

Studies on the mechanism of zymogen activation in blood coagulation

Citation for published version (APA):

Tans, G. M. H. (1980). *Studies on the mechanism of zymogen activation in blood coagulation*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19800101gt>

Document status and date:

Published: 01/01/1980

DOI:

[10.26481/dis.19800101gt](https://doi.org/10.26481/dis.19800101gt)

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

In this thesis work is presented which concerns the role of protein-phospholipid interactions in coagulation. During coagulation a complicated chain of biochemical reactions occurs in which specific zymogens (clotting factors) are activated and which ultimately leads to the formation of thrombin. Thrombin converts fibrinogen into fibrin and the fibrin network, necessary for the arrest of bleeding from a wound, is formed.

In three reactions occurring in the so-called coagulation cascade phospholipid is thought to play a role. These reactions are factor X activation, both via the intrinsic and extrinsic pathway of coagulation, and prothrombin activation.

Phospholipid molecules spontaneously form lamellar structures when dispersed in an aqueous environment. These structures are known as bilayers. In these bilayers the phospholipid molecules are oriented with their chains towards each other and their head groups interact with the aqueous environment. Phospholipid bilayers show a peculiar feature. Above a certain temperature (transition temperature) the molecules in the bilayer can move freely in the plane of the bilayer. This is the so-called liquid crystalline state. Below the transition temperature diffusion of the molecules in the bilayer is hindered considerably. In chapter 3 it is shown that phospholipid bilayers in the liquid crystalline state promote coagulation much better than phospholipid bilayers in the solid gel state.

It was known already a long time that prothrombin activation by the enzyme factor X_a was stimulated enormously by the presence of $CaCl_2$, phospholipid and a protein co-factor, factor V_a . In chapter 4 it is shown that this stimulation is caused by important changes in the kinetic parameters of prothrombin activation. Phospholipids stimulate the reaction by bringing the K_m for the substrate prothrombin to a level which is about equal to the plasma concentration of prothrombin whereas factor V_a dramatically increases the k_{cat} of thrombin formation. Phospholipid and factor $VIII_a$ exert the same effect in factor X activation by factor IX_a as is shown by phospholipid and factor V_a in prothrombin activation (chapter 5).

In order to be able to express observed velocities in an enzymatic reaction in turnover rates of the enzyme it is necessary that the enzyme can be quantitated on a molecular basis. In chapter 6 it is

shown that factor IX_a can be quantitated via active site titration of the enzyme with p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate.

The reactions investigated in this thesis are thought to take place on the phospholipid surface. Therefore, to appreciate the process going on on this surface it is essential that the parameters for the binding of the different proteins to the phospholipid bilayer are known. Chapter 7 describes a new method for the determination of the binding constant of factor X to phospholipid vesicles. The great advantage of this technique is that the binding parameters can be determined at exactly the same conditions as are used in the kinetic studies on factor X activation described in chapter 5. An additional advantage is that the method is relatively easy to perform.

In chapter 8 the findings presented in this thesis are discussed.

SAMENVATTING

In dit proefschrift worden de resultaten beschreven van onderzoek aan eiwit-lipide interacties in de bloedstolling. Stolling is o.a. het gevolg van een ingewikkelde reeks opeenvolgende biochemische reacties waarin eiwitten (stolfactoren) die vrij in het bloed circuleren geactiveerd worden. Deze reeks reacties leidt uiteindelijk tot de vorming van thrombine. Thrombine zet fibrinogeen om in fibrine en het fibrine netwerk, noodzakelijk voor bloedstelping, wordt gevormd.

Deze reeks opeenvolgende reacties wordt de stolcascade genoemd. In drie van deze reacties spelen fosfolipiden een rol. Dit zijn faktor X aktivering, langs de intrinsieke en extrinsieke weg, en prothrombine aktivering.

Wanneer fosfolipide molekulen in water opgenomen worden vormen ze spontaan lamellaire structuren. Deze structuren worden bilagen genoemd. De fosfolipide molekulen zijn in de bilaag met hun vetzuur staarten naar elkaar toe georiënteerd. De kopgroepen vertonen interactie met het water. Fosfolipide bilagen vertonen een speciale eigenschap. Boven een bepaalde temperatuur (overgangstemperatuur) kunnen de molekulen vrij bewegen in het vlak van de bilaag. De bilaag bevindt zich dan in de zgn. vloeibaar kristallijne fase. Beneden de overgangstemperatuur is de diffusie van fosfolipide molekulen in het vlak van de bilaag sterk gehinderd. In hoofdstuk 3 wordt aangetoond dat fosfolipide bilagen die zich in de vloeibaar kristallijne fase bevinden de stolling veel beter bevorderen dan bilagen die zich in de zgn. vaste fase bevinden.

Prothrombine wordt geactiveerd door het enzym faktor X_a . Reeds lang was bekend dat deze reactie enorm gestimuleerd wordt door $CaCl_2$, fosfolipiden en een eiwit co-faktor, faktor V_a . In hoofdstuk 4 worden experimenten beschreven die aantonen dat deze stimulering veroorzaakt wordt door belangrijke veranderingen in de kinetische parameters van prothrombine aktivering. Fosfolipiden stimuleren de reactie doordat de K_m voor het substraat prothrombine verlaagd wordt tot een niveau dat ongeveer gelijk is aan de plasma concentratie van prothrombine. Faktor V_a stimuleert de reactie door een sterke verhoging van de k_{cat} van thrombine vorming. In hoofdstuk 5 wordt aangetoond dat fosfolipiden en faktor $VIII_a$ eenzelfde effect hebben op de aktivering van faktor X door faktor IX_a .

Wanneer men de snelheden van substraat omzetting wil uitdrukken in

hoeveelheden substraat omgezet per enzym is het noodzakelijk de hoeveelheden enzym aanwezig in het reaktievolume te kwantiteren. In hoofdstuk 6 wordt beschreven dat faktor IX_a concentraties gemeten kunnen worden door het enzym te titreren met p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoaat.

De reacties welke onderzocht zijn worden geacht plaats te vinden op het fosfolipide oppervlak. Om dit proces op het oppervlak te kunnen beschrijven en begrijpen is het noodzakelijk dat de bindingskonstanten van de eiwitten voor de binding aan de fosfolipide bilaag bekend zijn. In hoofdstuk 7 wordt een nieuwe methode geïntroduceerd voor het meten van de binding van faktor X aan fosfolipide vesicles. Het voordeel van deze methode is dat ze relatief eenvoudig is en dat de bindingskonstanten gemeten kunnen worden onder dezelfde omstandigheden als gebruikt werden in de kinetische experimenten beschreven in hoofdstuk 5.

In hoofdstuk 8 wordt een algemene kritische beschouwing gegeven van de resultaten die in dit proefschrift gepresenteerd worden.