

Structure and function of human coagulation factor V : a multidisciplinary approach combining bioinformatics and molecular biology

Citation for published version (APA):

Segers, K. (2008). Structure and function of human coagulation factor V : a multidisciplinary approach combining bioinformatics and molecular biology. Maastricht: Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

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.

Download date: 04 Dec. 2019

Summary

The coagulation cascade entails a series of enzymatic reactions in which coagulation factors, which circulate as inactive precursor molecules, are converted to active proteins that then catalyze the next reaction in the cascade. These activation reactions occur preferably on a negatively charged phospholipid surface, typically provided by the platelet membrane. This complex series of reactions is triggered by tissue factor, a subendothelial protein that is exposed together with the platelet activator collagen when the endothelial lining of the vascular wall is damaged.

An essential step in the coagulation cascade is the formation of the prothrombinase complex, which is a membrane-bound macromolecular complex that consists of the serine protease FXa and its non-enzymatic cofactor FVa. The prothrombinase complex effectively converts prothrombin to thrombin, which in turn converts soluble fibrinogen into fibrin polymers that stabilize the primary platelet plug. Under optimal conditions (i.e. in the presence of calcium ions and a negatively charged phospholipid surface), FVa accelerates FXa-catalyzed prothrombin activation over 100,000-fold compared with FXa alone. Since FVa plays such an important role in thrombin generation, proteolytic inactivation of FVa by activated protein C (APC) is a major physiological mechanism that regulates thrombin formation. Strict regulation of thrombin formation during haemostasis is a prerequisite to prevent inappropriate thrombus formation.

The research presented in this thesis focuses on the structure-function relationship of coagulation factor V, particularly regarding the regulation of its activities through interaction with thrombin, negatively charged phospholipids, and APC.

Chapter I provides an overview of the structure and functions of FV, with special emphasis on the activation of FV, the interaction of FV(a) with negatively charged phospholipid membranes and the inactivation of FVa by APC.

Chapter II describes inherited defects in FV that are considered as risk factors for thrombosis. Particular attention is given to the molecular mechanism by which FV polymorphisms contribute to APC resistance. Interactions with acquired risk factors that are known to synergistically increase the thrombotic risk that is related to FV genetic defects are also discussed.

In chapters III and IV, the proteolytic mechanism underlying the conversion of the inactive procofactor FV to the active cofactor FVa was studied. (Meizo)thrombin and FXa are the major physiological activators of FV, but several other proteases of different origin have been shown to activate FV. Of special interest are FV activators that are present in the venom of snakes belonging to the *Viperidae* family. In contrast to the physiological FV activators (meizo)thrombin and FXa,

which activate FV via three sequential cleavages in the B domain at Arg⁷⁰⁹, Arg¹⁰¹⁸ and Arg¹⁵⁴⁵, these snake venom proteases convert FV to a fully functional FVa molecule through a single cleavage at Arg¹⁵⁴⁵. Because of their specificity and their resistance to physiological inhibitors, snake venom FV activators are used in diagnostic tests for quantification of plasma FV levels and for screening of defects in the anticoagulant protein C pathway. In chapter III, we have predicted the three-dimensional structures of the FV activators that are present in the venom of Russell's and Levant's viper (RVV-V and LVV-V, respectively) via homology modeling. Both protein structures reveal several structural features that may account for the remarkable substrate specificity of RVV-V and LVV-V. Notably, two positively charged surface regions are present on opposite sides of the active site which we propose to form the exosites for FV interaction, similar to the two electropositive exosites in thrombin.

Both exosites of thrombin have been implicated in FV activation, but the relative importance of each exosite in the individual thrombin-catalyzed FV cleavages is unclear. In chapter IV, recombinant FV variants that can only be cleaved at one of the three activation cleavage sites were used in combination with thrombin exosite I- or exosite II-specific DNA aptamers to assess the contribution of each exosite to the individual thrombin-catalyzed activation cleavages in FV. Kinetic and SDS-PAGE analysis of the activation of FV cleavage mutants and plasma-derived FV by thrombin in the presence of aptamers indicate that thrombin exosite I is essential for cleavage at both Arg⁷⁰⁹ and Arg¹⁵⁴⁵, whereas thrombin exosite II appears to be particularly important for cleavage at Arg¹⁵⁴⁵. Moreover, activation studies with FV B domain deletion mutants show that an electronegative region in the B domain that precedes the Arg¹⁵⁴⁵ cleavage site is required for efficient FV activation by thrombin, RVV-V and LVV-V. Although recognition of the Arg¹⁵⁴⁵ cleavage site by RVV-V and LVV-V thus appears to be mediated by exosite-driven interactions, the nature of this interaction is likely different from that observed for thrombin because thrombin exosite-inhibitors did not inhibit FV activation by RVV-V and LVV-V.

