

Biosynthesis, occurrence and characterization of gla-containing proteins with a potential importance for cardiovascular diseases

Citation for published version (APA):

de Haarlem, L. E. M. (1989). *Biosynthesis, occurrence and characterization of gla-containing proteins with a potential importance for cardiovascular diseases*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19890616ld>

Document status and date:

Published: 01/01/1989

DOI:

[10.26481/dis.19890616ld](https://doi.org/10.26481/dis.19890616ld)

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 5

SUMMARY AND GENERAL DISCUSSION

Vitamin K-dependent carboxylase is an enzyme system found in many different types of mammalian tissues. In earlier work from this group some properties of carboxylase from liver, spleen, kidney, lung and testis have been described. In the first part of this thesis we describe the isolation of vessel wall carboxylase and the properties of this enzyme are compared with those characterized earlier. Because rather large amounts of fresh tissue were required, this part of our study was performed with bovine material, obtained from the slaughterhouse. The substrate recognition by these carboxylases was investigated by using different substrates. In a first attempt we have compared d-osteocalcins from various species. The substrates chosen for this experiment varied only slightly in their amino acid composition. Bovine d-osteocalcin turned out to be the best substrate whereas monkey d-osteocalcin was not carboxylated at all. The only difference between the two proteins is found at positions 3 and 4, which are of opposite charge in the bovine substrate but neutral in the monkey one. Apparently the occurrence of two amino acids of opposite charge at a position of about 15 residues before the first carboxylatable Glu-residue is one of the requirements for an efficient enzyme/substrate recognition. It is at least suggestive in this respect that these oppositely charged amino acid residues are found in almost all leader sequences of other Gla-containing proteins, including those involved in blood coagulation. The high preference for bovine d-osteocalcin was found in all tissues investigated, so that in this way no difference in substrate specificity between the various carboxylases could be detected, however. Another approach was to compare widely different types of substrate: F L E E L, d-osteocalcin, d-prothrombin fragment 13-29 and d-sperm Gla-protein. Substantial differences were found, and it was remarkable that in vessel wall carboxylase we have found for the first time a difference which was absolute: F L E E L and (bovine) d-osteocalcin were normally carboxylated, whereas d-sperm Gla-protein and d-prothrombin fragment 13-29 were not carboxylated at all.

One of the problems unsolved as yet is that of the identity of the physiological cofactor providing the reducing equivalents in the two reduction steps of the vitamin K cycle. *In vitro* synthetic dithiols such as DTT may be used, but despite more than 10 years research their physiological counterpart has never been found. In chapter 2C we describe that the NADPH-dependent thio-

redoxin/thioredoxin reductase system may replace DTT with a high efficiency. Thioredoxin is a dithiol protein which is found in many organisms (from *E. coli* to mammals) and tissues, including calf liver. It is involved in many cellular reduction reactions, for instance in DNA synthesis, and it seems at least plausible that the protein is also involved in vitamin K metabolism. A practical application of our discovery is that it opens up the possibility to carboxylate proteins *in vitro* without employing highly reducing conditions (50 μM thioredoxin instead of 2 mM DTT). It may be expected that disulfide bonds will remain preserved in this way, so that the reaction product remains intact. Obviously this is a prerequisite for the carboxylation of enzymatically active proteins like recombinant factor IX.

