

# Properties of factor V in the pro- and anticoagulant pathways of blood coagulation

Citation for published version (APA):

Hoekema, L. (2000). *Properties of factor V in the pro- and anticoagulant pathways of blood coagulation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20000121lh>

## Document status and date:

Published: 01/01/2000

## DOI:

[10.26481/dis.20000121lh](https://doi.org/10.26481/dis.20000121lh)

## 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](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

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

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary

**Chapter 1** is the introduction to this thesis and gives an overview of the regulation of blood coagulation and the role of factor V therein.

In **chapter 2**, the roles of protein S and factor Xa in the APC-catalyzed down-regulation of factor Va activity are analyzed. In the absence of these modulators, inactivation of factor Va activity by APC occurs via limited proteolysis, primarily at Arg<sup>306</sup> and at Arg<sup>506</sup>. Since cleavage at Arg<sup>506</sup> is approximately 20-fold faster than at Arg<sup>306</sup>, Arg<sup>506</sup> is a very important cleavage site for APC. Inactivation of factor Va by APC in the presence of protein S occurs at a higher rate than in the absence of protein S. Analysis of the factor Va inactivation curves and assignment of rate constants to cleavages at Arg<sup>506</sup> and Arg<sup>306</sup> showed that protein S specifically enhances the rate of cleavage at Arg<sup>306</sup> approximately 20-fold. Half-maximum stimulation is obtained at 490 nM protein S, a value close to the plasma concentration of protein S. The effect of factor Xa on APC-catalyzed factor Va inactivation is also restricted to one cleavage site in factor Va. In contrast to protein S, factor Xa diminishes factor Va inactivation and prevents specifically cleavage at Arg<sup>506</sup>. Interestingly, when the APC-catalyzed inactivation of factor Va and factor Va from a homozygous carrier of the factor V<sub>Leiden</sub> mutation are studied in the presence of protein S and factor Xa, the difference in rate of inactivation of the 2 forms is annihilated. This observation may explain why, in the absence other risk factors, factor V<sub>Leiden</sub> is only a mild risk factor for thrombotic complications.

**Chapter 3** describes the properties of the two factor V isoforms (factor V<sub>1</sub> and factor V<sub>2</sub>) in the pro- and anticoagulant pathways. In plasma, 2 forms of factor V circulate which are differently glycosylated in the C-terminal part of the C2 domain. As a consequence the 2 forms of factor V have different affinities for negatively charged phospholipid vesicles (factor V<sub>1</sub> has lower affinity), have different properties in prothrombin activation and differ in their susceptibility for APC. At phospholipid vesicles with a negatively charged phospholipid content of 10 mole percent and lower, factor Va<sub>1</sub> is increasingly less well inactivated by APC than factor Va<sub>2</sub>. However, the expression of cofactor activity in prothrombin activation requires much less phospholipids. This predicts that conditions can be found where factor Va<sub>1</sub> and factor Va<sub>2</sub> have identical cofactor activities in prothrombin activation, but factor Va<sub>1</sub> is less efficiently down-regulated by APC than factor Va<sub>2</sub> and thus results in more thrombin generation. Indeed it was shown in an experiment which mimics the physiological situation, *i.e.* in the presence of membranes at a physiological concentration and composition at which factor V is activated, expresses its cofactor activity in prothrombin activation and is down-regulated by APC and



protein S, that in the presence of factor  $V_1$  7 fold higher levels of thrombin are formed than in the presence of factor  $V_2$ . This raised the hypothesis that altered amounts of factor  $V_1$  and factor  $V_2$ , in favor of the more thrombogenic form, factor  $V_1$ , contribute to APC-resistance in the absence of the  $FV_{Leiden}$  mutation.

To test this hypothesis, an assay was developed that quantifies factor  $V_1$  and factor  $V_2$  in plasma (**chapter 4**). This assay is based on the differences in prothrombin activation between factor  $V_{a1}$  and factor  $V_{a2}$  at phospholipid vesicles with a low content of negatively charged phospholipid vesicles. With this assay it was shown that normal plasma contains twice as much factor  $V_2$  as factor  $V_1$  (67% factor  $V_2$ ), and by determining the amounts of factor  $V_1$  and factor  $V_2$  in plasma from 40 individuals it was shown that the relative amounts of factor  $V_1$  and factor  $V_2$  in plasma are under strict control (range 50-80% factor  $V_2$ ).