Because thrombin generation by the prothrombinase complex is a crucial step in haemostasis, it is an attractive target for anticoagulant therapy. In chapter V, structure-based virtual ligand screening and high-throughput screening methods were applied to discover small-molecules that block the interaction of FV(a) with the phospholipid membrane and thus prevent prothrombinase complex assembly. Several small-molecules were identified that inhibit FXa-catalyzed prothrombin activation in a purified system. Direct binding experiments employing surface plasmon resonance with purified recombinant C2 domain and plasma-purified FVa light chain further confirmed that the identified compounds inhibit the interaction of the FV C2 domain with negatively charged phospholipids. These molecules may

serve as lead compounds for the development of a novel class of anticoagulant drugs and/or can be applied in structure-function studies on FV.

The activity of the prothrombinase complex is physiologically regulated by the protein C pathway via the proteolytic inactivation of FVa by APC. It has been shown that heparin alters the pathway of APC-catalyzed FVa inactivation by stimulation of the Arg³⁰⁶ cleavage and inhibition of the Arg⁵⁰⁶ cleavage. Several charged surface residues near the Arg³⁰⁶ and Arg⁵⁰⁶ cleavage site that might be important for the interaction of FVa with APC and heparin have been identified through computational docking studies. In chapter VI, the role of these charged amino acids in the inactivation of FVa by APC was investigated via a site-directed mutagenesis approach. Analysis of inactivation time courses of recombinant FV variants in which these residues were replaced by neutral or charge-reversed residues demonstrates that an extended region around the Arg⁵⁰⁶ cleavage site in FVa is involved in the interaction with APC. Furthermore, FVa residues Lys³²⁰, Arg³²¹ and Arg⁴⁰⁰ were found to be indispensable for the heparin-mediated stimulation of Arg³⁰⁶ cleavage by APC. These results suggest that heparin accelerates the APC-catalyzed inactivation of FVa at Arg³⁰⁶ by bridging the electropositive exosite of APC and the electropositive region in the FVa heavy chain comprising Lys³²⁰, Arg³²¹ and Arg⁴⁰⁰.

Finally, chapter VII summarizes and discusses the main results and conclusions of the data that are presented in this thesis.

Samenvatting

Het bloedstollingsproces bestaat uit een reeks opeenvolgende enzymatische reacties waarbij stoffactoren, die in een inactieve vorm in het bloed circuleren, worden geactiveerd. Deze activeringsreacties vinden bij voorkeur plaats op een negatief geladen fosfolipidenoppervlak, zoals dat van geactiveerde bloedplaatjes. De stolling wordt geïnitieerd door weefselfactor, een eiwit dat zich in de vaatwand bevindt en pas na beschadiging van de wand met het bloed in contact komt. Hierdoor wordt de eerste stoffactor van de cascade omgezet in een actieve vorm, die dan op zijn beurt de volgende factor activeert. Zo ontstaat een hele waterval van reacties waarbij de ene stoffactor na de andere wordt geactiveerd. Uiteindelijk wordt het oplosbare eiwit *fibrinogeen* door trombine omgezet in het onoplosbare *fibrine*. Dit fibrine vormt een verstevigend netwerk van vezels rond de bloedplaatjesprop die in een eerste fase van de stolling werd gevormd om het lek in de vaatwand te dichten.