As was to be expected, the investigations concerning vessel wall carboxylase have not revealed information about the identity of the product formed. Since all Gla-containing proteins have a high affinity for insoluble Ca^{2+} -salts, it seemed probable that the product of vessel wall carboxylase would be found amongst the proteins adsorbed to the calcified atherosclerotic lesions which are frequently found in human aorta's. In the second part of this thesis we have focussed our attention therefore on the Gla-containing proteins present in atherosclerotic plaques. Because atherosclerosis is relatively rare in animals this part of our study is performed exclusively with human tissue. The calcified plaques were extruded from the vessel wall and dissolved in EDTA. Two Gla-containing proteins were detected: osteocalcin and PGP. In chapter 3 we describe the development of a number of techniques required for the investigation of the structure and properties of these two proteins. Because it was readily available in sufficient amounts, osteocalcin was taken as a model protein in these studies. It was demonstrated that Gla-containing proteins differing as much as coagulation factor X and osteocalcin similarly inhibit the precipitation of Ca^{2+} -salts. A maximal effect is seen at slightly acidic conditions (pH 6-6.5). In this respect PGP is very different from the other Gla-containing proteins, because even at pH 7.4 it has an extremely high potency to inhibit the precipitation of calcium phosphate and carbonate from supersaturated solutions. It was also shown that Gla-residues were absolutely required for the precipitation-inhibitory activity, and that Gla-proteins inhibit the precipitation of other divalent metal ions as well. The slight differences observed may probably be attributed to the different solubility products of these salts, rather than to other factors such as the radius of the metal ions. In chapter 3B we describe the development of an assay procedure for determining the amount of Gla-residues in circulating osteocalcin. The method is applicable for osteocalcin as well as for PGP, but as a drawback it is time consuming, so that for series of plasma or serum samples a semi-quantitative determination of Gla-residues is preferable. The latter technique is based on the affinity of Gla-containing proteins for hydroxyapatite and is used in chapter 3C in which we show that coumarin derivatives induce a marked decrease (more than 50%) in serum osteocalcin antigen as well as in its Gla-content. With these data the first proof is given that oral anticoagulant therapy directly interferes with the production of a non-hepatic protein in man. Using the sheep as an experimental animal, it was also demonstrated that the effect of vitamin K antagonists on the

synthesis of osteocalcin cannot be counteracted by the administration of pharmacological doses of vitamin K which were sufficient to normalize the production of blood coagulation factors. Later on this phenomenon could be explained by other members of our group, who showed that the coumarin-insensitive NADH-dependent vitamin K reductase is lacking in osteoblasts, the place of synthesis of osteocalcin.

In chapter 4 we describe the purification and properties of the second Gla-containing protein found in calcified atherosclerotic plaques. The protein was discovered after it turned out that a calcium plaque extract contained a Gla-protein which was not immunologically related to any of the known Gla-proteins found in plasma and which seemed to inhibit strongly the precipitation of calcium phosphate and carbonate (4A). After its complete purification (4B) the protein (which was called PGP) was characterized and from its amino acid composition and blocked N-terminus it could be demonstrated unequivocally that PGP was a new and unique protein and not, for instance, a degradation product of one of the coagulation factors. As yet the origin of PGP is unknown. One possibility is that it is synthesized by the vessel wall (either constitutively or only during the calcification process). Alternatively the protein might be produced elsewhere and subsequently be transported to the calcifying vessel wall via the blood stream. In both cases the occurrence of PGP in plasma may be expected. Hence we have developed an assay with which plasma samples can be screened for the presence of PGP (chapter 4C). The assay is based on the principle of the "sandwich ELISA" and enabled us to detect immunoreactive PGP in normal blood plasma and in serum. The concentration ranged from 0.5 to 1.5 mg/L. In a first attempt to explore if the PGP-assay may also become of clinical importance, we have measured the plasma-PGP levels in 37 patients suffering from severe atherosclerosis. The mean level was found to be less than 10% of normal. In our opinion these data are promising and justify more elaborate investigations. Plans have been made for (i) a careful analysis of risk factors and plasma-PGP levels of patients requiring coronary bypass surgery (ii) a continuation of the screening of atherosclerotic patients, especially those with underlying diseases such as homocystinuria, hypercholesterolemia and diabetes mellitus. Obviously the PGP-assay would substantially gain in clinical importance if it could be used for the detection of atherosclerosis at an early stage of the disease. To answer this question, apparently healthy members of high risk groups (heavy smokers, diabetes mellitus, high blood pressure, high cholesterol, familial disorders) will have to be screened. A first exploration of this field is described in chapter 4C, where we have measured the plasma-PGP levels in 51 heavy smokers. It is at least highly suggestive that again the plasma-PGP levels in most subjects were at least 10-fold below normal. It is hoped that the plasma-PGP level may be used as an early marker, long before atherosclerotic degenerations become manifest otherwise. In the early phase of the disease preventive measures (elimination of risk factors, therapeutic intervention) may be expected to have a maximal effect. The tools for these investigations have been described in this thesis, but their large-scale application remains to be awaited.

