

Enzyme/substrate interactions of the vitamin K-dependent carboxylase

Citation for published version (APA):

Ulrich, M. M. W. (1991). Enzyme/substrate interactions of the vitamin K-dependent carboxylase. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1991

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.

SUMMARY AND GENERAL DISCUSSION

Vitamin K-dependent carboxylase mediates the post-translational modification of specific glutamic acid residues into γ -carboxyglutamic acid (Gla) residues. The membrane bound enzyme system is located in the rough endoplasmic reticulum (RER) of a wide variety of cells and it utilizes vitamin K as a cofactor. The biologically active hydroquinone is obtained after reduction of vitamin K. This reaction, which is catalyzed by a reductase, takes place in all carboxylase containing tissues known. Two types of reductases are known to catalyze the reduction of vitamin K in vitro, the dithiothreitol (DTT)-dependent reductase(s), and the NAD(P)H-dependent reductase. The physiological counterpart of DTT has not been identified yet. In this thesis we describe the interaction of various substrates and inhibitors with the vitamin K-dependent carboxylase and its accessory reductases. When the work was started, little was known about the presence of the vitamin K-dependent enzyme system in extrahepatic tissues, and neither we knew the mechanism of substrate recognition and the action of inhibitors. Our early attempts to elucidate the characteristics of the vitamin K-dependent carboxylase in various tissues are described in chapter 2. In the subsequent chapters we describe the work that has been done after the discovery of the γ -carboxylation recognition site in the propeptide of the Gla-containing proteins.

The DTT-dependent reductase is inhibited by coumarin derivatives like warfarin. It has been shown that the effect of coumarin derivatives on the Gla-

containing blood coagulation factors can be overcome by high doses of vitamin K quinone. The NAD(P)H-dependent reductase which is sensitive for coumarin derivatives will under these conditions convert the quinone form of the vitamin into the hydroquinone form. The NAD(P)H-dependent reductase is not detectable in osteoblast-like cells (chapter 2) which may explain why the action of warfarin in bone cannot be counteracted by the administration of high doses of vitamin K quinone. Coumarin derivatives do not only have an effect on the Gla-containing proteins synthesized in the liver (blood coagulation factors) and osteoblasts (osteocalcin and MGP) but also on the synthesis of Gla-containing proteins in other tissues. We demonstrated the accumulation of non-carboxylated precursor proteins in liver, kidney and spleen of horses treated with warfarin. We have also shown that upon the administration of salicylate endogenous precursor proteins accumulate in liver as well as in lung and that this drug, similar to coumarin derivatives, blocks the DTT-dependent vitamin K-reductase. The inhibition of the reductase by coumarin derivatives and salicylate has been demonstrated to be cumulative in *in vitro* carboxylation reactions. Although it is still unclear which Gla-containing proteins are synthesized in the extra-hepatic carboxylase-containing tissues, our results suggest that, the synthesis of these proteins is inhibited by treatment with drugs that inhibit the recycling of vitamin K. Further investigation of the extra-hepatic Gla-containing proteins may elucidate the effect of anti-coagulant therapy on physiological processes other than the blood coagulation. Although salicylate is only a weak inhibitor of the reductase, care should be taken by patients taking oral anti-coagulant therapy because of the cumulative effect of both drugs. Several Gla-containing proteins have been isolated, among them are the plasma proteins prothrombin, factors VII, IX and X, Proteins C, S, and Z and the bone proteins osteocalcin and matrix Gla protein. Substrates based upon sequence homology with these proteins have been synthesized to be able to study the carboxylation reaction *in vitro*. The pentapeptides FLEEV and FLEEL, based upon amino acids 4-9 in bovine prothrombin and factor VII, are used most frequently. Because of the high apparent K_m values, however, we assume that these synthetic substrates do not contain a recognition site. We discovered that, in their descarboxy form, some naturally occurring Gla-proteins may form far better substrates for the enzyme than the pentapeptides. Substrates like fragment Su (amino acid 13 to 29 of descarboxy prothrombin), bovine d-osteocalcin and d-sperm Gla protein were shown to have apparent K_m values 2 to 3 orders of magnitude lower than those of FLEEL and FLEEV. Not all substrates derived from naturally occurring proteins did have comparable high affinities for the enzyme. Descarboxy prothrombin, for

