

Regulation of thrombin generation by protein S : novel aspects of a cofactor protein

Citation for published version (APA):

Sere, K. M. (2006). *Regulation of thrombin generation by protein S : novel aspects of a cofactor protein*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20060524ks>

Document status and date:

Published: 01/01/2006

DOI:

[10.26481/dis.20060524ks](https://doi.org/10.26481/dis.20060524ks)

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

Wanneer een bloedvat beschadigd wordt, treden verschillende mechanismen in werking om het bloedverlies als gevolg hiervan te stoppen. Dit proces wordt ook wel hemostase genoemd. Het stollen van bloed (coagulatie) speelt hierbij een essentiële rol. Net als andere biologische systemen is de hemostase sterk gereguleerd. Bij beschadiging van de vaatwand moet bloedstolling accuut en massaal optreden, echter wel beperkt in plaats en tijd. Onder normale omstandigheden dient juist de vloeibaarheid van bloed gewaarborgd te zijn. Verschillende pro- en anticoagulante processen maken een strikte regulatie mogelijk. Hemostase wordt vaak voorgesteld als een balans tussen deze pro- en anticoagulante processen waarbij het voor de hand ligt dat bij bloedverlies de balans doorslaat naar de procoagulante zijde. De balans kan ook ongewenst doorslaan naar de procoagulante (bv bij trombose) of naar de anticoagulante (bv bij hemofilie) zijde.

In hoofdstuk 1 wordt besproken dat zowel cellulaire als niet-cellulaire (humorale) componenten bijdragen aan hemostase. Bij vaatwandbeschadiging binden bloedplaatjes aan componenten in het vrijgekomen, onderliggende weefsel. Hierdoor worden ze geactiveerd en vormen op de plaats van de beschadiging een plaatjesaggregaat. Op die manier werpen ze een eerste dam op om de bloeding te stelpen. Tegelijkertijd wordt de stolling in gang gezet. Dit resulteert in de vorming van een fibrinenetwerk dat het initiële plaatjesaggregaat verstevigt. De stolling wordt gekenmerkt door een reeks opeenvolgende reacties (cascade) waarbij stoffactoren, die in bloed aanwezig zijn als niet-actieve precursors, omgezet worden in hun actieve vorm.

De stollingscascade wordt geïnitieerd doordat weefselfactor (tissue factor, TF), dat vrijkomt bij de vaatbeschadiging, bindt aan de geactiveerde stoffactor VII (FVIIa), die in kleine hoeveelheden in bloed circuleert. Het TF/FVIIa complex activeert FX tot FXa en FIX tot FIXa, welke op hun beurt cascadegewijs een reeks van reacties in gang zetten. Tijdens de stolling worden meerdere macro-moleculaire complexen gevormd welke bestaan uit een actief enzym en een geactiveerde cofactor geassocieerd op een negatief geladen membraanoppervlak. Het product van één complex is op zijn beurt een onderdeel van een ander complex. Zo vormt het product van het TF/FVIIa complex, FXa, samen met zijn cofactor FVa het protrombinase-complex dat protrombine (FII) activeert tot trombine (FIIa), het centrale enzym van de stollingscascade.

Wanneer stolling is opgetreden, moet de hemostatische balans snel weer hersteld worden. Dit gebeurt onder invloed van verschillende anticoagulante processen. In het bloed zijn hoge concentraties enzym remmers aanwezig die de geactiveerde stoffactoren direct kunnen remmen. Daarnaast bestaan er twee negatieve feedback systemen die zorgen dat trombinevorming niet uit de hand loopt: 1) tissue factor pathway inhibitor (TFPI) remt met de hulp van FXa specifiek het initiërende TF/FVIIa complex; 2) het proteïne C/proteïne S systeem wordt geactiveerd wanneer proteïne C door trombine wordt omgezet in geactiveerd proteïne C (APC). In hoofdstuk 2 wordt een overzicht gegeven van de verschillende anticoagulante mechanismen en met name proteïne S en TFPI worden in detail besproken.

