

The role of the different Kunitz domains of TFPI in the down-regulation of the extrinsic coagulation pathway

Citation for published version (APA):

Peraramelli, S. (2015). *The role of the different Kunitz domains of TFPI in the down-regulation of the extrinsic coagulation pathway*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. <https://doi.org/10.26481/dis.20150918sp>

Document status and date:

Published: 01/01/2015

DOI:

[10.26481/dis.20150918sp](https://doi.org/10.26481/dis.20150918sp)

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

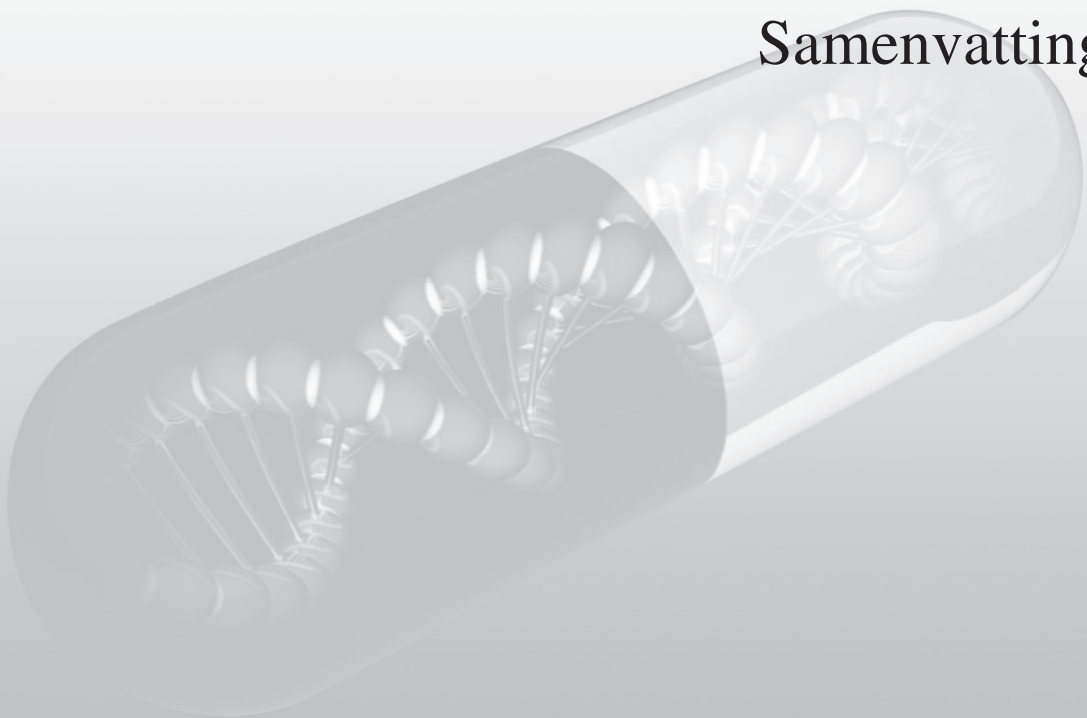
Take down policy

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

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Samenvatting



Tissue factor pathway inhibitor (TFPI) is een protease remmer die is opgebouwd uit een negatief geladen N-terminus gevolgd door drie Kunitz domeinen (K1, K2 en K3) en een positief geladen C-terminus. TFPI reguleert de extrinsieke stollingsroute via remming van de geactiveerde stollingsfactoren FXa en FVIIa. FXa remming door TFPI wordt gestimuleerd door protein S, een vitamine K-afhankelijk anticoagulant eiwit wat niet alleen functioneert als cofactor van TFPI maar ook van geactiveerd protein C (APC), de serine protease die de stolling remt via proteolytische inactivering van FVa en FVIIIa.

In **hoofdstuk 2** laten we zien dat in afwezigheid van APC, TFPI gestimuleerd wordt door protein S en de trombinevorming vooral remt wanneer deze gestart wordt met lage tissue factor (TF) concentraties. Bij hoge tissue factor concentraties (> 10 pM) is TFPI, zelfs in aanwezigheid van protein S, niet in staat de trombinevorming te remmen. Echter wanneer er APC aanwezig is, treedt TFPI ook remmer van de trombinevorming op bij hoge TF concentraties. Dit betekent dat in aanwezigheid van APC protein S twee belangrijke anticoagulante functies heeft en zowel een cofactor is van APC als van TFPI. De betekenis van protein S wordt geïllustreerd door de waarneming dat in afwezigheid van protein S, APC en TFPI nauwelijks in staat zijn de trombine vorming te remmen (Fig. 3, hoofdstuk 2).

