



**Universiteit  
Leiden**  
The Netherlands

## **Genetic variation and susceptibility to venous thrombosis : Etiology and risk assessment**

Bezemer, I.D.

### **Citation**

Bezemer, I. D. (2009, June 2). *Genetic variation and susceptibility to venous thrombosis : Etiology and risk assessment*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13823>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13823>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

---

GTGAGATGAT ATTTCGAAGA ATAAAGATGC CCTGGCTTTG  
GCTTGATCTC TGGTACCTTA TGTTTAAAGA AGGATGGGAA  
CACAAAAAG **Summary / Samenvatting** TACCAACA  
GTGTAAGTCC CTGACTTTTA CAATTGTGGT AAAATAGACA  
TAACATAAAA TTTCCCTTTA TAACCATTTT AACTGTACAG  
TTTGGTGGTA TTAAGTGCAT TCACGATGTT GTGCAACCAT  
CCCCACCGTT CATTTCAGA ACTTTGGTA AGTCCATGAT  
GTTGATGTTT TGTTAACATA CCCGGTGTAG GACTATGGAG  
CCTATGTCTC AGAAAATAAA ACTTGAATAA TAATAGAAAA  
CAATTTTCA TATAAAAAAT TATACTTAAG TATAAAAAATG  
TATACTTCAA TTATGTAGTC AACAAATATT AATTAAGTAC  
TCGCTAAGTG CTAACCACCA TACCAAATGT TGGAAATGTA

## SUMMARY

Venous thrombosis is the result of blood coagulation in veins, most frequently in the deep veins of the leg. The thrombus impairs or obstructs the blood flow, which leads to swelling of the affected limb, pain and red discoloration. Besides painful and disabling, venous thrombosis can be life-threatening when part of the thrombus breaks off and travels to the lungs where it may obstruct lung arteries; a pulmonary embolism. Venous thrombosis occurs in about one in every 1000 persons per year. Risk factors for venous thrombosis may be environmental or genetic; in most cases venous thrombosis occurs after an environmental trigger on a background of increased susceptibility.

The aim of the research presented in this thesis was to identify and evaluate common genetic variants that contribute to genetic susceptibility to venous thrombosis, and to study the clinical utility of genetic variants in prediction of venous thrombosis.

Established genetic risk factors for venous thrombosis are inherited deficiencies of the anticoagulant proteins antithrombin, protein C and protein S and the more common factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations. In the past decade, the field of genetic epidemiology has evolved rapidly and many genetic variants were described that might influence the risk of venous thrombosis. Chapter 3 of this thesis summarizes the main findings that were published. We concluded that the general rule that novel findings need to be replicated in different study populations is essential in genetic association studies. Furthermore, an intermediate phenotype that is associated with both the genotype and disease strongly increases the likelihood that a genetic variant is a true risk factor for venous thrombosis rather than a false-positive finding.

One of the variants that have been studied extensively is the 677 C>T single nucleotide polymorphism (SNP) in the gene encoding 5,10-

methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*). This SNP is associated with homocysteine levels, which are in turn associated with venous thrombosis. However, it is still a matter of debate whether the association between homocysteine and venous thrombosis is causal. In the light of this debate, an association between the *MTHFR* SNP and venous thrombosis would provide evidence for causality, as the genotype can influence protein levels (and thus disease), but not the other way around. In Chapter 4 we studied the *MTHFR* SNP in the Multiple Environmental and Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis (MEGA Study), a case-control study of 4375 patients and 4856 control subjects, but found no association with the risk of venous thrombosis. Hence, the study provided no evidence for causality of the homocysteine-venous thrombosis association and the *MTHFR* SNP does not seem to predict risk of venous thrombosis.

In order to identify new variants we performed a large SNP association study in three population-based case-control studies of venous thrombosis, described in Chapter 5. The first study, the Leiden Thrombophilia Study (LETS), included 443 patients and 453 control subjects and was used as a discovery set. Genetic variants that were associated in LETS were subsequently tested in two subsets of the MEGA Study. This study added seven SNPs to the list of variants that might contribute to genetic susceptibility to venous thrombosis. Two of these SNPs, in the *CYP4V2* and *F9* genes, were studied in more detail. The *CYP4V2* gene is located next to the genes encoding kallikrein (*KLKB1*) and coagulation factor XI (*F11*). As described in Chapter 5, we identified additional variants in the region that were associated with both factor XI levels and risk of venous thrombosis. The SNP in *F9* is known since the 1980s as *F9* Malmö, but has never before been described in association with venous thrombosis. *F9* Malmö is a missense SNP that causes an amino acid substitution in the part of coagulation factor IX that is cleaved off to activate the protein. We studied this SNP in more detail in the study described in Chapter 6. The association was not explained by linkage with nearby SNPs, as none of the SNPs we genotyped was more strongly associated with venous thrombosis than *F9* Malmö. We studied whether *F9* Malmö affects susceptibility to venous thrombosis through

