by the same ratio as determined for a normal plasma resulted in the normalized APC sensitivity ratio (nAPC-sr). Significant differences ($p < 0.001$) were observed between APC-sr of plasmas from normal individuals (nAPC-sr: 0.5 - 1.9, $n=25$) and of plasmas from individuals that were heterozygous (nAPC-sr: 2.1 - 6.7, $n=17$) or homozygous APC resistant (nAPC-sr: 3.9 - 5.9, $n=5$). There was no overlap between APC-sr of normal plasmas and plasma from individuals, bearing the FV mutation. The data show that measurement of the effect of APC on the ETP yields valuable information about the (pro)thrombotic status of a plasma (e.g. APC resistance, pregnancy or the use of oral contraceptives).

In chapter 6 the effect addition of APC on the ETP of a plasma sample, as is described in chapter 5, was further evaluated with plasma samples from women who were using oral contraceptives (OC) and from women not using OC. Compared with women not using OC, women who used OC exhibited a significantly decreased sensitivity to APC ($P < 0.001$), independent of the kind of OC used. Furthermore, it was shown that women who used third-generation monophasic OC were significantly less sensitive to APC than women using second-generation OC ($P < 0.001$) and had APC-sr that did not differ significantly from heterozygous female carriers of FV_{Leiden}, not using OC. During the research, five women were identified who used OC and were heterozygous carrier for the FV_{Leiden} mutation. These women had an nAPC-sr in the range of homozygous carriers for the FV_{Leiden} mutation. Two women were included into the research that started OC therapy. Within 3 days after start of OC therapy the APC-sr was significantly elevated. We propose that the observed acquired resistance to APC may well explain the

epidemiological observation of the increased risk for venous thrombosis in OC users, especially in women using third-generation OC.

Chapter 7 gives a general discussion of the data that are presented in the chapters 2 to 6 and puts these data in the context of experiments that were performed by other research groups. The different chapters are linked to each other, where possible. Chapter 7 ends with a discussion on hypercoagulable states, such as APC resistance and acquired factors such as use of oral contraceptives or pregnancy.

Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft het onderzoek dat gedurende de periode van 1 maart 1993 tot 1 maart 1997 door de auteur is uitgevoerd binnen de vakgroep Biochemie van de Faculteit der Geneeskunde van de Universiteit Maastricht. De vakgroep Biochemie vormt een onderdeel van CARIM, het Cardiovasculair Research Instituut Maastricht. Binnen dit instituut wordt vanuit verschillende wetenschappelijke disciplines onderzoek verricht dat betrekking heeft op de veelheid van processen die met het functioneren van hart- en bloedvaten te maken hebben. Belangrijk onderdeel van deze processen zijn de hemostase en trombose.

Hemostase en trombose zijn twee nauw aan elkaar verwante mechanismes die eenzelfde oorsprong hebben. Hemostase (bloedstolling) is een fysiologisch proces dat als doel heeft bloedverlies uit beschadigde bloedvaten te beperken en te stoppen. Hierbij wordt het beschadigde vat door een bloedpropje afgesloten. Van trombose spreken we wanneer er sprake is van een pathofysiologische toestand ('ziekte') waarin de hemostase niet meer onder controle is. Het gevolg hiervan is dat er bloedpropjes ontstaan in het lichaam op plaatsen en op tijdstippen waarop dit niet noodzakelijk is. Deze ongewenste vorming van bloedpropjes kan leiden tot verstopping van bloedvaten, waardoor de normale bloedsomloop wordt gehinderd. Trombose kan in verschillende vormen, met ieder verschillende consequenties, voorkomen.

Hoofdstuk 1 geeft een samenvatting van de huidige theorieën over de vorming van bloedstolsels, zowel onder normale, als onder pathofysiologische condities. Verschillende bouwstenen van het hemostasesysteem worden besproken. Centraal staat echter de functie van het enzym trombine (behorend tot de serine protease klasse).

Verder wordt de structuur, de activering, de functie en inactivering van de stollingsfactor V¹ besproken. Factor V is een niet-enzymatisch cofactor molecuul dat essentieel is voor de effectieve vorming van trombine.