In hoofdstuk 3 tot en met 6 wordt de remming van trombinevorming door proteïne S beschreven. Als cofactor van APC stimuleert proteïne S de inactivering van FVa en FVIIIa, twee belangrijke cofactoren van de stolling. Deze samenwerking tussen APC en proteïne S leidt tot een efficiënte remming van de trombinegeneratie in plasma. Over de APC-cofactor activiteit van proteïne S zijn verscheidene gedetailleerde studies verschenen. Bijgevolg is aanzienlijke structurele en mechanistische informatie hierover aanwezig. Proteïne S vermindert trombinegeneratie ook in de afwezigheid van APC. De APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S werd reeds in 1988 beschreven. Toch is er tot op heden maar weinig gekend over het mechanisme van de directe remming van trombinevorming door proteïne S. Algemeen wordt aangenomen dat proteïne S het protrombinase-complex (FVa, FXa en negatief geladen fosfolipiden) 'verstoort'. Er bestaat echter vooralsnog geen consensus over de manier waarop proteïne S dat doet. Enerzijds worden FVa en FXa direct beïnvloed door proteïne S wat aanleiding geeft tot een gereduceerde trombinevorming. Anderzijds bindt proteïne S, in vergelijking met andere stoffactoren, met hoge affiniteit aan fosfolipiden. Dit suggereert dat proteïne S trombinevorming ook kan remmen door het afschermen van het voor enzymreacties noodzakelijke membraanoppervlak. De interpretatie van tot dusver gerapporteerde bevindingen wordt bemoeilijkt door het feit dat verschillende gezuiverde proteïne S preparaten duidelijke verschillen in APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit vertonen.

De onduidelijkheid over de APC-onafhankelijke activiteit van proteïne S vormde het uitgangspunt voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift. De hypothese was dat, hoewel de interactie met fosfolipiden essentieel is voor de directe werking van proteïne S, ook de interacties met de eiwitcomponenten van het protrombinasecomplex belangrijk zijn. Duidelijkheid over het mechanisme van de APC-onafhankelijke activiteit van proteïne S zou o.i. pas verkregen kunnen worden als ook duidelijk was waarom er een grote variatie in activiteit bestaat tussen de verschillende gezuiverde proteïne S preparaten.

In hoofdstuk 3 werd de binding van gezuiverd proteïne S aan een negatief geladen fosfolipidenoppervlak beschreven. Die binding bleek niet monofasisch te zijn, zoals verwacht wordt voor een zuiver eiwitpreparaat, maar bifasisch wat duidt op een niet-homogeen eiwit mengsel dat tenminste twee vormen van proteïne S bevat. Er kon inderdaad aangetoond worden dat een gezuiverd preparaat naast monomeer proteïne S ook een kleine hoeveelheid (<5%) multimeren proteïne S vormen bevat. Deze multimeren binden aan negatief geladen fosfolipiden met zeer hoge affiniteit (dissociatie constante $K_d = <1$ nM). Het overgrote deel van de proteïne S moleculen zijn monomeren, die met een veel lagere affiniteit aan fosfolipiden binden ($K_d = \sim 250$ nM). Het bleek dat de multimeren vormen nagenoeg volledig verantwoordelijk zijn voor de directe remming van de protrombinase-activiteit door gezuiverd proteïne S. Wanneer multimeren en monomeren van elkaar gescheiden en apart getest werden op hun capaciteit om protrombineactivering te remmen, vertoonden de multimeren proteïne S vormen een ~ 100 maal hogere APC-onafhankelijke activiteit dan de proteïne S monomeren. De aanwezigheid van multimeren verklaart ook de grote variatie in activiteit tussen

verschillende proteïne S preparaten. Aan de hand van Western blot kon worden aangetoond dat een preparaat met relatief lage APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit, relatief weinig multimeren bevat, en *vice versa*.