factor IX levels, which were measured in the LETS and MEGA samples. We also studied whether *F9* Malmö was associated with factor IX activation, by studying the association with factor IX activation peptide measured in a cohort study, the Northwick Park Heart Study II. We found, however, no evidence for an association with factor IX level or function.

Two other SNPs identified in the SNP association study were located in the known coagulation pathway genes *F5* (encoding coagulation factor V) and *SERPINC1* (encoding antithrombin). Although the function of the genes in coagulation is clear, we do not yet know how these SNPs affect risk of venous thrombosis. The SNP in *GP6* (encoding glycoprotein VI, a platelet collagen receptor) is known to affect platelet aggregation and thrombus formation. So far, however, platelets are known to be involved in arterial thrombosis but not so much in venous thrombosis.

Three SNPs were located in genes not known to be involved in venous thrombosis: *RGS7*, *NR1I2* and *NAT8B*. No known coagulation genes are located in the proximity of these genes. Validation of these associations in other populations might extend our knowledge about the etiology of venous thrombosis.

The clinical perspective of genetic variants in venous thrombosis was covered in two chapters. In Chapter 1 we studied the family history as a risk indicator for venous thrombosis and surrogate for genetic risk factors in the MEGA Study. A positive family history correlates poorly with the presence of classical genetic risk factors regularly tested for in many hospitals (antithrombin, protein C, protein S deficiency and the factor V Leiden and prothrombin 20210A mutations). When an individual's status of these risk factors is known, the family history remains a risk indicator. The analysis confirmed the multicausal nature of venous thrombosis: multiple risk factors need to be present for venous thrombosis to occur. We therefore concluded that in clinical practice the family history may be more useful for risk assessment than testing single and rare genetic factors.

Genetic profiling will be the future approach to assessing genetic susceptibility. In Chapter 7 we describe a proof of principle study, including 18 SNPs associated with venous thrombosis that were genotyped in the LETS and MEGA studies. These SNPs were selected from the overview in Chapter 3 and the newly identified variants in Chapter 5. Although there was a clear dose-response relationship between risk-increasing genotypes and occurrence of venous thrombosis, we were not able to reach satisfactory discrimination between those who developed venous thrombosis and those who did not. We did, however, not yet include all known variants and new variants might be identified in the future. Inclusion of more genetic variants may improve discrimination and eventually lead to tailor-made risk prediction based on the genetic profile. Application of genetic profiling will probably not be efficient in a general population, but may guide decisions about prophylaxis or even avoidance of exposure in high-risk situations caused by strong environmental triggers.

In conclusion, the work presented in this thesis has added to our knowledge of the contribution of genetic variants to the development of venous thrombosis. Some of these variants are located in genes that were, so far, not known to be involved in coagulation. From a clinical perspective we appreciated the family history as an easy and valuable tool to assess genetic susceptibility at present and explored genetic profiling, which in theory should perform better than the family history, as a future clinical tool.

## SAMENVATTING

Veneuze trombose wordt veroorzaakt door bloedstolling in de venen, meestal de dieper gelegen venen in het been. Het stolsel sluit het bloedvat gedeeltelijk of geheel af, wat leidt tot zwelling van het been, pijn en een rode kleur. Naast pijnlijk en beperkend kan veneuze trombose levensbedreigend zijn wanneer een deel van het stolsel loslaat en met de bloedstroom meegevoerd wordt naar de longen. Als er zo een longslagader afgesloten wordt spreken we van een longembolie. Veneuze trombose komt bij ongeveer één op elke 1000 personen per jaar voor. Risicofactoren voor veneuze trombose kunnen zowel verworven als genetisch zijn; meestal is het een combinatie van een verhoogde stollingsneiging en een risicofactor vanuit de omgeving.