instance, is hardly carboxylated and only after digestion with subtilisin a fragment (fragment Su) is obtained which has a low apparent K_m value. Also d-osteocalcins derived from bones of monkey, chicken or man were shown to have a lower affinity for the carboxylase than the bovine descarboxy protein, although the amino acid sequence of osteocalcin are highly conserved among these species. Apparently the alteration of two amino acids of opposite charge at positions 3 and 4 in neutral amino acids substantially reduces their suitability as a substrate for carboxylase. Chicken osteocalcin which has one positively charged amino acid and one neutral amino acid at positions 3 and 4 demonstrated intermediate substrate activity. It seems plausible therefore, to suggest that the amino acids of opposite charge at position 3 and 4, about 15 amino acids before the first Gla residue, do play an important role in substrate recognition.

To study whether the recognition site of the substrates in all carboxylase-containing tissues have to fulfil the same requirements, we used the following approach: proteins synthesized in different tissues were decarboxylated and studied in homologous and heterologous enzyme systems and compared with a nonselective substrate pentapeptide FLEEL. The proteins used were osteocalcin (synthesized in the osteoblasts), sperm Gla protein (probably synthesized in testis), and fragment Su (derived from prothrombin which is synthesized in the liver). The enzyme systems used were derived from liver, kidney, lung and testis. The K_m^{app} values of FLEEL and d-osteocalcin, which were determined only in heterolog systems, were fairly constant, whereas the K_m^{app} for d-sperm Gla protein and d-fragment Su varied more. The affinity for the homologous enzymes turned out to be the highest. From the data described here it is plausible to assume that the mature Gla-containing protein does contain a gamma-glutamyl carboxylase recognition site. However, the actual amino acid sequence important for this role has to be elucidated yet.

Besides the putative recognition site inside the mature protein another sequence has been demonstrated to be important for recognition by carboxylase. The precursor form of the Gla-containing proteins contain a leader sequence. This leader peptide contains a signal peptide which is required for the translocation of the nascent polypeptide through the membrane of the RER, and a propeptide. The latter was shown to direct γ -glutamyl carboxylation in recombinant factor IX. We studied the effect of the propeptide, indicated as amino acid residues -18 to -1 of the two coagulation factors, on the carboxylation of synthetic peptides (chapter 3). Pro-containing peptides based upon amino acid sequences of human prothrombin and factor IX were carboxylated readily, with apparent K_m values 3 orders of magnitude

lower than that of FLEEL. Although the propeptides of profactor IX and prothrombin showed the same affinity for the enzyme, the substrates containing the prothrombin recognition site are carboxylated more efficiently. To determine the size of the recognition site, peptides were synthesized in which alterations were made in the propeptide region. Mutations made at the NH₂ terminus (-18 to -10) had a great impact on the carboxylation of the peptides whereas mutations made at -4 and -1 did not alter the affinity for carboxylase. It is widely accepted now that the amino acids -18 to -10 are important for the recognition of the substrates by carboxylase. The pentapeptide FLEEL which is lacking this recognition site is carboxylated minimally and only the first glutamic acid residue is converted into Gla. To elucidate whether in the pro-containing substrates both adjacent Glu residues are carboxylated or not, peptides were synthesized in which one of them was substituted by alanine. The rate of incorporation of CO₂ into both substrates was the same, and slightly lower than that of the two Glu-containing peptides. When the alanine residues in those peptides were replaced by aspartic acid residues, the same results were obtained, suggesting that aspartic acid residues do not inhibit the carboxylation of adjacent glutamic acid residues. Peptides containing two aspartic acid residues instead of glutamic acid did show some incorporation of CO₂, but only 1% compared to the incorporation of CO₂ in the glutamic acid-containing peptide. An analog of homoglutamic acid (carboxymethylcysteine) could not be carboxylated at all, demonstrating that the vitamin K-dependent carboxylase requires a precise location of the carbon atom to be carboxylated.