In het bijzonder wordt er aandacht geschonken aan het ongedaan maken van de activiteit die ontstaat wanneer de niet-actieve factor V is omgezet in het actieve FVa. Onderzoek naar de regulatie van FVa activiteit in personen waarbij als gevolg van een genetische afwijking een verandering in het gen voor factor V heeft plaats gevonden (de arginine op positie 506 is vervangen door een glutamine) neemt een bijzondere plaats in. Deze afwijking noemt men de FV_{Leiden}-mutatie omdat deze voor het eerst door de onderzoeksgroep van Prof. Bertina uit Leiden is beschreven (synoniem is de term FV^{R506Q}). Mensen met FV_{Leiden} worden APC-resistent genoemd aangezien de regulatie van FVa activiteit in deze individuen sterk belemmerd is en het factor Va ongevoelig is geworden voor APC, het enzym dat onder normale omstandigheden FVa inaktiveert.

Door in het laboratorium te testen of het bloedplasma van een individu wel of niet gevoelig is voor APC kan men bepalen of iemand APC-resistent is. Gebleken is echter dat APC resistentie niet alleen voorkomt bij mensen die de FV_{Leiden}-mutatie bezitten, maar ook bij mensen waar er geen sprake is van een bekende afwijking aan het stolsysteem. In die gevallen wordt gesproken van verworven APC resistentie. Verworven APC-resistentie, besproken in het laatste deel van hoofdstuk 1; komt onder andere voor bij vrouwen die zwanger zijn of die anticonceptie-pillen gebruiken.

Hoofdstuk 2 beschrijft de activering van FV door meizotrombine, een reactie-tuusenprodukt bij de protrombine-activering. In deze studie is een recombinante vorm van meizotrombine gebruikt, R155A meizotrombine. Voor de constructie van deze mutant werd het arginine residue op aminozuur-positie 155 veranderd in een alanine; wat tot gevolg had dat autokatalytische afsplitsing van het fragment 1 domein onmogelijk werd gemaakt. In aanwezigheid van negatief geladen fosfolipide-oppervlakken was R155A meizotrombine een sterke activator van FV, gekarakteriseerd door een tweede orde snelheidsconstante voor de activering van FV die van dezelfde grootte-orde is als die voor de activering van FV door trombine.

¹ Volgens afspraak worden een aantal verschillende stoffactoren met Romeinse cijfers aangeduid. Een hoofdletter 'F' is de afkorting voor stoffactor. Wanneer een stoffactor niet actief is staat er enkel een Romeins cijfer, bijvoorbeeld FV. Wanneer men de actieve vorm van een stoffactor bedoeld, dan wordt deze aangeduid door de letter 'a' bij te plaatsen, bijvoorbeeld FVa.

Gelelektroforetische analyse van FV-activeringen door R155A meizotrombine of trombine toonden aan dat er verschillen zijn in de snelheden waarmee de verschillende peptide-bindingen gesplitst worden tijdens de activering van FV. Na volledige activering van FV door R155A meizotrombine of trombine worden echter FVa moleculen verkregen die identiek zijn. De conclusie wordt getrokken dat gedurende de initiële fase van de protrombineactivering, meizotrombine een belangrijke rol kan spelen in de *in vivo* activering van FV.

In hoofdstuk 3 wordt de inactivering van FVa door APC beschreven voor zowel normaal FVa als voor FVa gezuiverd uit het plasma van iemand die homozygoot voor de Arg⁵⁰⁶→Gln mutatie is. Hierbij is gebruik gemaakt van een assay waarmee de functionele activiteit van FVa getest wordt en waarbij peptide-band splitsingen in de zware keten van FVa worden bestudeerd met behulp van immunoblot-analyse. Een model voor de inactivering van FVa door APC wordt voorgesteld, waarbij in aanwezigheid van een fosfolipide-opervlak de cofactor-activiteit van FVa verdwijnt, na splitsing van de peptide-bindingen achter de aminozuren Arg³⁰⁶ en Arg⁵⁰⁶ (in willekeurige volgorde) in de zware keten van FVa. Splitsing op positie Arg⁵⁰⁶ wordt echter gekarakteriseerd door een ongeveer 25 maal grotere reactiesnelheidsconstante (k_{cat}/K_m) dan splitsing op positie Arg³⁰⁶. Dit verschil wordt met name veroorzaakt door een 10-voudig verschil in de K_m voor de splitsing van beide peptide-bindingen. Dit houdt in dat bij lage FVa concentraties, zoals die in de beschreven experimenten zijn gebruikt, de splitsing achter Arg⁵⁰⁶ 20 keer sneller gaat dan die achter Arg³⁰⁶. Dit betekent dat FVa_{Leiden}, niet volledig resistent is tegen inactivering door APC en via splitsing van de peptideband achter Arg³⁰⁶ 20 keer langzamer dan FVa kan worden geïnactiveerd.