SAMENVATTING

De aanwezigheid van vitamine K-afhankelijk carboxylase activiteit is in een groot aantal verschillende soorten weefsels vastgesteld. Reeds eerder heeft onze groep enkele eigenschappen van het lever-, nier-, milt-, long- en testis-carboxylase beschreven. In het eerste gedeelte van dit proefschrift wordt de isolatie en karakterisering van het vaatwandcarboxylase beschreven en worden de eigenschappen van dit enzymstelsel vergeleken met die van de eerder genoemde carboxylases. Tijdens dit deel van ons onderzoek werd gebruik gemaakt van runder materiaal afkomstig van het slachthuis. Tevens hebben we de substraat-selektie van deze carboxylases bestudeerd. In een eerste poging hiertoe hebben we osteocalcines van verschillende species geïsoleerd, gedecarboxyleerd en hun kinetische konstanten gemeten. Osteocalcine is in de evolutie merkwaardig goed geconserveerd gebleven: de verschillen tussen diverse species bedragen meestal maar 1 of 2 aminozuren. Het gedecarboxyleerd runderosteocalcine bleek het beste substraat te zijn, terwijl het gedecarboxyleerde osteocalcine uit de aap in het geheel niet gecarboxyleerd werd. Deze twee osteocalcines verschillen alleen in de aminozuur residuen in de posities 3 en 4. De lading van deze twee residuen is in het rundersubstraat tegengesteld, maar in het substraat van de aap neutraal. Klaarblijkelijk is het voorkomen van twee tegengesteld geladen aminozuren ca. 15 residuen voor het eerste Gla-residu van belang bij de enzym-substraat herkenning. In dit verband is het op zijn minst opmerkelijk, dat deze tegengesteld geladen aminozuur residuen in bijna alle prosequenties van andere plasma Gla-bevattende eiwitten gevonden worden. In alle bestudeerde weefsels bleek er een grote voorkeur voor het rundersubstraat te bestaan. Een verschil in substraatspecificiteit tussen de verscheidene carboxylases kon op deze wijze dan ook niet aangetoond worden. Vandaar dat we hebben besloten om substraten te vergelijken die onderling sterk verschillen: F L E E L, gedecarboxyleerd osteocalcine, gedecarboxyleerd prothromine fragment 13-29 (een proteolytisch degradatieproduct van descaboxiprothrombine) en gedecarboxyleerd sperm Gla-eiwit. Aanzienlijke verschillen werden gevonden in de herkenning van de verschillende substraten en het was opmerkelijk dat in vaatwandcarboxylase voor het eerst een absoluut verschil in substraatspecificiteit werd gevonden: F L E E L en het gedecarboxyleerde runderosteocalcine werden normaal gecarboxyleerd maar gedecarboxyleerd sperm Gla-eiwit en gedecarboxyleerd prothrombine fragment 13-29 werden in het geheel niet gecarboxyleerd.