In chapter 4 a new method to purify the vitamin K-dependent carboxylase is described. In this method the high affinity of carboxylase for the propeptide is used. Propeptide linked to a resin, CNBr-activated sepharose or activated thiol-sepharose, is able to bind the carboxylase. The enzyme can be eluted from the resins by washing the column with propeptide or in case of the thiol-sepharose, with a reducing agent like dithiotreitol. Both approaches yielded an enzyme preparation in which the contaminating protein BiP formed a substantial amount of the protein present. Nevertheless, this method gave a considerable purification (about 100 times over partially purified microsomes) in one single step. This product can be used as the starting material for further purification of the carboxylase. Recently the group of Stafford has published a paper in which they describe the complete purification of the enzyme with a technique based upon this method.

Besides its effect on the affinity of the substrate for the enzyme, the propeptide induces a conformational change in the enzyme by which a high

affinity site for vitamin K hydroquinone is exposed to the surface (chapter 5). The amino acid at position -16 in the propeptide that was shown to be of major importance for substrate recognition, does not play a role in the exposure of this high affinity site for KH₂. The propeptide by itself can not accomplish this conformational change, it has to be covalently linked to the carboxylatable substrate.

Chapter 6 of this thesis describes the unusual stability of a Gla-containing protein in bone. Osteocalcin is very stable if it is bound to the hydroxyapatite matrix of the bone. We found that the antigen of the protein is still present in bovid bone over 13 million years old, even the gamma-carboxy glutamic acid residues could be detected. Also human bone of younger age has been demonstrated to contain the intact or nearly intact protein. Extraction, purification and amino acid sequence determination of osteocalcin from fossil bones may attribute to study the phylogeny of extinct species.

Samenvatting

Vitamine K-afhankelijke carboxylase is een enzym dat betrokken is bij de post-translationele modificatie van specifieke glutaminezuur residuen in γ -carboxyglutaminezuur (Gla) residuen. Het membraan gebonden enzym-systeem bevindt zich aan de lumenale zijde van het ruwwandig endoplasmatisch reticulum (RER) van een groot aantal weefsels. Na reductie wordt het biologisch actieve vitamine K hydroquinon verkregen. Deze reactie wordt gekatalyseerd door vitamine K quinon reductases. In vitro kunnen deze reductases gestimuleerd worden door NADH of NADPH (NAD(P)H-afhankelijke reductase) of door dithiothreitol (DTT-afhankelijke reductase(s)). De fysiologische tegenhanger van DTT is nog niet geïdentificeerd. De reductie van vitamine K quinon vindt plaats in alle carboxylase bevattende weefsels. In dit proefschrift beschrijven we de interactie van verschillende substraten en remmers met het vitamine K-afhankelijke carboxylase en zijn bijbehorende reductases. Bij de aanvang van het hier beschreven werk was weinig bekend van het voorkomen van het vitamine K-afhankelijke enzym systeem in extra-hepatische weefsels, evenmin was het mechanisme van substraat herkenning en de werking van remmers in de carboxylase bevattende weefsels bekend. Onze eerste pogingen om de karakteristieken van het vitamine K-afhankelijke carboxylase in verschillende weefsels op te helderen staan beschreven in hoofdstuk 2. In de hoofdstukken 3 tot en met 6 staat het werk beschreven dat gedaan is na de ontdekking van de herkenningsplaats voor carboxylase in het propeptide van de Gla-bevattende eiwitten.