**Chapter 5** describes the results obtained in collaboration with the group of Prof. Bernardi from Italy. This group discovered the so-called R2-polymorphism, which encodes for several amino acid changes in factor V and is associated with mild APC-resistance. In this chapter it is shown that carriers of the R2-polymorphism have an increased risk for coronary artery disease. One of the amino acid changes in R2-factor V results in increased relative amounts of the more thrombogenic form of factor V (factor  $V_1$ ) in plasma of carriers of this polymorphism. This may well explain the increased risk for thrombotic complications observed for carriers of the R2-polymorphism.

In **chapter 6** a detailed kinetic analysis of the functional properties of the R2-factor V molecule is performed, in order to elucidate the biochemical mechanism by which the R2-polymorphism is associated with an increased risk for arterial and venous thrombosis. Compared to normal factor V, R2-factor V is equally well activated by thrombin and has subsequently the same sensitivity to inactivation by APC. Moreover, R2-factor  $V_a$  and normal factor  $V_a$  have the same properties in the prothrombinase complex. However, when plasmas from homozygous carriers of the R2-polymorphism are compared with plasmas from age- and sex-matched controls, it appears that R2-plasma contains higher amounts of factor VIII, lower amounts of factor V and is more resistant to APC in a diluted aPTT-based APC-resistance test. Plasma from homozygous R2-carriers is more resistant to APC in an assay that quantifies the cofactor activity of factor V in the APC-catalyzed inactivation of factor VIII.

Together with the increased relative amount of the more thrombogenic form of factor V (factor  $V_1$ ) in plasma of R2-carriers this may well explain the increased risk for thrombotic complications associated with carriership of the R2-gene. This chapter describes new mechanisms underlying thrombotic disease. Further research is required to answer the question whether these mechanisms, independent of the R2-polymorphism, contribute to the development of thrombosis.

## Samenvatting

Het stollen van bloed is essentieel voor het menselijk lichaam om bloedverlies tegen te gaan. Bloedstolling is daarom een bijzonder efficiënt en snel proces dat te vergelijken valt met een lawine. Tengevolge van een kleine stimulus worden grote hoeveelheden stollingseiwitten geactiveerd die ervoor zorgen dat de bloeding stopt. Het stollen van bloed moet beperkt blijven tot de plaats van de verwonding en mag bovendien niet langer doorgaan dan strikt noodzakelijk is voor het stoppen van de bloeding aangezien anders trombose kan optreden. Eén van de mechanismen die beschikbaar zijn om bloedstolling onder controle te houden is het zogenaamde protein C systeem: door inactivering van stollingseiwitten (o.a. factor V) wordt het stollingsproces onder controle gehouden. Het protein C systeem heeft de afgelopen jaren veel belangstelling getrokken van wetenschappers omdat er een erfelijke afwijking in factor V is gevonden (factor  $V_{Leiden}$ ) dat geassocieerd is met een verhoogd risico op trombose. Deze afwijking leidt ertoe dat het factor V molecuul slechter door het protein C systeem geïnactiveerd kan worden.

In **hoofdstuk 2** wordt de inactivering van geactiveerd factor V (factor  $V_a$ ) door geactiveerd proteïn C (APC) in de aanwezigheid van proteïn S en factor  $X_a$  beschreven. Via een nauwkeurige kinetische analyse van de inactivering van factor  $V_a$  door APC werd gevonden dat proteïn S en factor  $X_a$  elk een specifiek effect hebben op een knipplaats voor APC in het factor  $V_a$  molecuul. Proteïn S versnelt de inactivering van factor  $V_a$  op positie 306, terwijl factor  $X_a$  de inactivering op positie 506 remt. Wanneer in de inactivering van normaal factor  $V_a$  en factor  $V_{aLeiden}$  vergeleken worden in de aanwezigheid van proteïn S en factor  $X_a$  dan verdwijnt het verschil in inactiveringssnelheid volledig. Dit kan mogelijk verklaren waarom de factor  $V_{Leiden}$  mutatie een relatief milde risicofactor voor trombose is.

In feite is het niet correct om van *het* factor V molecuul te spreken aangezien er 2 vormen van factor V (factor  $V_1$  en factor  $V_2$ ) in plasma circuleren. Als gevolg van een verschil in ver-suikering hebben ze verschillende affiniteiten voor, voor de bloedstolling belangrijke, negatief geladen membranen en daarom hebben de 2 vormen verschillende functionele eigenschappen. Deze functionele eigenschappen worden in **hoofdstuk 3** geanalyseerd. De vorm die het slechtst bindt aan membranen, factor  $V_1$ , is een slechtere cofactor in de vorming van trombine dan factor  $V_2$ , maar wordt ook slechter door APC geïnactiveerd dan factor  $V_2$ , hetgeen weer aanleiding zou kunnen geven tot méér trombinevorming. Het netto resultaat van het verschil in functionele eigenschappen tussen factor  $V_1$  en factor  $V_2$  op de uiteindelijke hoeveelheid trombine die gevormd wordt, laat zich niet gemakkelijk voorspellen. Maar in een experiment dat de