Vitamine K kan vóórkomen in verschillende vormen: het quinon (K), het gereduceerde hydroquinon (KH₂) en het geoxydeerde epoxide (KO). Deze 3 vormen zijn alle aangetoond in de lever en men neemt aan, dat ze op cyclische wijze in elkaar worden omgezet: de vitamine K-cyclus. *In vitro* kan vitamine K door reductases tot vitamine K hydroquinone gereduceerd worden. Een van deze reductases wordt *in vitro* door dithiothreitol (DTT) gestimuleerd; de andere worden door NADH gestimuleerd. Tijdens de carboxylering wordt vitamine K hydroquinon omgezet in vitamine K 2,3 epoxide; dit wordt vervolgens door DTT-afhankelijk vitamine K epoxide reductase gereduceerd tot vitamin K. De fysiologische tegenhanger van DTT in genoemde reacties is niet bekend. In hoofdstuk 2C staat beschreven dat *in vitro* het NADPH-afhankelijk thioredoxin/thioredoxin reductase systeem DTT kan vervangen. Thioredoxin, een dithiol eiwit, is aanwezig in talrijke organismen (van *E.coli* tot zoogdieren) en weefsels. Het is betrokken bij een groot aantal cellulaire reductie reacties (b.v. in DNA synthese) en tevens lijkt het erop dat het eiwit tevens betrokken is in het vitamine K metabolisme. Een praktische toepassing van deze bevinding is dat op deze wijze wellicht eiwitten *in vitro* gecarboxyleerd kunnen worden onder geringe reducerende condities (50 µM thioredoxin in plaats van 2 mM DTT). Daar op deze wijze de S-S bruggen gesloten zullen blijven, blijft het reactieproduct intact. Het is duidelijk, dat dit een eerste vereiste is voor de carboxylering van biologisch actieve eiwitten, (zoals recombinant factor IX).

Het onderzoek betreffende het vaatwandcarboxylase heeft geen informatie opgeleverd over het eiwit dat door vaatwandcarboxylase gevormd wordt. Daar het bekend is, dat alle Gla-bevattende eiwitten een hoge affiniteit voor onoplosbare calciumzouten hebben, lijkt het waarschijnlijk dat het produkt van vaatwandcarboxylase deel uit maakt van de eiwitten, die geadsorbeerd zijn aan verkalkte atherosclerotische lesies.

In het tweede deel van dit proefschrift hebben we daarom onze aandacht gericht op de Gla-bevattende eiwitten van atherosclerotische plaques. Verkalkte humane plaques werden vrij geprepareerd uit de vaatwand en vervolgens opgelost in EDTA. Het EDTA-extract bleek twee Gla-eiwitten te bevatten: osteocalcine en PGP. In hoofdstuk 3 staat de ontwikkeling van een aantal tests centraal. Deze tests zijn noodzakelijk voor het onderzoek naar de structuur en eigenschappen van deze twee eiwitten.

Daar osteocalcine in een behoorlijke hoeveelheid beschikbaar was, hebben we dit Gla-eiwit als model-eiwit gekozen voor de studies beschreven in hoofdstuk 3. Er werd aangetoond dat Gla-eiwitten die zeer sterk verschillen de precipitatie van calcium zouten in gelijke mate remmen. Een verklaring voor

de waargenomen geringe verschillen kan waarschijnlijk eerder gezocht worden in een verschil in oplosbaarheidsprodukt van deze zouten dan b.v. in de straal van het metaalion. Een maximaal effect is waarneembaar bij een pH van 6-6.5. In dit opzicht verschilt PGP aanzienlijk van de andere Gla-bevattende eiwitten omdat zelfs bij een pH van 7.4 dit eiwit in staat is de precipitatie van calciumcarbonaat en calciumfosfaat te remmen. De aanwezigheid van Gla-residuen bleek belangrijk te zijn voor de remmende activiteit; tevens waren deze Gla-eiwitten in staat de precipitatie van andere divalente metaalionen eveneens te remmen.

In hoofdstuk 3B hebben we een test ontwikkeld om het Gla-gehalte van het circulerend osteocalcine vast te stellen. Deze methode is geschikt om de carboxyleringsgraad van zowel osteocalcine als PGP te bepalen. Echter, de uitvoering van deze bepaling neemt veel tijd in beslag, zodat voor een serie van plasma of serum monsters de voorkeur gegeven wordt aan een semi-kwantitatieve bepaling van de Gla-residuen. Deze test, gebaseerd op de affiniteit van de Gla-bevattende eiwitten voor hydroxyapatite, wordt gebruikt in hoofdstuk 3C. In dit hoofdstuk laten wij zien dat coumarine derivaten een aanzienlijke afname (groter dan 30%) in zowel antigeen als Gla-gehalte van het serum-osteocalcine teweeg brengen. De verkregen resultaten van dit onderzoek vormen een eerste bewijs dat orale antistollingstherapie bij de mens direct interfereert met de produktie van een niet-hepatisch eiwit. In een experimenteel diersmodel (het schaap), kon het effect van vitamine K antagonist op de osteocalcine synthese niet opgeheven worden door het toedienen van farmacologische doses vitamine K, welke voldoende waren om de produktie van biologisch actieve stollingsfactoren te normaliseren. Deze bevinding werd in een later stadium door andere leden van onze groep verklaard. Zij toonden nl. aan, dat het coumarine ongevoelige NADH-afhankelijk vitamine K reductase ontbreekt in de osteoblasten (de plaats van synthese van osteocalcine).