Splitsing achter Arg⁵⁰⁶ van normaal FVa levert een reactie-tussenproduct dat 40% van de initiële cofactor activiteit bezit in protrombine-activerings mengsels die 5 nM FXa bevatten. Aangetoond wordt dat de expressie van cofactor activiteit van het reactie-tussenproduct een functie is van de FXa concentratie die aanwezig is in de FVa cofactor assay. Dit toont aan dat Arg⁵⁰⁶-gesplitst FVa belemmerd is in zijn interactie met FXa.

Soortgelijke kinetische analyses als voor de fosfolipide-bevattende reactie-mengsels zijn uitgevoerd voor reactie-mengsels die geen fosfolipide vesikels bevatten. Experimenten in deze systemen toonden aan dat met name in geval van de inactivering van FVa^{R506Q}, de splitsing achter Arg⁶⁷⁹ ook bijdraagt aan het waargenomen verlies van cofactor-activiteit tijdens incubatie met APC.

Het model voor de door APC gekatalyzeerde inactivering van FVa, dat in het vorige hoofdstuk 3 werd voorgesteld is gebruikt bij het ontwerpen van een chromogene test, op basis van protrombinase-activiteit, voor de detectie van

APC-resistentie. Deze methode wordt beschreven in hoofdstuk 4. In deze methode wordt een plasmamonster sterk verdund (1000 keer) in een fosfolipide-bevattende buffer en het aanwezige FV wordt met trombine geactiveerd. De resulterende FVa activiteit wordt vervolgens bepaald in een protrombinase-assay, nadat er een incubatiestap met- of zonder APC heeft plaatsgevonden. Het restpercentage FVa activiteit, in het reactiemengsel met daarin APC, ten opzichte van het reactiemengsel zonder APC, wordt gebruikt als een maat om te bepalen of het plasma sample afkomstig was van een normaal individu ofwel van een heterozygoot of homozygoot APC resistent individu. De methode is geoptimaliseerd en zowel de specificiteit als de sensitiviteit van de test waren 100%, wat inhoudt dat er een volledige correlatie bestaat met methoden die op DNA analyse zijn gebaseerd. De waargenomen FVa restactiviteiten voor de verschillende plasma's correspondeerden goed met restactiviteiten die op grond van de kinetische parameters die in hoofdstuk drie zijn gegeven worden berekend voor de verschillende inactiveringen. De test kan worden uitgevoerd op elk plasma monster, op voorwaarde dat er voldoende FV aanwezig is. Bovendien is de test uitvoerbaar in plasmas die via methodes die gebaseerd zijn op de bepaling van stoltijden moeilijk of niet te bepalen zijn (bijvoorbeeld bij aanwezigheid van heparine of lupus anticoagulantia, bij gebruik van orale anticoagulantia of oral contraceptiva of bij zwangerschap).

