

Quantification and evaluation of the anticoagulant activities of protein S in plasma

Citation for published version (APA):

Alshaikh, N. A. (2018). *Quantification and evaluation of the anticoagulant activities of protein S in plasma*. ProefschriftMaken Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20181128na>

Document status and date:

Published: 01/01/2018

DOI:

[10.26481/dis.20181128na](https://doi.org/10.26481/dis.20181128na)

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.

Chapter 7

Summary

Summary

Protein S is a vitamin K-dependent plasma protein. It has multiple functions in different biological processes. As an anticoagulant, it critically participates in the control of blood coagulation by acting as a non-enzymatic cofactor for APC in the inactivation of factor Va and factor VIIIa and as a cofactor for TFPI in the inhibition of FXa and TF- VIIa. **Chapter 1** is a general introduction about blood coagulation and hemostasis in a brief review and about the anticoagulant aspects of protein S as a specific focus of this thesis. The importance of protein S in the regulation of coagulation is illustrated by the increased risk of venous thrombosis associated with its acquired and hereditary deficiency. Therefore, one of the objectives with first priority of this thesis was to meet the increasing demand for a reliable activity test for protein S. Accordingly, in this thesis we have introduced new functional assays that selectively enable reliable quantification of APC and TFPI cofactor activities of protein S in plasma. **Chapter 2** shows detailed description of the design and development of the assays. The performance of the assays was validated in a plasma collection consists of type I protein S-deficient samples, normal samples as control, and FV Leiden carrier samples (homozygous and heterozygous). The developed assays gave reliable values for the APC and TFPI cofactor activity of protein S in all tested samples and could distinguish the protein S-deficient samples from the normal controls. Most importantly, the assays are insensitive to FV Leiden mutation and gave reliable measurements of protein S activity in the carrier samples. It is reported that protein S levels reduced in some acquired risk factor of protein S deficiency. **In chapter 3** the assay also used to quantify APC and TFPI cofactor activities of protein S in populations with acquired protein S deficiency of cirrhosis, pregnancy and oral anticoagulant users. Plasma from healthy volunteers with normal protein S were used as control. The assays were performed successfully and could distinguish between protein S-deficient plasmas with reduced activity and control plasmas with normal activity.

Protein S exists in plasma in several biological variants as free or complex form and in intact or cleaved status. The generally accepted believe is that the intact free form is the only biologically active form with anticoagulant properties. **In chapter 4** we studied the regulation of APC and TFPI cofactor activities of protein S by proteolysis and C4b-binding protein. Results from **chapter 4** show that cleaved protein S loses the APC cofactor activity

but retains full TFPI cofactor activity. On the other hand, protein S-C4BP expresses only partial APC and TFPI cofactor activity. **In chapter 5** we studied the synergistic effect of TFPI and protein S on regulation of coagulation by APC at low and high thrombin generation. The data showed that TFPI and protein S are main determinants of APC activity at low and high TF and an efficient regulation of thrombin generation by APC is dependent on optimal activity and levels of TFPI and protein S. The amount of protein S required to reduce thrombin generation in the presence of APC to 50% strongly depends on the plasma concentrations APC and TFPI. These findings have implications for the risk of venous thrombosis of patients with low protein S and low TFPI.

Finally, in **chapter 6** the main findings of this thesis are thoroughly discussed and analyzed in light of previous and recent literatures.