In hoofdstuk 4 wordt de zuivering en karakterisering van een nieuw Gla-bevattend eiwit beschreven. Een EDTA-extract van verkalkte humane atherosclerotische plaques bleek een Gla-eiwit te bevatten, dat immunologisch niet verwant is aan een van de bekende plasma Gla-eiwitten. Tevens was dit eiwit in staat de precipitatie van calciumfosfaat en calciumcarbonaat sterk te remmen (4A). Dit eiwit (PGP genaamd) werd vervolgens gezuiverd (4B) en gekarakteriseerd. Uit de aminozuursamenstelling en het feit dat het N-terminale aminozuur geblokkeerd is, hebben we geconcludeerd dat PGP een specifiek Gla-eiwit is en géén afbraakprodukt van een bekend Gla-eiwit. De plaats waar PGP wordt gesynthetiseerd, is niet bekend. Het is mogelijk dat PGP

gevormd wordt door het reeds eerder genoemde vitamin K-afhankelijk carboxylase in de vaatwand. Een andere mogelijkheid is dat het eiwit elders gesynthetiseerd wordt en vervolgens uit de bloedcirculatie aan de verkalkte delen van de vaatwand geadsorbeerd wordt. Echter in beide gevallen kunnen we de aanwezigheid van PGP in plasma verwachten. Er werd een ELISA voor PGP ontwikkeld (4C). Hiermee werd aangetoond dat PGP vóórkomt in plasma en serum van gezonde vrijwilligers (0.5 - 1.5 mg/L). Tevens werden de plasma-PGP spiegels in 37 atherosclerotische patiënten gemeten en bleek dat het gemiddeld PGP-gehalte van deze groep sterk verlaagd was (minder dan 10% van normaal). Deze resultaten lijken veelbelovend en rechtvaardigen verder onderzoek. In de toekomst willen we aan de volgende punten aandacht schenken: 1) een zorgvuldige analyse van risikofactoren en plasma-PGP spiegels van patiënten opgenomen voor coronaire bypass chirurgie 2) een continuering van de screening van patiënten met een klinisch manifest ersntige vorm van atherosclerose, evt. gegroepeerd naar de aard van de onderliggende ziekte (homocystinurie, hypercholesteremie, diabetes mellitus) Het is duidelijk, dat de PGP-assay van groter klinisch belang kan worden als de test gebruikt kan worden om atherosclerose in een vroeg stadium van de ziekte te detecteren. Alvorens een antwoord op deze vraag te kunnen geven, moet het PGP-gehalte van gezonde personen behorend tot een hoog risico groep voor coronaire hartziekten (roken, hoge bloeddruk, hoge serum-cholesterolspiegels, erfelijke aandoeningen) bekend zijn. Een eerste aanzet hiertoe wordt in hoofdstuk 4c beschreven, waarin de plasma-PGP spiegels van 51 zware rokers bepaald werden. Het merendeel van de onderzochte personen hadden een duidelijk verlaagd plasma-PGP gehalte (10x beneden normaal). Hoewel deze bevindingen zeer suggestief zijn, moet voorzichtigheid betracht worden bij de interpretatie van de resultaten. In het beginstadium van het proces van atherosclerose zouden preventieve en therapeutische maatregelen een maximaal effect kunnen hebben. In dit proefschrift hebben we een aantal hulpmiddelen voor deze studies beschreven, echter hun toepassing op grote schaal dient afgewacht te worden.