In plasma konden geen proteïne S multimeren aangetoond worden, hetgeen sterk suggereerde dat deze vormen van proteïne S ontstaan tijdens de zuivering van het eiwit uit plasma. Om dit uit te zoeken werd de zuiveringsprocedure van proteïne S onder de loep genomen. De resultaten van dit onderzoek staan beschreven in hoofdstuk 4. Proteïne S multimeren worden inderdaad gevormd tijdens de zuiveringsprocedure die standaard voor proteïne S gebruikt wordt. Anionenwisselaar chromatografie in het bijzonder bleek een uitgesproken multimeer-vormend vermogen te bezitten. Ook minder fysiologische omstandigheden, zoals lage pH en hoge zoutconcentratie, versterkten de multimeervorming. Het bleek nagenoeg onmogelijk om de vorming van multimeren tijdens proteïne S zuivering te voorkomen; evenmin werd erin geslaagd eenmaal gevormde proteïne S multimeren te dissociëren. Verwijdering van multimeren uit een proteïne S preparaat d.m.v. liposoomextractie bleek effectief, maar in het resulterende monomere preparaat werden zeer snel nieuwe multimeren gevormd. Blijkbaar leidt de isolatie van proteïne S uit de plasma omgeving tot een situatie die multimeervorming stimuleert. Aangenomen kan worden dat in gezuiverd proteïne S altijd multimeren aanwezig zijn. Dientengevolge moet dus rekening worden gehouden met hun aanwezigheid wanneer de anticoagulante activiteit van gezuiverd proteïne S bestudeerd wordt. Reactie-omstandigheden moeten zo worden gekozen dat multimeren geen invloed hebben op het verloop van het bestudeerde proces. Eén mogelijkheid daartoe is de fosfolipidenconcentratie in functionele tests hoog genoeg te nemen. Zo wordt voorkomen dat een belangrijk percentage van het oppervlak bezet wordt door proteïne S multimeren. In hoofdstuk 4 werd aangetoond dat de remmende activiteit van proteïne S op protrombineactivering snel afneemt bij toenemende concentratie fosfolipiden. Vanaf $\sim 10 \mu\text{M}$ fosfolipiden bleek de protrombineactivering vrijwel niet meer geremd te worden door gezuiverd proteïne S. Deze resultaten suggereerden dat proteïne S de trombinevorming niet remt door een direct effect op het protrombinasecomplex: noch door afscherming van het fosfolipidenoppervlak, noch door directe interacties met de eiwitcomponenten van het protrombinase complex.

Omdat in plasma geen multimeren aanwezig zijn, kan, om effecten van multimeren te vermijden, de APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S ook bestudeerd worden in een plasma systeem in plaats van een modelsysteem met gezuiverde eiwitten. De anticoagulante activiteit van proteïne S in plasma werd bepaald aan de hand van trombinegeneratie metingen, en dit is beschreven in hoofdstuk 5. De oppervlakte onder de trombinegeneratie-curve (endogenous thrombin potential, ETP) is een maat voor de totale hoeveelheid trombine die gevormd is tijdens het stollingsproces. De APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S in plasma kan gekwantificeerd worden door de ETP, bepaald in normaal plasma, te vergelijken met de ETP in datzelfde plasma waaraan antilichamen zijn toegevoegd die proteïne S neutraliseren. Om zeker te zijn dat de APC-onafhankelijke activiteit van proteïne S gemeten werd en niet de APC-cofactor activiteit, werden in alle experimenten

ook neutraliserende antilichamen tegen APC toegevoegd. Toevoeging van de anti-proteïne S antilichamen aan plasma verhoogde de ETP tot ~160%, vergeleken met de ETP in plasma zonder anti-proteïne S antilichamen. Dit duidt erop dat actief proteïne S, in afwezigheid van APC, in staat is trombinegeneratie (ETP) te remmen. Er werd in kaart gebracht onder welke omstandigheden proteïne S optimaal de trombinegeneratie remt. De APC-onafhankelijke activiteit van proteïne S bleek niet te worden beïnvloed door de fosfolipidenconcentratie. Echter, de hoeveelheid TF die werd toegevoegd aan plasma om de stolling te initiëren bleek wel bepalend voor de proteïne S activiteit. Bij een lage concentratie TF (1.4 pM) werd de ETP door proteïne S met ~75% geremd. Wanneer de TF concentratie werd verhoogd daalde de APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S: bij een concentratie van 3.5 pM TF werd de ETP met ~30% gereduceerd, terwijl bij hoge TF concentratie (14 pM) de ETP nauwelijks nog geremd werd door proteïne S. Bij deze hoge concentratie TF (14 pM) functioneerde proteïne S daarentegen uitstekend als cofactor voor APC: de remming van trombinegeneratie door APC werd onder die omstandigheden door proteïne S meer dan 20 keer versterkt.