Het DTT-afhankelijke reductase wordt geremd door coumarine derivaten zoals warfarine. Toediening van hoge dosis vitamine K kan het effect van de coumarine derivaten op de Gla-bevattende bloedstollings-eiwitten teniet doen. Het NAD(P)H-afhankelijke reductase dat ongevoeliger is voor coumarine derivaten zal vitamine K quinon omzetten in de hydroquinon vorm. Het NAD(P)H-afhankelijke reductase is niet aantoonbaar in osteoblast-achtige cellen (hoofdstuk 2). Dit verklaart waarom het effect van warfarine in botweefsel niet opgeheven kan worden door toediening van grote hoeveelheden vitamine K.

Coumarine derivaten hebben niet alleen een effect op de Gla-bevattende eiwitten welke gesynthetiseerd worden in de lever (bloedstollingsfactoren) en osteoblasten (osteocalcine en MGP), maar ook op de synthese van Gla-bevattende eiwitten in andere weefsels. Wij hebben aangetoond dat niet-gecarboxyleerde precursor eiwitten ophopen in lever, nier en milt van paarden

na behandeling met warfarine. Ook toediening van salicylzuur aan ratten heeft tot gevolg dat endogene precursor eiwitten accumuleren in de lever en de longen. Net als coumarine derivaten blokeert salicylzuur het DTT-afhankelijke reductase. De remming van het reductase door coumarine derivaten en salicylzuur is cumulatief in de in vitro carboxyleringsreactie. Ofschoon het nog niet duidelijk is welke Gla-bevattende eiwitten in de extra-hepatische carboxylases bevattende weefsels gesynthetiseerd worden, laten onze resultaten zien dat de synthese van deze extra-hepatische Gla-bevattende eiwitten geremd worden door stoffen die de recycling van vitamine K blokkeren. Verder onderzoek naar de synthese van extra-hepatische Gla-bevattende eiwitten kunnen de invloed van anti-stollings therapie op fysiologische processen anders dan de bloedstolling ophelderen. Ofschoon salicylzuur maar een zwakke remmer van de DTT-afhankelijke reductase is, dienen patiënten op orale anti-stollings therapie voorzichtig te zijn met deze stof vanwege het cumulatieve effect van beide medicijnen.

Verschillende Gla-bevattende eiwitten zijn reeds geïsoleerd, waaronder de plasma eiwitten prothrombine, de stollingsfactoren VII, IX en X, proteïne C, S en Z en de bot eiwitten osteocalcine en matrix Gla proteïne. Om de vitamine K-afhankelijke carboxyleringsreactie in vitro te bestuderen zijn verschillende substraten gesynthetiseerd gebaseerd op aminozuur sequentie homologie in de verschillende Gla-bevattende eiwitten. De meest gebruikte synthetische substraten FLEEL en FLEEV zijn gebaseerd op de amino zuren 4 tot 9 van respectievelijk bovine factor VII en prothrombine. Op grond van de hoge K_m waarden mogen we aannemen dat deze peptiden geen herkenningsplaats voor het carboxylase bevatten. Sommige substraten verkregen uit gedecarboxyleerde Gla-bevattende eiwitten bleken een veel grotere affiniteit voor het enzym te bezitten. Substraten zoals fragment Su (aminozuur 13 tot 29 van descaboxy prothrombine), bovine d-osteocalcine en d-sperma Gla proteïne hebben K_m^{app} waarden drie orders van grootte lager dan deze van FLEEL en FLEEV. Niet alle substraten verkregen van natuurlijk voorkomende Gla-bevattende eiwitten hebben dezelfde hoge affiniteit voor het enzym. De gedecarboxyleerde vorm van prothrombine wordt nauwelijks gecarboxyleerd, pas na degradatie met het proteolytische enzym subtilisine wordt een fragment (fragment Su) verkregen dat een lage K_m voor carboxylase heeft. Ook de d-osteocalcines verkregen uit botten van apen, kippen en mensen hebben een hogere K_m waarde dan het bovine d-osteocalcine ofschoon de aminozuur sequentie van de verschillende osteocalcines grote homologie vertonen. De verandering van twee aminozuren van tegengestelde lading op de plaatsen 3 en 4 in het eiwit in twee neutrale aminozuren heeft een groot effect op de carboxylering. Kippen osteocalcine dat

