

Protein-protein and protein-membrane interactions in prothrombin activation

Citation for published version (APA):

Riemsлаг-Govers, J. W. (1994). Protein-protein and protein-membrane interactions in prothrombin activation. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

Document status and date:

Published: 01/01/1994

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 9

Summary and Concluding Remarks

The conversion of prothrombin into thrombin is the pivotal reaction in blood coagulation. This reaction is catalyzed by the prothrombinase complex, that comprises the enzyme factor Xa, the protein cofactor Va, a procoagulant phospholipid surface and calcium ions. The proteins, prothrombin, factor Xa and factor Va bind with high affinity to procoagulant membranes. This binding increases the local concentration of the proteins on the membrane surface, which promotes the formation of the enzyme-cofactor-substrate complex and results in an increased rate of prothrombin activation.

Both the proteins and the procoagulant membrane have to meet specific requirements in order to enable the protein-membrane interactions responsible for the assembly of a functionally active prothrombinase complex. This thesis concerns a study of the importance of protein-membrane interactions for both the assembly and the activity of the prothrombinase complex. In the first part of this thesis the question is approached through the protein components of this complex and the second part of the thesis is focused on the significance of the physical- and chemical properties of the membrane surfaces for their activity in prothrombin activation.

In chapter 3 the structural and functional characterization of a prothrombin activator purified from the venom of the snake species *Bothrops neuwiedi* is described. This venom enzyme appears to be an effective prothrombin activator, which only cleaves the Arg₃₂₃-Ile₃₂₄ peptide bond in the prothrombin molecule thus converting it into meizothrombin. The activity of the venom prothrombin activator is not influenced by the presence of the accessory components of the prothrombinase complex, phospholipids and factor Va. The prothrombin activator is single chain protein with an apparent molecular weight of 60,000. It is a metalloproteinase and, therefore, belongs to a different class of proteolytic enzymes than the physiological prothrombin activator factor Xa, which is a serine protease. The venom activator from *Bothrops neuwiedi* appears to be structurally and functionally similar, however, to the prothrombin activators present in the venoms of *Echis carinatus* and *Dispholidus typus*.

Chapter 4 concerns the purification and characterization of the prothrombin activator from the venom of *Notechis scutatus*. This enzyme strongly resembles factor Xa. This venom prothrombin activator can cleave both the Arg₃₂₃-Ile₃₂₄ and Arg₂₇₄-Thr₂₇₅ bonds of prothrombin and is, therefore, able to convert prothrombin into thrombin. The formation of two different intermediates (prethrombin 2 and meizothrombin) is observed. This shows that the venom activator can activate prothrombin via two pathways, which

are distinguished by the order at which the Arg³²³-Ile³²⁴ and Arg²⁷⁴-Thr²⁷⁵ bonds are cleaved during prothrombin activation. The prothrombin activator from *Notechis scutatus* has a molecular weight of 54,000. Like factor Xa, this venom activator consists of a light chain and a heavy chain linked to each other by a disulfide bridge. The activator is classified as a serine protease since its prothrombin-converting activity is inhibited by soy-bean trypsin inhibitor, diisopropylfluorophosphate and dansyl-GGACK chloromethyl ketone. The venom activator from *Notechis scutatus scutatus* is stimulated by the accessory components factor Va and phospholipids. The stimulating effect of phospholipids has led to the discovery of γ -carboxy-glutamic acid residues (Gla's) in the polypeptide chain of the snake venom prothrombin activator. The mechanism by which this venom activator binds to procoagulant membranes may therefore be similar to that by which vitamin K-dependent coagulation factors bind. It also indicates that this snake possesses a carboxylation system which converts the amino acid Glu into Gla in a posttranslational modification.

The presence of γ -carboxyglutamic acid residues in the polypeptide chains of coagulation factors is essential for the binding of these proteins to the phospholipid surface. But the procoagulant membrane also has to meet a number of requirements. Membranes, which contain the negatively charged phosphatidylserine have the highest prothrombin-converting activity. The high activity of phosphatidylserine-containing membranes in prothrombin activation is attributed to the important role of the amino group of phosphatidylserine in the binding of the vitamin K-dependent coagulation factors to the membrane. The formation of a chelate complex, with a structure that resembles the calcium-EDTA complex, has been proposed as a model for the vitaminK-dependent protein-Ca²⁺-membrane complex when the procoagulant membrane contains phosphatidylserine.