Remming van FXa door TFPI verloopt in twee stappen: in eerste instantie wordt er snel een kleine hoeveelheid FXa-TFPI complex gevormd wat vervolgens via een langzame isomerisatiereactie wordt omgezet in een complex het z.g. FXa-TFPI*

complex waarin TFPI en FXa een sterke interactie aangegaan zijn, wat geïllustreerd wordt door de lage dissociatieconstante van het FXa-TFPI* complex ($K_i^* = 0.02-0.1$ nM). In zowel het FXa-TFPI als het FXa-TFPI* complex wordt het actieve centrum van FXa bezet door het K2 domein van TFPI. In **hoofdstuk 3** laten we, met behulp van TFPI fragmenten, zien dat de andere Kunitz domeinen van TFPI een belangrijke rol spelen in de remming van FXa door TFPI. Het geïsoleerde K2 domein blijkt een slechte remmer van FXa te zijn die, in tegenstelling tot TFPI, de amidolytische activiteit van FXa in een 1-stapsreactie remt. Een TFPI fragment bestaande uit de Kunitz domeinen K2 en K3 is een veel betere remmer van FXa dan het K2 domein, maar remt FXa nog steeds via een 1-stapsreactie. TFPI fragmenten die de Kunitz domeinen K1 en K2 bevatten (K1-K2 en TFPI₁₋₁₆₁) blijken als het volledige TFPI molecuul FXa te remmen via een 2-stapsreactie. Echter, zowel K1-K2 als TFPI₁₋₁₆₁, die beide het K3 domein missen, blijken in vergelijking met TFPI_{FL} veel minder efficiënt te zijn in de vorming van het initiële FXa-TFPI complex. Op basis van deze waarnemingen concluderen we dat het K1 domein nodig is voor de isomerisatie van het initieel gevormde FXa-TFPI complex naar het FXa-TFPI* complex en dat het K3 domein de vorming van het initiële FXa-TFPI complex bevordert. Het feit dat protein S aan het K3 domain bindt en de vorming van het FXa-TFPI complex verder stimuleert, ondersteunt ons voorstel dat het K3 domein een belangrijke rol speelt in de vorming van het initiële FXa-TFPI complex. Op basis van de waarneming dat TFPI_{FL} FXa remt met een K_i

die 10-maal hoger is dan de K_i die gemeten is voor een TFPI fragment bestaande uit K2, K3 en de C-terminus, stellen we voor dat het K1 domein niet alleen nodig is voor de isomerisatie van het FXa-TFPI naar het FXa•TFPI* complex, maar tevens de vorming van het initiële FXa•TFPI complex remt.

In de afwezigheid van Ca^{2+} -ionen, is TFPI_{FL} een aanzienlijk beter remmer van FXa dan van FXa wat het γ -carboxyglutamine zuur bevattende domein mist. Ca^{2+} -ionen werken de FXa remming door TFPI_{FL} tegen, maar hebben geen effect op de remming door TFPI constructen zonder C-terminus. Dit geeft aan dat, in afwezigheid van Ca^{2+} -ionen, interacties tussen de C-terminus van TFPI en het Gla-domein van FXa de remming van FXa door TFPI bevorderen.

In **hoofdstuk 4** hebben we de rol van de verschillende Kunitz domeinen in de remming van FVIIa door TFPI bestudeerd. In dit hoofdstuk werd de remming van FVIIa gevolgd met een FVIIa-specifiek chromogeen substraat. TFPI_{FL} remde TF-FVIIa via een langzame monofasische reactie ($t_{1/2} \sim 5$ min bij 2 nM TFPI_{FL}) die gekarakteriseerd wordt door K_i van 4.6 nM. In afwezigheid van TF, bleek TFPI_{FL} een zeer slechte FVIIa remmer te zijn met een K_i waarde van 1118 nM en in de aanwezigheid van een TF fragment (sTF) wat niet aan een fosfolipide oppervlak bindt werd een K_i gemeten van 122 nM. Dit geeft aan dat fosfolipidenen TF de FVIIa remming door TFPI_{FL} aanzienlijk stimuleren. TFPI constructen zonder K3 domein en C-terminus (TFPI₁₋₁₅₀ en K1-K2) waren 7–10