Een belangrijke gebeurtenis tijdens het stollingsproces is de vorming van het *protrombinase-complex* op het bloedplaatjesoppervlak. Dit complex bestaat uit *geactiveerd factor X* (FXa) en zijn niet-enzymatische cofactor *geactiveerd factor V* (FVa). Het protrombinase-complex zorgt voor een efficiënte omzetting van protrombine in trombine, een reactie die door FXa wordt uitgevoerd. Het gevormde trombine zorgt op zijn beurt voor de omzetting van fibrinogeen in fibrine dat - zoals hierboven beschreven - voor de versteviging van de bloedplaatjesprop zorgt. Onder optimale omstandigheden (d.w.z. in de aanwezigheid van calcium en een negatief geladen fosfolipidenoppervlak) versnelt FVa de omzetting van protrombine door FXa ongeveer 100 000 keer in vergelijking met wanneer FXa alleen aanwezig is. FVa is dus zeer belangrijk voor de activiteit van het protrombinase-complex en het is daarom niet verwonderlijk dat de trombinevorming door het protrombinase-complex voornamelijk gecontroleerd wordt via de inactivering van FVa door *geactiveerd proteïne C* (APC). Een goede regulatie van de trombinevorming tijdens het stollingsproces is zeer belangrijk om de ongewenste vorming van bloedstolsels te voorkomen.

Het onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven heeft betrekking op het verband tussen de structuur en functies van factor V (FV), meer in het bijzonder de interacties met trombine, negatief geladen fosfolipiden en APC.

In hoofdstuk I wordt kort samengevat wat er reeds bekend is over de structuur en functie van FV. Hierbij wordt vooral aandacht besteed aan de activering van FV, de interactie van FV en FVa met een negatief geladen fosfolipidenoppervlak en de inactivering van FVa door APC.

Samenvatting

In hoofdstuk II worden afwijkingen in het FV-gen beschreven die voor een verhoogd trombose-risico zorgen. Daarbij wordt vooral ingegaan op FV-polymorfismen die leiden tot APC-resistentie en op het moleculaire mechanisme dat daaraan ten grondslag ligt. Bovendien worden ook verworven risicofactoren besproken waarvan bekend is dat ze synergistisch het tromboserisico van genetische FV-afwijkingen versterken.

In hoofdstukken III en IV is de proteolytische omzetting van de inactieve procofactor FV naar de actieve cofactor FVa bestudeerd. De fysiologische activatoren van FV zijn (meizo)trombine en FXa, maar er zijn ook eiwitten van niet-humane oorsprong bekend die FV activeren. Zo bevat het gif van sommige addersoorten (*Viperidae*) een protease dat FV zeer specifiek activeert. In tegenstelling tot (meizo)trombine en FXa, die drie peptidebindingen in het FV B-domein splitsen (namelijk na de aminozuren Arg⁷⁰⁹, Arg¹⁰¹⁸ en Arg¹⁵⁴⁵), activeren deze slangengif-eiwitten FV via één enkele 'knip' op positie 1545. Vanwege hun hoge specificiteit en de ongevoeligheid voor protease-remmers die in plasma circuleren, worden FV-activatoren uit slangengif gebruikt in diagnostische tests voor de bepaling van FV-waarden in plasma en voor het vaststellen van afwijkingen in het anticoagulante proteïne C-systeem.

In hoofdstuk III hebben we via homologie-modellering de driedimensionale structuur voorspeld van RVV-V en LVV-V, de FV-activatoren uit het gif van respectievelijk de Russell-adder en de Levantijnse adder. Beide eiwitstructuren vertonen een aantal structurele kenmerken die mogelijk bijdragen tot de opmerkelijk hoge substratspecificiteit van RVV-V en LVV-V. Zo zijn aan beide zijden van de actieve site twee positief geladen gebieden aanwezig die mogelijk betrokken zijn bij de interactie met FV, net zoals de twee positief geladen exosites van trombine.

Hoewel algemeen aangenomen wordt dat beide exosites van trombine een rol spelen in de activering van FV, was het vooralsnog onduidelijk in welke mate deze twee exosites bijdragen aan elk van de drie knippen die door trombine worden uitgevoerd tijdens de activering van FV. Om dit verder te onderzoeken hebben we in hoofdstuk IV gebruikgemaakt van recombinante FV-varianten die slechts op één van de drie activeringsplaatsen geknipt kunnen worden. De activering van deze FV mutanten door trombine werd gevolgd in de aanwezigheid van DNA-aptameren die specifiek aan één van de twee trombine-exosites binden. Een dergelijke aanpak maakt het mogelijk om de rol van de twee trombine-exosites in elk van de drie afzonderlijke knippen te bestuderen. De resultaten van de experimenten met de recombinante FV-varianten werden bevestigd door gel-electroforetische analyse van de activering van uit plasma gezuiverd FV door trombine in aan- en afwezigheid van de exosite-specifieke DNA-aptameren. Algemeen kan besloten worden dat trombine-exosite I belangrijk is voor de knippen na Arg⁷⁰⁹ en Arg¹⁵⁴⁵,