This model is supported by the experiments that are reported in chapter 6. In this chapter the influence of the chemical structure of the polar headgroup of the phospholipid molecules on prothrombin activation is described. Not only the surface charge appears to be important for the binding of coagulation factors, but also the chemical nature of the negatively charged phospholipid molecule. Membranes, which derive their negative charge from phospholipid molecules with different polar headgroups, e.g. phosphatidylglycerol, phosphatidylethanolamine and phosphatidic acid have a less stimulating effect upon prothrombin activation than membranes which contain phosphatidylserine. In chapter 6 it is also shown that the stimulating effect of negatively charged membrane surfaces on prothrombin activation is

not strictly dependent on the presence of a phosphate group. Membranes which contain a carboxyl- or a sulfate group instead of a phosphate group as anionic moiety are also able to promote the formation of a functionally active prothrombinase complex. However, the prothrombin-converting activity of these membranes is inhibited at high ionic strength and the stimulation of prothrombin activation by these membranes is less than in the case of membranes which contain phosphatidylserine. Both higher lipid concentrations and a higher anionic lipid content are required for optimal activity. It has been postulated that electrostatic interactions between prothrombin, factor Xa and the membrane significantly contribute to the assembly of a catalytically active prothrombinase complex on membranes which contain anionic lipids other than phosphatidylserine. In the presence of factor Va, the structure of the negatively charged (phospho)lipid molecule becomes less important and the sensitivity towards ionic strength variation is less. Factor Va apparently compensates for the weak electrostatic protein-lipid interactions, presumably by additional interactions with prothrombin and factor Xa.

For many years it has been assumed that procoagulant membranes derive their functional activity from the presence of negatively charged phospholipids. The experiments presented in chapter 7, however, demonstrate that neutrally charged surfaces can also exhibit prothrombin-converting activity. Stimulation of prothrombin activation by neutral phosphatidylcholine membranes is particularly observed: (1) at low ionic strength, (2) in the presence of factor Va, (3) when the phosphatidylcholine molecules contain unsaturated fatty acyl side chains and, (4) in the presence of calcium ions. Both the activation of prothrombin 1 by factor Xa and the activation of prothrombin by Gla-domainless factor Xa are not stimulated by DOPC vesicles. The dependence on calcium as well as the requirement for the presence of Gla-domains in the vitamin K-dependent coagulation factors suggests that calcium dependent interactions between the Gla-domains of prothrombin and factor Xa and the DOPC surface are essential for the expression of the prothrombin-converting activity of DOPC membranes.

In chapter 8 the effect of variation of the physical properties of the procoagulant membranes on prothrombin activation is described. The composition of the hydrophobic part of the membrane, which is formed by the fatty acyl side chains of the phospholipid molecules, determines the fluidity of the membrane. Fluid membranes exhibit a higher prothrombin-converting activity than solid membranes both in the initial and steady state phase of prothrombin activation. In the initial phase of prothrombin

activation, a considerable lag in thrombin formation is observed on solid membranes (chapter 8). This lag phase is caused by the slower assembly of the factor XaVa complex on solid membranes. Compared with fluid membranes, prothrombin activation on solid membranes is not only impeded in the initial phase of prothrombin activation but also in the so-called steady state phase. From determination of the kinetic parameters it appears that this is due to a decrease of k_{cat} of prothrombin activation on solid membranes. The decrease of the k_{cat} is, however, not due to an effect of membrane fluidity on the active site of factor Xa since the activation of prothrombin 1 is stimulated to the same extent on solid and fluid membranes. Gelelectrophoretic analysis of product formation during prothrombin activation on solid membranes shows that the main reaction product formed is prothrombin 2. This observation is in contrast with prothrombin activation on fluid membranes on which only meizothrombin is formed as prothrombin activation intermediate. These data demonstrate that membrane fluidity influences the order of peptide bond cleavage in the prothrombin molecule. Solid membranes apparently cause a shift in the pathway of prothrombin activation. The non-active prothrombin 2 is formed and this results in a decreased rate of thrombin formation on solid membranes. A possible explanation for the observed shift in the pathway of prothrombin activation may be that the proteins involved in the prothrombin activation do not properly juxtapose after binding to a solid membrane, which may result in a decreased rate of thrombin formation.