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het identificeren en evalueren van vaak voorkomende genetische varianten die bijdragen aan de erfelijke aanleg om veneuze trombose te ontwikkelen. Daarnaast bestudeerden we de klinische bruikbaarheid van deze varianten bij het voorspellen van veneuze trombose.

Algemeen erkende genetische risicofactoren voor veneuze trombose zijn deficiënties van de stollingsremmende eiwitten antitrombine, proteïne C en proteïne S, en de meer frequente factor V Leiden en protrombine 20210A mutaties. In de laatste tien jaar is er veel vooruitgang geboekt in het onderzoeksveld genetische epidemiologie en zijn vele varianten beschreven die het risico op veneuze trombose mogelijk beïnvloeden. Hoofdstuk 3 van dit proefschrift geeft een literatuuroverzicht van de belangrijkste bevindingen. Hieruit concludeerden we dat de algemene regel dat nieuwe associaties bevestigd moeten worden in andere studie populaties van groot belang is bij genetische associatiestudies. Daarnaast is de kans dat een genetische variant daadwerkelijk een risicofactor is, en geen vals positieve bevinding, sterk verhoogd wanneer een intermediair fenotype aangewezen kan worden dat geassocieerd is met zowel het genotype als de ziekte.

Een van de varianten die uitgebreid bestudeerd zijn is het 677 C>T “single nucleotide” polymorfisme (SNP) in het gen dat codeert voor 5,10-methyleentetrahydrofolaat reductase (*MTHFR*). Deze SNP is geassocieerd met homocysteïne spiegels, die op hun beurt geassocieerd zijn met veneuze trombose. Het is echter onduidelijk of deze laatste relatie causaal is. In het kader van deze discussie zou een associatie tussen de *MTHFR* SNP en veneuze trombose bewijs aanleveren voor causaliteit, omdat het genotype de eiwitspiegels (en zo de ziekte) kan beïnvloeden, maar niet andersom. In Hoofdstuk 4 onderzochten we de *MTHFR* SNP in de “Multiple Environmental and Genetic Assessment of Risk Factors for Venous Thrombosis” (MEGA Studie), een patiënt-controle onderzoek binnen 4375 patiënten en 4856 controlepersonen. We vonden geen associatie tussen de *MTHFR* SNP en veneuze trombose. De studie leverde dus geen bewijs voor een causale relatie tussen homocysteïne en veneuze trombose, en de *MTHFR* SNP lijkt geen risicovoorspeller voor veneuze trombose.

Nieuwe genetische varianten zochten we door middel van een grote SNP-associatiestudie in drie patiënt-controle onderzoeken naar veneuze trombose, beschreven in Hoofdstuk 5. De eerste studie, de “Leiden Thrombophilia Study” (LETS), bevatte 443 patiënten en 453 controlepersonen en werd gebruikt om potentiële trombosegeassocieerde varianten te identificeren. SNPs die in LETS geassocieerd waren met veneuze trombose werden vervolgens in twee substudies van de MEGA Studie getest. Deze studie voegde zeven SNPs toe aan de lijst van varianten die mogelijk bijdragen aan de erfelijke aanleg voor veneuze trombose. Twee van deze SNPs, in de genen *CYP4V2* en *F9*, hebben we nader bestudeerd. Het *CYP4V2* gen bevindt zich naast de genen die coderen voor kallikreïne (*KLKB1*) en stollingsfactor XI (*F11*). Zoals beschreven in Hoofdstuk 5, vonden we extra varianten in die regio die geassocieerd waren met zowel factor XI spiegels als veneuze trombose. De SNP in *F9* is al sinds de jaren 80 bekend als *F9* Malmö, maar werd nog nooit in relatie gebracht met veneuze trombose. *F9* Malmö is een missense SNP en veroorzaakt een aminozuurverandering in het gedeelte

van stollingsfactor IX dat afgeknipt wordt om het eiwit te activeren. In het onderzoek beschreven in Hoofdstuk 6 bestudeerden we of de associatie werd verklaard door linkage met vlakbij gelegen SNPs, maar geen van de geteste SNPs was sterker geassocieerd met veneuze trombose dan *F9* Malmö. Verder onderzochten we of *F9* Malmö het risico op trombose beïnvloedt via factor IX spiegels gemeten in LETS en MEGA, of activering van factor IX, gemeten in de Northwick Park Heart Study II. We vonden echter geen bewijs voor een effect van *F9* Malmö op factor IX spiegels of functie.