keer minder effectief dan TFPI_{FL} in de remming van TF-FVIIa. Dit laat zien dat de KD3-C-terminus een belangrijke rol speelt in de directe remming van FVIIa door TFPI. Kunitz domein 1 was vergeleken met K1-K2, een slechte TF-FVIIa remmer ($K_i = 434$ nM), wat aangeeft dat het K2 domein van TFPI niet alleen FXa remt, maar ook belangrijk is voor de remming van FVIIa. Protein S stimuleerde de remming van TF-FVIIa door TFPI_{FL} ($K_i = 0.7$ nM), maar had geen effect op de remming door TFPI fragmenten. In aanwezigheid van FXa, werd een TF-FVIIa-TFPI-FXa complex gevormd met TFPI_{FL}, TFPI₁₋₁₅₀ en KD1-KD2, met respectievelijke K_i waarden < 0.15 nM, 0.5 nM en 0.8 nM. Dit toont aan dat de aanwezigheid van de KD3-C-terminus geen absolute voorwaarde is voor de vorming van het quaternaire TF-FVIIa-TFPI-FXa complex. Met FXa zonder Gla-domein en in afwezigheid van fosfolipiden werd er echter geen quaternair TF-FVIIa-TFPI-FXa complex gevormd.

In **hoofdstuk 5** wordt een vergelijkbare studie gepresenteerd waarin de remming van TF-FVIIa niet gekwantificeerd wordt met behulp van een FVIIa-specifiek chromogeen substraat, maar door het volgen van de remming van de activering van de natuurlijke TF-FVIIa substraten FX en FIX. TFPI_{FL} remde de FIX activering door TF:FVIIa met een K_i van 16.7 nM. In aanwezigheid van protein S daalde de K_i naar 1.0 nM. TFPI₁₋₁₅₀ en KD1-KD2 remden de FIX activering met K_i waarden die ongeveer 10-maal hoger waren dan die van TFPI_{FL} en de remming door TFPI₁₋

₁₅₀ en KD1-KD2 werd niet gestimuleerd door protein S. De losse Kunitz domeinen (K1 en K2) remden de FIX activering door TF:FVIIa nauwelijks ($K_i > 800$ nM).

FX activering werd gemeten bij een beperkende concentratie FVIIa en een overmaat TF of omgekeerd d.w.z. bij een beperkende concentratie TF en een overmaat FVIIa. Onder beide condities waren TFPI_{FL}, TFPI₁₋₁₅₀ en KD1-KD2 even effectief in de remming van de FX activering. Echter, TFPI_{FL} was ~15-keer meer actief als TFPI₁₋₁₅₀ en KD1-KD2 wanneer de FX activering gemeten werd bij een lage fosfolipideconcentratie. We stellen voor dat een overmaat fosfolipide TFPI_{FL} wegvangt waardoor er minder TFPI_{FL} beschikbaar is voor de remming van TF:FVIIa. FXa-TFPI_{FL} en FXa-TFPI₁₋₁₅₀ complexen, die vooraf gevormd waren door preïncubatie van FXa met TFPI_{FL} of TFPI₁₋₁₅₀, waren snelle en stoichiometrische remmers van zowel de FIX als de FX activering door TF:FVIIa. Dit geeft aan dat de vorming van het binaire TFPI-FXa complex de snelheid beperkende stap is in de remming van TF:FVIIa. Verder is het van belang te vermelden dat protein S ook de TFPI remming van de FX activering door TF:FVIIa stimuleerde.

Zowel FXa als TFPI gaan interacties aan met verschillen in plasma aanwezige componenten zoals de stollingseiwitten prothrombine, FV/FVa, en protein S en niet-eiwit verbindingen zoals fosfolipide en heparine. In **hoofdstuk 6** hebben we het effect van deze componenten op de remming van FXa door TFPI en TFPI₁₋

¹⁵⁰ bestudeerd.

Lage concentraties negatief geladen fosfolipiden (~10 μ M) waren voldoende om de remming van FXa door TFPI maximaal (5-6 maal) te stimuleren. Niet-gefractioneerd heparine (0.2–1 U/ml) stimuleerde de remming van FXa door TFPI ~8 keer. Echter, heparine concentraties >1 U/ml vertraagden de remming van FXa door TFPI. Physiologische protein S en FV concentraties stimuleerden de FXa remming door TFPI ongeveer 2-3 maal. Trombine-geactiveerd FV (FVa) vertraagde het remmende effect van TFPI. Remming van FXa door TFPI₁₋₁₅₀ werd niet beïnvloed door FV, FVa, protein S, fosfolipiden en heparine wat aangeeft de Kunitz domein K3 en de C-terminus nodig zijn voor de interacties met deze TFPI modulatoren. TFPI was een potente remmer van de door FXa gekatalyseerde prothrombine activering in afwezigheid van FVa, maar had nauwelijks effect op de prothrombine activering in aanwezigheid van FVa wat verkregen was na activering van FV door trombine. Het feit de effecten van prothrombine, FV, FVa, protein S, fosfolipiden en heparine op de remming van FXa door TFPI gemeten werden bij physiologische concentraties geeft aan dat deze modulatoren een belangrijk effect hebben op de *in vivo* anticoagulante activiteit van TFPI.