terwijl exosite II voornamelijk betrokken is bij de knip na Arg¹⁵⁴⁵. Verder werd ook de activering bestudeerd van FV-mutanten waarvan het B-domein helemaal of gedeeltelijk was verwijderd. Uit deze experimenten bleek dat een negatief geladen gebied dat zich net vóór de Arg¹⁵⁴⁵-knipplaats bevindt, noodzakelijk is voor de activering door zowel trombine als RVV-V en LVV-V. Dit doet vermoeden dat RVV-V en LVV-V gebruik maken van exosites voor de herkenning van de Arg¹⁵⁴⁵-knipplaats in FV. Desalniettemin is de interactie tussen de beide slangengifactivatoren en FV waarschijnlijk van een andere aard dan die tussen trombine en FV, aangezien de activering van FV door RVV-V en LVV-V niet wordt beïnvloed door trombine-remmende DNA-aptameren.

De omzetting van protrombine in trombine is een heel belangrijke reactie tijdens de bloedstolling, wat het protrombinase-complex tot een veelbelovend doelwit voor anticoagulante therapie maakt. In hoofdstuk V hebben we gebruikgemaakt van structurele bio-informatica om een grote verzameling chemische stoffen te screenen op moleculen die de interactie van FV of FVa met een negatief geladen fosfolipidenoppervlak verhinderen en zo de vorming van een functioneel protrombinase-complex voorkomen. Moleculen die op basis van hun driedimensionale structuur werden geselecteerd, werden dan op betrekkelijk kleine schaal getest in een gezuiverd systeem waarbij nagegaan werd of ze inderdaad de omzetting van protrombine in trombine door FXa remmen. Actieve moleculen werden vervolgens verder gekarakteriseerd via directbindingsproeven, waarbij gebruikgemaakt werd van oppervlakte-plasmon-resonantie in combinatie met gezuiverd recombinant C2-domein en de gezuiverde lichte keten van FVa. Deze proeven bevestigden dat de geïdentificeerde moleculen de interactie van het FV C2-domein met een negatief geladen fosfolipidenoppervlak voorkomen. Dergelijke moleculen kunnen als leidraad dienen voor de ontwikkeling van nieuwe anticoagulante geneesmiddelen en kunnen gebruikt worden bij onderzoek naar de structuur en functie van FV.

De activiteit van het protrombinase-complex wordt gereguleerd door het proteïne C-systeem via de inactivering van FVa door APC. Onlangs werd door onze groep aangetoond dat de manier waarop APC FVa inactieveert, beïnvloed wordt door heparine, dat de knip na Arg³⁰⁶ stimuleert en deze na Arg⁵⁰⁶ remt. Een structurele analyse van de interactie tussen FVa en APC via computertechnieken heeft verschillende geladen aminozuren aan het oppervlak van FVa geïdentificeerd die mogelijk belangrijk zijn voor de interactie van FVa met APC en heparine. In hoofdstuk VI hebben we de rol van deze geladen aminozuren in de inactivering van FVa door APC onderzocht via mutagenese. Recombinante FV-varianten waarin de lading van deze aminozuren was gewijzigd, werden geïncubeerd met APC en het verlies in FVa-cofactoractiviteit werd gevolgd als functie van de tijd. Uit deze experimenten blijkt dat de interactie tussen FVa en APC een groot oppervlak rond

Samenvatting

de Arg⁵⁰⁶-knipplaats beslaat. Bovendien werd in FV-varianten, waarin de positief geladen aminozuren Lys³²⁰, Arg³²¹ en Arg⁴⁰⁰ waren vervangen, de APC-afhankelijke splitsing na Arg³⁰⁶ niet door heparine gestimuleerd. Deze experimenten ondersteunen de hypothese dat heparine de inactivering van FVa door APC op positie 306 versnelt door de positief geladen exosite van APC en een positief geladen regio in de zware keten van FVa (bestaande uit aminozuren Lys³²⁰, Arg³²¹ en Arg⁴⁰⁰) met elkaar te verbinden.

Ten slotte worden in hoofdstuk VII de belangrijkste bevindingen en conclusies uit dit proefschrift samengevat en besproken.