The fatty acyl side chains of the phospholipid molecules not only determine the fluidity of the membrane, but also influence the packing density of a membrane. The distance between the phospholipid molecules in a membrane is increased when *cis* double bonds are present in the fatty acyl side chains. PS/PC membranes which are in the liquid crystalline phase (i.e. above the phase transition temperature) and which contain a low percentage PS, exhibit less prothrombin-converting activity when the phospholipid molecules contain saturated fatty acyl side chains. The reduced activity of saturated membranes appears to be caused by impeded factor XaVa complex formation. This difference between saturated and non-saturated membranes disappears either by introducing more PS in the membrane or by increasing the factor Va concentration. Since factor Va binding to membrane surfaces involves both hydrophobic and electrostatic interactions this suggests that a) the hydrophobic interaction of factor Va with the inner core of the membrane is hampered on membranes composed of phospholipid molecules with saturated fatty acyl side chains and that b) this

effect disappears on membranes with more phosphatidylserine is due to an increased contribution of electrostatic interactions, which compensate for the weak hydrophobic interactions.

Hoofdstuk 9

Samenvatting en Slotopmerkingen

De omzetting van protrombine in trombine is de centrale reactie in de bloedstolling. Deze reactie wordt gecatalyseerd door het protrombinase-complex, wat bestaat uit het enzym factor Xa, de eiwit cofactor Va, een stollingsbevorderend fosfolipide-oppervlak en calcium ionen. De eiwitten protrombine, factor Xa en factor Va binden met hoge affiniteit aan stollingsbevorderende membranen. Deze binding verhoogt de lokale concentraties van de eiwitten aan het membraanoppervlak wat de vorming van het enzym-cofactor-substraatcomplex bevordert en wat resulteert in een verhoogde snelheid van protrombine-activering.

De specifieke eiwit-lipide interacties stellen zowel voorwaarden aan de eiwitten als aan het stollingsbevorderende oppervlak. Dit proefschrift behandelt een studie naar het belang van eiwit-membraan-interacties voor protrombine-activering in modelsystemen en naar het werkingsmechanisme van het protrombinase complex. In het eerste gedeelte van het proefschrift vindt benadering van de vraagstelling plaats via de eiwitcomponenten van dit complex en in het tweede deel wordt ingegaan op het belang van de fysische en chemische eigenschappen van membraanoppervlakken voor hun activiteit in de protrombine-activering.

In hoofdstuk 3 van dit proefschrift wordt de structurele en functionele karakterisering beschreven van een protrombine-activator uit het gif van de slang *Bothrops neuwiedi*. Dit blijkt een effectieve protrombine-activator te zijn, die uitsluitend de peptidebinding Arg323-Ile324 in het protrombine-molecuul kan splitsen. Onder invloed van dit enzym wordt protrombine omgezet in meizotrombine en verdere activering stopt op dit niveau. De activiteit van deze protrombine-activator uit slangegif wordt niet beïnvloed door de aanwezigheid van de cofactoren van het protrombinasecomplex, fosfolipiden en factor Va. De protrombine-activator bestaat uit een polypeptideketen en heeft een relatief molecuulgewicht van ongeveer 60.000. Het is een metallo-protease en derhalve behoort het tot een andere enzymklasse als de fysiologische protrombine-activator factor Xa, wat een serineprotease is. De protrombine-activator van *Bothrops neuwiedi* blijkt echter zowel structureel als functioneel grote overeenkomst te vertonen met de protrombine-activatoren aanwezig in de giften van *Echis carinatus* en *Dispholidus typus*.

Hoofdstuk 4 behandelt de zuivering en karakterisering van de protrombine-activator uit het gif van de slang *Notechis scutatus scutatus*. Dit enzym vertoont grote overeenkomst met factor Xa. Deze protrombine-activator kan protrombine zowel op de Arg323-Ile324 als op de Arg274-Thr275 plaats splitsen en kan protrombine dus omzetten in trombine. Twee verschillende