Deze waarnemingen leidden tot een nieuw concept wat betreft de anticoagulante werking van proteïne S, waarbij de sterkte van de stollingstrigger (TF) bepalend is. Wanneer bloed echt moet stollen, bv bij vaatwandbeschadiging, is de TF concentratie hoog en dus de procoagulante respons sterk. Onder die omstandigheden helpt proteïne S als cofactor van APC de hemostatische balans te herstellen. In situaties waarbij stolling juist vermeden moet worden en de balans bewaard dient te blijven, remt proteïne S de trombinevorming efficiënt in de afwezigheid van APC. Lage concentraties TF blijken altijd te circuleren in bloed maar mogen onder normale omstandigheden stolling niet in gang zetten. Mogelijk speelt de APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S hierbij een belangrijke rol.

In hoofdstuk 6 is er verder ingegaan op het feit dat de APC-onafhankelijke activiteit van proteïne S het grootst is bij lage concentraties TF. Dit leek erop te wijzen dat proteïne S een rol speelt tijdens de initiatie van stolling, welke voor zover bekend onder controle staat van TFPI. Daarom werd nagegaan of proteïne S en TFPI samenwerkten in de regulatie van stolling. Dit werd getest door middel van trombinegeneratie metingen in plasma. Wanneer TFPI uit plasma verwijderd werd, was proteïne S niet meer in staat om trombinegeneratie te remmen. Omgekeerd bleek dat de remming van de trombinegeneratie door TFPI sterk verminderd was in proteïne S deficiënt plasma. De experimenten in plasma suggereren inderdaad een samenwerking tussen proteïne S en TFPI. Dit werd bevestigd in een modelsysteem met gezuiverde componenten. De invloed van TFPI, proteïne S of beide remmers op de activering van FX tot FXa door TF/FVIIa werd bestudeerd. Zonder één van beide remmers wordt FX met een constante snelheid geactiveerd. De aanwezigheid van TFPI tijdens deze reactie zorgt ervoor de snelheid van FX activering afneemt in de tijd – TFPI is immers een TF/FVIIa remmer – en uiteindelijk helemaal stilvalt wanneer alle TF/FVIIa geremd is. Wanneer zowel TFPI als proteïne S in deze reactie aanwezig waren, werd TF/FVIIa veel sneller geremd dan met TFPI alleen, met als gevolg dat de hoeveelheid FXa die gevormd werd vele malen

lager was. Proteïne S alleen had geen effect op de TF/FVIIa activiteit waaruit geconcludeerd kon worden dat proteïne S fungeert als een cofactor voor TFPI.

TFPI remt het TF/FVIIa complex in twee stappen. In stap 1 bindt TFPI met FXa (het product van TF/FVIIa) waarbij de activiteit van FXa geremd wordt. In stap 2 interageert het FXa/TFPI complex met TF/FVIIa. Deze interactie resulteert in een hecht quaternair complex waarin ook FVIIa geremd is. Kinetische analyse toonde aan dat proteïne S de remming van FXa door TFPI (stap 1) beïnvloedt, door de remmingsconstante (K_i) van het FXa/TFPI complex ~ 10 keer te verlagen. Hierdoor is er dus enerzijds meer FXa/TFPI beschikbaar, waardoor de remming van TF/FVIIa sneller verloopt. Anderzijds is er minder FXa beschikbaar voor procoagulante reacties zoals de activering van protrombine. Verdere analyse toonde aan dat de aanwezigheid van een negatief geladen fosfolipiden oppervlak essentieel is voor de TFPI-cofactor activiteit van proteïne S.

In hoofdstuk 7 hebben we de resultaten, beschreven in hoofdstuk 3 tot en met 6, in verband gebracht met reeds gerapporteerde bevindingen en in een breder perspectief geplaatst. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift heeft een bijdrage geleverd aan de opheldering van het mechanisme van de APC-onafhankelijke anticoagulante activiteit van proteïne S. Een belangrijke waarneming is dat proteïne S de stolling niet remt door verstoring van het protrombinase-complex, zoals eerder gedacht, maar fungeert als een cofactor voor TFPI en op die manier de initiatie van stolling beïnvloedt. Deze bevinding onderschrijft het belang van proteïne S als anticoagulante factor. Meer onderzoek is nodig om het moleculaire mechanisme waarmee proteïne S de interactie tussen FXa en TFPI bevordert, te karakteriseren.