In hoofdstuk 5 verschuift het onderzoek naar de anticoagulante functie van APC van een basaal onderzoek in model-systemen naar een meer toegepaste vorm, in systemen die bloedplaatjes-arm plasma bevatten. Het effect van de toevoeging van APC aan plasmamonters waarin de stolling zowel intrinsiek- als extrinsiek gestart is wordt bestudeerd voor plasma's van normale, gezonde individuen en van APC-resistente individuen. Kwantitering van dit effect van APC wordt uitgevoerd via verlaging van de tijdsintegraal van trombinevorming (endogene trombine potentiaal, ETP) die wordt geregistreerd via een chromogene methode. Aangevoerd wordt dat een verlaging van de ETP door APC eenvoudig kan worden afgeleid uit een simultane vermindering van de eindniveau's van de α_2 -macroglobuline-trombine complexen, zowel in aan- als in afwezigheid van APC: $\alpha_2\text{M-IIa}_{+APC} / \alpha_2\text{M-IIa}_{-APC}$. Aangezien het $\alpha_2\text{M-IIa}$ complex amidolytische activiteit bezit t.o.v. kleine chromogene substraten, kan de voorgenoemde ratio van $\alpha_2\text{M-IIa}$ niveau's worden berekend uit twee amidolytische bepalingen van de eindniveau's van $\alpha_2\text{M-IIa}$ complex, één in aanwezigheid, en één in afwezigheid van APC.

Deling van de verkregen ratio van activiteiten van het $\alpha_2\text{M-IIa}$ complex voor een willekeurig plasmamonster door een soortgelijke ratio die bepaald is

voor een gedefinieerd normaal plasma geeft de genormaliseerde APC-sensitiviteits ratio (nAPC-sr). Tussen de plasma's van normale individuen (nAPC-sr: 0.5 - 1.9, n=25) en heterozygote (nAPC-sr: 2.1 - 6.7, n=17) en homozygote APC-resistente (nAPC-sr: 3.9 - 5.9, n=5) personen zijn significante verschillen ($p < 0.001$) in APC-sr waargenomen. Er was geen overlap tussen de APC-sr van normale plasma's en plasma's van personen die drager van de FV_{Leiden} -mutatie zijn. Onze data tonen aan dat bepaling van het effect van APC-toevoeging op de ETP waardevolle informatie oplevert over de (pro)trombotische status van een plasmamonster (bijvoorbeeld in geval van APC-resistentie, zwangerschap of gebruik van orale contraceptiva).

Hoofdstuk 6 beschrijft het effect van toevoeging van APC op de ETP van plasma-monsters, volgens de methode zoals beschreven in hoofdstuk 5, voor een serie van monsters van vrouwen die wel of niet orale contraceptiva (OC) gebruiken. Vergeleken met vrouwen die geen OC gebruiken, vertoont het plasma van vrouwen die OC gebruiken een significant verminderde gevoeligheid voor APC ($p < 0.001$), onafhankelijk van het soort OC dat wordt gebruikt. Bovendien was het plasma van vrouwen die een derde-generatie monofasische OC gebruiken, significant ongevoeliger voor APC dan het plasma van vrouwen die een tweede-generatie OC gebruiken ($p < 0.001$) en waren de APC-sr niet significant verschillend van de APC-sr voor een groep vrouwelijke heterozygote draagsters van de FV_{Leiden} -mutatie die geen OC gebruiken. Vijf vrouwen die aan het onderzoek als bloeddonor deelnamen en die OC gebruikten bleken heterozygote draagster voor de FV_{Leiden} -mutatie. Deze vrouwen hadden een APC-sr in de orde van grootte van die welke behoort bij homozygote dragers van de FV_{Leiden} -mutatie.

Twee vrouwen, starters van OC-gebruik, werden bij het onderzoek betrokken. Binnen een tijdsbestek van drie dagen na aanvang van de OC therapie was de APC-sr in het plasma van deze vrouwen significant verhoogd. Wij stellen dan ook de hypothese dat de waargenomen verworven APC-resistentie mogelijk een verklaring geeft voor het toegenomen risico op veneuze trombose bij het gebruik van OC en met name derde-generatie OC, zoals dat uit epidemiologisch onderzoek wordt geconcludeerd.

Hoofdstuk 7 bediscussieert in algemene zin de data die in de hoofdstukken 2 tot en met 6 worden gepresenteerd en stelt deze in een context van data die door andere onderzoeksgroepen werden gepubliceerd. Verbanden tussen de verschillende hoofdstukken worden, waar mogelijk, gelegd. Hoofdstuk 7 eindigt met een uiteenzetting over hypercoagulabele toestanden (dat zijn condities waarbij om de één of andere reden er sprake is van een trombotiseneiging) zoals APC-resistentie en verworven factoren zoals bij gebruik van orale contraceptiva of zwangerschap.