op deze plaats een positief geladen en een neutraal aminozuur bevat, bleek na decarboxylering een substraat op te leveren met een affiniteit die ligt tussen die van bovine d-osteocalcine (aminozuren 3 en 4 met tegengestelde lading) en van humaan en aap d-osteocalcine (aminozuren 3 en 4 beide neutraal). Deze vinding suggereert dat de twee aminozuren met tegengestelde lading op posities 3 en 4 een belangrijke rol spelen in substraat herkenning. Of de herkenningsplaats van de substraten in alle carboxylase-bevattende weefsels aan dezelfde eisen moeten voldoen hebben we op de volgende wijze bestudeerd: eiwitten die in verschillende weefsels worden gesynthetiseerd werden gedecarboxyleerd en bestudeerd in homologe en heterologe enzym systemen en vergeleken met het niet selectieve substraat FLEEL. De eiwitten die hiervoor gebruikt werden waren d-osteocalcine (gesynthetiseerd in osteoblasten), d-sperma Gla proteïne (waarschijnlijk gesynthetiseerd in testes) en d-fragment Su (afkomstig van prothrombine dat gesynthetiseerd wordt in de lever). Deze substraten werden gebruikt in de enzym systemen afkomstig uit lever, nier, long en testes. De Km waarden voor FLEEL en d-osteocalcine, beide gebruikt in heterologe systemen, waren nagenoeg constant in alle weefsels. De Km voor d-sperma Gla proteïne en d-fragment Su daarentegen varieerde meer. De affiniteit van deze substraten bleek het grootst te zijn voor het enzym afkomstig uit het homologe weefsel. Uit de door ons beschreven resultaten lijkt het aannemelijk dat het Gla-domein van het rijpe eiwit een herkenningsplaats bezit voor het carboxylase. De aminozuur sequentie die van belang is voor deze rol moet echter nog opgehelderd worden.

Behalve de herkenningsplaats in het Gla domein van het rijpe eiwit is er nog een andere aminozuur sequentie waarvan is aangetoond dat het een belangrijke rol speelt in de herkenning door carboxylase. Deze herkenningsplaats is gelegen in de leader-sequentie van het precursor eiwit. De leader-sequentie bestaat uit een signaal-peptide, dat nodig is voor de translocatie van de groeiend polypeptide keten door de wand van het RER, en een propeptide. Experimenten met recombinant stollingsfactor IX hebben aangetoond dat het propeptide nodig is voor de carboxylering van Glu. Wij hebben het effect van het propeptide (aangeduid als aminozuren -18 tot -1) op de carboxylering van synthetische substraten bestudeerd (hoofdstuk 3). Propeptide-bevattende substraten gebaseerd op aminozuur sequenties van humaan prothrombine en factor IX zijn goede substraten met een affiniteit voor carboxylase die ca. duizend maal hoger is dan die van FLEEL. De propeptides van factor IX en prothrombine bezitten dezelfde affiniteit voor het enzym. Substraten die het propeptide van prothrombine bezitten worden echter efficiënter gecarboxyleerd dan substraten die het propeptide van factor IX bezitten. Om de grootte van de