tussenprodukten kunnen worden aangetoond: pretrombine 2 en meizotrombine. Dit houdt in dat er twee activeringsroutes gevolgd kunnen worden, die bepaald worden door de volgorde van splitsing van de peptidebindingen tijdens de activering van protrombine. De protrombine-activator van *Notechis scutatus scutatus* heeft een molecuulgewicht van 54.000 en bestaat evenals factor Xa uit een lichte en uit een zware keten, die geassocieerd zijn via een zwavelbrug. Op grond van remming door een trypsineremmer, door diisopropylfosfofluoridaat en door het chloromethylketon dansyl-GGACK is geconcludeerd dat dit enzym, evenals factor Xa, tot de serineproteasen behoort. De gifactivator van *Notechis scutatus scutatus* wordt gestimuleerd door aanwezigheid van de cofactoren factor Va en fosfolipiden. De stimulering door fosfolipiden heeft geleid tot de ontdekking van γ -carboxyglutaminezuurresiduen (Gla's) in de eiwitketen van de slangegif protrombine-activator. Het bindingsmechanisme van de vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren geldt daarom misschien ook voor de binding van deze gifactivator aan het oppervlak. Tevens houdt het in dat deze slang een carboxyleringssysteem bezit dat het aminozuur Glu via een posttranslationele modificatie omzet in Gla.

De aanwezigheid van γ -carboxyglutaminezuur in de eiwitketen van stollfactoren blijkt essentieel te zijn voor de binding van deze eiwitten aan fosfolipiden. Maar ook het stollingsbevorderend oppervlak moet aan een aantal eisen voldoen. Membranen, die het negatief geladen fosfatidylserine bevatten, vertonen de hoogste protrombinase-activiteit. De unieke stimulering van protrombine-activering door fosfatidylserine bevattende membranen wordt toegeschreven aan een belangrijke functie van de aminogroep van fosfatidylserine in de binding van vitamine K-afhankelijke stollingsfactoren aan het fosfolipide-oppervlak. De vorming van een chelaatcomplex, welke overeenkomst vertoont met de structuur van het calcium-EDTA-complex, is voorgesteld als model voor het vitamine K-afhankelijke eiwit-Ca²⁺-membraancomplex voor het geval dat fosfatidylserine deel uitmaakt van het stollingsbevorderend oppervlak.

Dit model wordt ondersteund door de experimenten die gerapporteerd worden in hoofdstuk 6. In dit hoofdstuk wordt de invloed beschreven van de chemische structuur van de polaire kop van de fosfolipidemoleculen waaruit het membraan is opgebouwd op protrombine-activering. Niet alleen de lading van het membraanoppervlak maar ook de chemische structuur van de negatief geladen fosfolipidemoleculen blijkt van belang te zijn voor de binding van de stollfactoren. Membranen die negatief geladen zijn door de aanwezigheid van fosfolipidemoleculen met verschillende polaire koppen,

zoals fosfatidylglycerol, fosfatidylethanolamine of fosfatidezuur zijn minder effectief in protrombine-activering dan fosfatidylserine-bevattende membranen. In hoofdstuk 6 wordt tevens aangetoond dat de stimulerende werking van negatief geladen membraanoppervlakken op de activering van protrombine niet noodzakelijkerwijs afhankelijk is van de aanwezigheid van een fosfaatgroep. Membranen met lipidemoleculen, die in plaats van een fosfaatgroep een carboxyl- of een sulfaatgroep bevatten, zijn ook in staat de vorming van een functioneel actief protrombinase-complex te bevorderen. De protrombine-activering op deze membranen is echter ionsterkte gevoelig en veel minder effectief dan PS-bevattende membranen. Tevens zijn zowel een hogere lipideconcentratie als een hoger percentage van deze anionische lipiden vereist voor optimale procoagulante activiteit. Er is gepostuleerd dat electrostatische interacties tussen protrombine, factor Xa en het membraan een belangrijke rol spelen in de assemblage van een catalytisch actief complex op membranen die een ander anionisch lipide bevatten dan fosfatidylserine. In aanwezigheid van factor Va, wordt de structuur van het negatief geladen (fosfo)lipidemolecuul echter minder belangrijk en neemt de zoutgevoeligheid ook sterk af. Factor Va compenseert klaarblijkelijk voor de zwakke electrostatische eiwit-lipide-interacties, mogelijk door additionele interacties met protrombine en factor Xa.