Samenvatting

Proteïne S is een vitamine K-afhankelijk plasma-eiwit met meerdere functies in verschillende biologische processen. Als een anticoagulans, heeft proteïne S een kritische functie bij de bloedstolling als cofactor voor APC bij de inactivatie van factor Va en factor VIIIa, en als cofactor voor TFPI bij de remming van FXa en TF-VIIa. **Hoofdstuk 1** is een algemene inleiding over de bloedstolling en hemostase in een korte weergave waarin de anticoagulante aspecten van proteïne S de specifieke focus is van dit proefschrift. Het belang van proteïne S in het reguleren van de bloedstolling wordt geïllustreerd door het verhoogde risico van veneuze trombose dat gepaard gaat met de verworven en erfelijke deficiëntie van proteïne S. Daarom was één van de doelstellingen in dit proefschrift het ontwikkelen van een betrouwbare test voor het bepalen van actieve proteïne S. Dienovereenkomstig hebben we in dit proefschrift nieuwe functionele testen geïntroduceerd, die een selectieve en betrouwbare kwantificering van APC en TFPI cofactor-activiteiten van proteïne S in plasma mogelijk maken. **Hoofdstuk 2** geeft een gedetailleerde beschrijving weer van het ontwerp en de ontwikkeling van de eerdergenoemde testen. Deze testen werden gevalideerd in een verzameling van plasma monsters bestaande uit type I-proteïne S-deficiënte patiënten, gezonde donoren (normale controles) en FV Leiden patiënten (homozygoot en heterozygoot). De ontwikkelde testen gaven betrouwbare resultaten voor de cofactor-activiteit van proteïne S voor APC en TFPI in alle geteste plasma monsters en konden de proteïne S-deficiënte patiënten van de normale controles onderscheiden. De belangrijkste uitkomst is dat de testen ongevoelig zijn voor de FV Leiden-mutatie en betrouwbare metingen van proteïne S-activiteit in de proteïne S-deficiënte patiënten gaven. Er is gerapporteerd dat proteïne S-spiegels lager zijn bij mensen met sommige verworven risicofactoren van proteïne S-deficiëntie. **In hoofdstuk 3** werden de testen ook gebruikt voor het kwantificeren van de cofactor-activiteiten van proteïne S voor APC en TFPI in populaties met verworven proteïne S-deficiëntie, zoals in patiënten met levercirrose, zwangere vrouwen en gebruikers van orale antistolling medicaties. Plasma's van gezonde vrijwilligers met een normale concentratie van proteïne S werden gebruikt als controle. De testen werden met succes uitgevoerd en konden onderscheid maken tussen proteïne S-deficiënte plasma's met verminderde activiteit en controleplasma's met normale activiteit.

Proteïne S bestaat in plasma in verschillende biologische varianten zoals in een vrije of in een gebonden vorm en in een intacte of een gesplitste toestand. Over het algemeen is het aanvaard dat de intacte vrije vorm van proteïne S de enige biologisch actieve vorm is met antistollende eigenschappen. In **hoofdstuk 4** hebben we de regulatie van de APC- en TFPI-cofactoractiviteiten van proteïne S door proteolyse en het C4b-bindend eiwit bestudeerd. Resultaten uit dit hoofdstuk laten zien dat de gesplitste vorm van proteïne S de APC-cofactoractiviteit verliest, maar de volledige TFPI-cofactoractiviteit behoudt. Aan de andere kant brengt het proteïne S-C4BP complex slechts gedeeltelijke APC- en TFPI-cofactoractiviteit tot expressie. In **hoofdstuk 5** hebben we het synergistische effect van TFPI en proteïne S op het reguleren van de stolling door APC bij lage en hoge trombine vorming bestudeerd. De resultaten in dit hoofdstuk toonden aan dat TFPI en proteïne S de belangrijkste determinanten zijn van APC-activiteit bij lage en hoge TF. Bovendien is daarbij gebleken dat een efficiënte regulatie van trombinevorming door APC afhankelijk is van een optimale activiteit en concentraties van TFPI en proteïne S. De hoeveelheid proteïne S die vereist is om trombine vorming tot 50% te verminderen in de aanwezigheid van APC, hangt sterk af van de plasmaconcentraties van APC en TFPI. Deze bevindingen hebben consequenties voor het risico van veneuze trombose bij patiënten met laag proteïne S en laag TFPI.

Ten slotte worden in **hoofdstuk 6** de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift uitvoerig besproken en geanalyseerd aan de hand van recente literatuur.