herkenningsplaats te bepalen werden peptides gesynthetiseerd waarbij in het propeptide verschillende aminozuren werden veranderd. Veranderingen in het NH₂ terminale (-18 tot -10) deel propeptide hadden een grote invloed op de carboxyleringsgraad van het peptide terwijl mutaties aangebracht op positie -4 en -1 de affiniteit van het peptide voor carboxylase niet beïnvloedden. Tegenwoordig wordt aangenomen dat de aminozuren -18 tot -10 van belang zijn voor substraat herkenning en dat de aminozuren -4 tot -1 een rol spelen bij de herkenning door het propeptidase. Van het pentapeptide FLEEL, dat de herkenningsplaats voor carboxylase niet bezit, wordt tijdens de in vitro carboxyleringsreactie slechts een klein gedeelte gecarboxyleerd (minder dan 1%) en van dit Gla-bevattende peptide is ook alleen maar het eerste glutaminezuur residu omgezet in Gla. Om te bepalen of van de propeptide-bevattende substraten beide naast elkaar gelegen glutaminezuur residuen gecarboxyleerd kunnen worden, werden substraten gesynthetiseerd waarbij een van twee Glu's vervangen werd door Ala. De carboxyleringsreactie verliep even snel met beide substraten, maar de reaktiesnelheid lag iets lager dan de carboxyleringssnelheid voor het substraat dat twee glutaminezuur residuen bevatte. Dezelfde resultaten werden verkregen met substraten waarbij een van de twee glutaminezuur residuen werd vervangen door asparaginezuur. In het peptide waarin beide Glu residuen werden vervangen door asparaginezuur werd nauwelijks CO₂ geïncorporeerd (ca 1% van de hoeveelheid die wordt geïncorporeerd in Glu-bevattende substraten). Een analoog van homoglutaminezuur, carboxymethylcysteïne, kon geen CO₂ fixeren. Deze resultaten tonen aan dat het proton op het gamma C-atoom, dat tijdens de carboxyleringsreactie vervangen wordt door CO₂, binnen zeer kleine grenzen gelocaliseerd moet zijn.

Hoofdstuk 4 beschrijft een nieuwe methode om het vitamine K-afhankelijke carboxylase te zuiveren. Deze methode maakt gebruik van de hoge affiniteit van het carboxylase voor het propeptide. Propeptide gebonden aan een vaste drager, CNBr-geactiveerde sepharose of thiol-sepharose, is in staat carboxylase te binden. Het enzym kan, na intensief wassen, van de kolom geëluëerd worden met propeptide of in het geval van de thiol-kolom met reducerende middelen zoals dithiothreitol. Beide methodes leverden een enzym preparaat op dat nog grote hoeveelheden van het contaminerende eiwit B₁P bevatte. Desalniettemin geeft deze methode in een stap een aanzienlijke zuivering van het enzym. Het verkregen produkt kan gebruikt worden als begin materiaal voor verdere zuivering. Recentelijk heeft de groep van Stafford een artikel gepubliceerd waarin zij de volledige zuivering van het enzym beschreven met een techniek die gebaseerd is op de door ons beschreven methode.

In hoofdstuk 5 beschrijven we een ander effect dat het propeptide teweeg brengt, namelijk een conformatie verandering in het enzym waarbij een hoge affiniteitsplaats voor gereduceerde vitamine K ontstaat. Voor deze conformationele verandering speelt phenylalanine, dat een belangrijke rol speelt bij substraat herkenning, geen rol. Het propeptide alleen kan deze conformatie verandering niet bewerkstelligen, het propeptide dient covalent verbonden te zijn met het substraat.

In hoofdstuk 6 wordt een Gla-bevattend eiwit uit bot met een ongewone stabiliteit beschreven. Zolang dit osteocalcine gebonden zit aan de hydroxylapatite matrix van botten is het bijzonder stabiel. We hebben het antigeen van dit eiwit aan kunnen tonen in bovide botten van 13 miljoen jaar oud. Zelfs de Gla residuen waren nog steeds detecteerbaar. Uit humane botten van jongere leeftijd hebben we het eiwit kunnen isoleren en hebben we aangetoond dat het nog geheel of nagenoeg geheel intact was. Extractie, zuivering en aminozuur sequentie bepaling van dit eiwit uit fossiele botten kan een belangrijke bijdrage leveren tot de bestudering van de fylogenie van uitgestorven soorten.