Jarenlang is men er vanuit gegaan dat stollingsbevorderende oppervlakken hun functionele activiteit verkrijgen door de aanwezigheid van negatief geladen fosfolipiden. Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 7 toont echter aan dat neutraal geladen oppervlakken ook in staat zijn de omzetting van protrombine in trombine te bevorderen. Stimulering van protrombine-activering door neutrale fosphatidylcholinemembranen treedt met name op: (1) bij lage ionsterkte, (2) in aanwezigheid van factor Va, (3) wanneer de fosphatidylcholinemoleculen onverzadigde vetzuurstaarten bevatten en, (4) in aanwezigheid van calcium-ionen. Zowel de activering van pretrombine 1 door factor Xa als de activering van protrombine door factor Xa zonder Gla-domein worden echter niet gestimuleerd door fosphatidylcholinevesicles. De calcium-afhankelijkheid in combinatie met de noodzakelijke aanwezigheid van Gla-domeinen in de vitamine K-afhankelijke stoffactoren wijst erop dat calcium-afhankelijke interacties tussen de Gla-domeinen van protrombine en factor Xa en het fosphatidylcholine oppervlak essentieel zijn voor de expressie van protrombine-activering op PC-membranen.

In hoofdstuk 8 wordt het belang beschreven van de fysische eigenschappen van de stollingsbevorderende oppervlakken voor de protrombine-activering. De samenstelling van het hydrofobe deel van het membraan, gevormd door de vetzuurstaarten van de fosfolipidemoleculen, bepaalt de vloeibaarheid van het membraan. Vloeibare membranen vertonen een hogere activiteit in protrombine-activering dan vaste membranen. In de beginfase van protrombine-activering op vaste membranen (hoofdstuk 8), wordt een toenemende omzettingssnelheid waargenomen. Deze blijkt veroorzaakt te worden door een vertraagde vorming van het factor Xa-factor Va complex op vaste membranen. In vergelijking met vloeibare membranen is protrombine-activering op vaste membranen niet alleen langzamer in de initiële fase, maar ook in de zogenaamde steady state fase. Uit bepaling van de kinetische parameters blijkt dat de k_{cat} op vaste membranen is verlaagd. Deze verlaging van de k_{cat} is echter niet het gevolg van een direct effect van membraanvloeibaarheid op het actieve centrum van factor Xa. Pretrombine 1 activering wordt door vaste en vloeibare membranen namelijk evenveel gestimuleerd. Analyse van produktvorming tijdens protrombine-activering op vaste membranen met behulp van gelelectroforetische technieken laat zien dat er voornamelijk pretrombine 2 gevormd wordt. Dit is in tegenstelling tot protrombine-activering op vloeibare membranen waarop in de initiële fase meizotrombine gevormd wordt. Deze resultaten tonen aan dat membraanvloeibaarheid van invloed is op de volgorde van splitsing van de peptidebindingen in het protrombinemolecuul. Membranen in de vaste fase veroorzaken een verandering van de activeringsroute van protrombine. Het niet actieve pretrombine 2 wordt gevormd, en dit heeft een verlaging van de trombinevormingssnelheid op vaste membranen tot gevolg. Een mogelijke verklaring voor de verandering van de activeringsroute zou kunnen zijn dat de bij de protrombine-activering betrokken eiwitten na binding aan een vast membraan niet de juiste positie ten opzichte van elkaar innemen, hetgeen een verlaging van de trombinevormingssnelheid van het enzym tot gevolg kan hebben.

De vetzuurstaarten van de fosfolipidemoleculen beïnvloeden niet alleen de vloeibaarheid, maar ook de pakkingsdichtheid van een membraan. De onderlinge afstand van de fosfolipidemoleculen in een membraan wordt verhoogd wanneer er cis-dubbele bindingen in de vetzuurstaarten aanwezig zijn. Vloeibare PS/PC-membranen, die een laag percentage PS bevatten, geven minder stimulering van protrombine-activering wanneer de vetzuurstaarten verzadigd zijn. De factor XaVa complexvorming blijkt

bemoeilijkt te zijn op verzadigde membranen met een laag percentage PS. De lagere snelheid van protrombine-activering op verzadigde membranen kan worden verhoogd, wanneer er meer PS geïntroduceerd wordt in het membraan of wanneer de factor Va concentratie in het activeringsmengsel verhoogd wordt. De factor Va binding aan het membraan is zowel afhankelijk van hydrofobe- als ionogene interacties. Membranen opgebouwd uit fosfolipide-moleculen met verzadigde vetzuurstaarten lijken de interactie van factor Va met het hydrofobe binnenste van het membraan te bemoeilijken. De invloed van de verzadigingsgraad van het membraan op de protrombine-activering neemt echter af, wanneer het PS-gehalte van het membraan wordt verhoogd. Dit effect is mogelijk te verklaren door een toenemende bijdrage van electrostatische interacties die de verminderde hydrofobe interacties compenseren.