Twee andere SNPs uit de SNP-associatiestudie bevonden zich in de genen coderend voor stollingsfactor V (*F5*) en antitrombine (*SERPINC1*), beide bekende stollingseiwitten. Ook al weten we de functie van deze eiwitten in de stollingscascade, we weten nog niet hoe deze SNPs het risico op veneuze trombose beïnvloeden. De SNP in *GP6* (codeert voor een collageenreceptor op bloedplaatjes, GPVI) is geassocieerd met plaatjesaggregatie en stolselvorming. We weten dat bloedplaatjes betrokken zijn bij arteriële stolling, maar er is niet zo veel bekend over hun rol bij veneuze stolling.

Drie SNPs uit de SNP-associatiestudie bevonden zich in genen waarvoor we binnen de stolling (nog) geen functie weten: *RGS7*, *NR1I2* en *NAT8B*. Er bevinden zich ook geen bekende stollingsgenen in de buurt van deze genen. Bevestiging van deze associaties in andere studiepopulaties leidt mogelijk tot nieuwe kennis over de etiologie van veneuze trombose.

Het klinische aspect van genetische varianten bij veneuze trombose werd behandeld in twee hoofdstukken. In Hoofdstuk 1 onderzochten we de familieanamnese als risico-indicator voor veneuze trombose en marker voor genetische risicofactoren in de MEGA Studie. Een positieve familieanamnese is matig geassocieerd met de aanwezigheid van de klassieke genetische risicofactoren die regelmatig getest worden in veel ziekenhuizen (antitrombine, proteïne C en proteïne S deficiëntie, en de factor V Leiden en protrombine 20210A mutaties). Ook wanneer de status van deze risicofactoren bekend is blijft de familieanamnese een risico-indicator. Dit

onderzoek bevestigde de multifactoriële etiologie van veneuze trombose: meer dan één risicofactor moet aanwezig zijn voordat veneuze trombose optreedt. Wij concludeerden daarom dat in de kliniek de familieanamnese mogelijk zinvoller is voor het schatten van het risico op veneuze trombose dan het testen van afzonderlijke en zeldzame genetische factoren.

Het maken van een genetisch profiel zal in de toekomst belangrijker worden in het vaststellen van de genetische aanleg om veneuze trombose te ontwikkelen. In Hoofdstuk 7 beschrijven we een “proof of principle” studie waarin we 18 trombosegeassocieerde SNPs getest hebben in de LETS en MEGA studies. Deze SNPs waren geselecteerd uit het overzicht van Hoofdstuk 3 en aangevuld met nieuwe varianten uit Hoofdstuk 5. We hebben alleen SNPs in het model gesloten waarvan we op het moment van analyseren de genotypen hadden bepaald. Er was een duidelijke dosisrespons relatie tussen risicoverhogende genotypen en het optreden van veneuze trombose, maar de 18 SNPs maakten nog niet voldoende onderscheid tussen diegenen die veneuze trombose ontwikkelden en diegenen die dat niet deden. We hebben echter nog niet alle bekende varianten in het profiel gesloten en nieuwe varianten worden mogelijk nog ontdekt. Inclusie van meer genetische varianten verhoogt waarschijnlijk het onderscheid en zal mogelijk leiden tot individuele risicovoorspelling gebaseerd op het genetisch profiel. Het gebruik van een genetisch profiel zal waarschijnlijk niet efficiënt blijken in de algemene populatie, maar kan wel toegepast worden bij de afweging om profylaxe toe te passen bij blootstelling aan sterke omgevingsrisicofactoren, of zelfs het vermijden van blootstelling hieraan bij personen met een sterke genetische aanleg om veneuze trombose te ontwikkelen.

Concluderend kunnen wij zeggen dat het onderzoek beschreven in dit proefschrift kennis heeft toegevoegd aan wat wij weten van de bijdrage van genetische variatie aan de ontwikkeling van veneuze trombose. Sommige van deze varianten bevinden zich in genen die op dit moment geen bekende rol in de stolling hebben. Vanuit klinisch oogpunt beschouwen we de

familieanamnese op dit moment als een praktische en waardevolle methode om de genetische aanleg voor veneuze trombose in te schatten. Daarnaast verkenden we de mogelijkheid van het genetisch profiel, dat in theorie en mogelijk op termijn ook in de praktijk het risico beter zal voorspellen dan de familieanamnese.