fysiologische situatie benadert, werd aangetoond dat factor  $V_1$  aanleiding geeft tot 7 maal meer trombinevorming dan factor  $V_2$ . Dit leidde tot de hypothese dat de verhouding van factor  $V_1$  en factor  $V_2$  in plasma belangrijk is voor de regulatie van de trombinevorming en dat een verandering in het voordeel van de meer trombogene vorm (factor  $V_1$ ) mogelijk APC-resistentie in de afwezigheid van factor  $V_{Leiden}$  kan verklaren.

Om deze hypothese te testen werd een assay ontwikkeld (**hoofdstuk 4**) die beide vormen in plasma kan kwantificeren. Deze assay is gebaseerd op het verschil in cofactor activiteit in de vorming van trombine tussen factor  $V_{a1}$  en factor  $V_{a2}$  en maakt gebruik van het feit dat onder 'optimale' condities geen verschil is in cofactor activiteit, terwijl onder niet-optimale condities factor  $V_{a2}$  ongeveer een 8-maal betere cofactor is dan factor  $V_{a1}$ . De meting onder optimale condities levert de totale hoeveelheid factor V (factor  $V_1$  + factor  $V_2$ ) op. Door dit te combineren met de meting onder niet-optimale condities kunnen de hoeveelheden factor  $V_1$  en factor  $V_2$  in een plasma monster berekend worden. Analyse van plasma monsters van gezonde individuen geeft aan dat de relatieve hoeveelheden factor  $V_1$  en factor  $V_2$  strikt gereguleerd worden; de waardes liggen tussen de 50% en 80% factor  $V_2$ , met een gemiddelde van 67% factor  $V_2$ .

**Hoofdstuk 5** beschrijft de resultaten die verkregen zijn in samenwerking met de groep van prof. Bernardi uit Italië. Door deze groep is voor het eerst het zogenaamde R2-polymorfisme beschreven dat codeert voor een aantal aminozuur veranderingen in factor V en geassocieerd is met milde APC-resistentie. In dit hoofdstuk wordt aangetoond dat dragers van dit polymorfisme een verhoogd risico hebben op trombotische problemen in de coronair vaten van het hart. Tengevolge van één van de aminozuur veranderingen in het R2-factor V molecuul is plasma van dragers van dit polymorfisme verrijkt in de meer trombogene factor  $V_1$  vorm van factor V. Dit is een mogelijke verklaring voor het waargenomen verhoogde trombose risico voor dragers van het R2-polymorfisme.

In **hoofdstuk 6** wordt een uitgebreide kinetische analyse voor het R2-factor V molecuul beschreven die als doel heeft de biochemische verklaring te vinden van het verhoogde risico op arteriële en veneuze trombose, dat dragers van dit polymorfisme hebben. In vergelijking met normaal factor V wordt R2-factor V net zo snel geactiveerd door trombine en R2-factor  $V_a$  is vervolgens even gevoelig voor inactivering door APC als normaal factor  $V_a$ . Bovendien hebben R2-factor  $V_a$  en normaal factor  $V_a$  identieke kinetische eigenschappen als cofactor in de trombine-vormende protrombinase complex. Wanneer echter plasmas van R2-dragers worden vergeleken dat van niet-dragers dan komen een aantal verschillen aan het licht. Zo hebben R2-dragers hogere factor VIII en lagere factor V spiegels in hun plasma en is hun plasma ongevoeliger voor APC in een verdunde APC-resistentietest. Ook verloopt de inactivering van factor VIII in R2-plasma slechter dan in normale plasma's, hetgeen veroorzaakt wordt door een verminderde cofactor activiteit van R2-factor V in de door APC gekatalyseerde inactivering van factor VIII. Samen met de verrijking in de meer trombogene vorm van factor V (factor  $V_1$ ) in plasma van R2-dragers, vormt dit een goede verklaring voor het waargenomen verhoogde risico op trombose van dragers van het R2-polymorfisme. In dit hoofdstuk zijn nieuwe mechanismen beschreven die ten grondslag liggen aan trombotische klachten. Verder onderzoek is nodig om uit te maken of deze mechanismen, onafhankelijk van het R2-polymorfisme, van belang zijn in de ontwikkeling van trombose.