

Effects of impaired vitamin K-dependent protein carboxylation

Citation for published version (APA):

Spronk, H. M. H. (2003). *Effects of impaired vitamin K-dependent protein carboxylation*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20030620hs>

Document status and date:

Published: 01/01/2003

DOI:

[10.26481/dis.20030620hs](https://doi.org/10.26481/dis.20030620hs)

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 9.1

discussion and summary

The posttranslational process of γ -glutamyl carboxylation is found in various species including *Drosophila* [120, 243], suggesting early development of this process during evolution. After translocation of the precursor protein across the rough endoplasmic membrane, specific glutamic acid residues (Glu) are converted into γ -carboxy glutamic acid residues (Gla). In this process are involved: the transmembrane enzyme γ -glutamyl carboxylase which catalyses the reaction, vitamin K as a cofactor, and at least two known reductases for the recycling of vitamin K (Chapter 1, Figure 3.2). The resulting protein is called a Gla-protein or vitamin K-dependent protein.

Gla-proteins may be classified in three groups: I. Gla-proteins involved in blood haemostasis: prothrombin, coagulation factors VII, IX, and X, protein C, protein S, and protein Z. II: Gla-proteins involved in tissue calcification: matrix Gla protein (MGP) and osteocalcin (OC). And III: other Gla-containing proteins such as proline-rich Gla-proteins and Gas6. In all these proteins the presence of Gla-residues is a prerequisite in the Ca^{2+} -binding and/or Ca^{2+} -dependent interaction with negatively charged surfaces.

In 1929 the Danish scientist Henrik Dam described the first disorder due to a malfunction of the γ -glutamyl carboxylation process. Since then, several pathological symptoms resulting from inhibition or malfunction of one of the components involved in the γ -glutamyl carboxylation process have been described. Taking a close look at the carboxylation process (Chapter 1, Figure 3.2) several reasons may underlie the occurrence of non-carboxylated Gla-proteins and the subsequent (pathological) phenotype displayed. First, a blockade of vitamin K-reductase as a result of coumarin ingestion or a mutation may lead to impaired recycling of vitamin K and finally to an exhaustion of the available vitamin K stores. Second, a mutation in the Gla-protein may result in either poor substrate recognition by carboxylase [79] or in impairment of propeptide cleavage from the mature protein [251]. Third, the rare disorder of a mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene leading to a defective enzyme. Two Lebanese patients with the same mutation in the γ -glutamyl carboxylase gene are described in Chapters 2.1 and 2.2. Both patients are the first offspring of consanguineous parents and are homozygous for a point mutation in exon 11 of the γ -glutamyl carboxylase gene. The mutation causes the conversion of a tryptophan codon (TGG) to a serine codon (TCG) at amino acid residue 501 of γ -glutamyl carboxylase (W501S). As a result of the mutation both hepatic and extra-hepatic Gla-proteins are affected (non-carboxylated) leading to a hereditary combined deficiency of all vitamin K-dependent procoagulants and anticoagulants. For rapid detection of the mutation a RFLP technique based on the presence of 3 BstNI sites in the unaffected allele and 2 BstNI sites in the affected allele was developed (Chapter 2.1). Using this screening technique the autosomal recessive pattern of inheritance of this disease was shown.

Hereditary combined deficiency of all vitamin K-dependent procoagulants and anticoagulants is a rare bleeding disorder reported only by a few authors [12, 19, 37, 95, 154]. Until now, only in two other cases mutations leading to a defective γ -glutamyl carboxylase enzyme have been reported [19, 209]. This suggests that most mutations in the γ -glutamyl carboxylase enzyme are not compatible with embryonic development and therefore are not detected. In other words, only mutations leading to a rather mild dysfunction of γ -glutamyl carboxylase are not lethal for the embryo. This is supported by the fact that in the two patients which we investigated oral vitamin K1 administration resulted in resolution of the clinical symptoms. Before birth, the vitamin K-dependent blood coagulation factors are synthesised at levels (ca. 20%) far below adult levels [158]. After birth, synthesis is increased and from then on higher vitamin K1 amounts are needed for complete γ -glutamyl carboxylation.

A second explanation for the effect of oral vitamin K1 administration is given by the molecular nature of the W501S mutation (Chapter 3). The impact of the W501S mutation on the activity of γ -glutamyl carboxylase was characterised using recombinant γ -glutamyl carboxylase expressed in insect cells. It was demonstrated that the mutation is most likely localised in the propeptide binding domain of carboxylase. The conversion of tryptophan residue 501 to serine results in a decreased affinity for substrate (propeptide) binding to γ -glutamyl carboxylase. For example, the blood coagulation factor IX derived substrate FIXproGla binds with an 80 fold higher K_m value to W501S-carboxylase than to wild type enzyme. Binding of a propeptide covalently linked to the Gla domain induces a substantial decrease in the K_m for vitamin KH₁ [88, 209]. It is possible that the decreased propeptide affinity of W501S-carboxylase negatively affects the K_m for the cofactor KH₂. Given the low vitamin K1 levels in newborns, additional vitamin K1 supplementation leads to a KH₁ concentration above the K_m -value and thus to partial improvement of carboxylation.

In order to gain more insight in the role of MGP in vascular calcification, monoclonal antibodies (Chapter 4) and synthetic full length MGP (Chapter 5) were prepared. The two monoclonal antibodies described were raised against synthetic peptides homologous to the sequences 3-15 and 63-75 of human MGP and both antibodies recognize recombinant and synthetic human MGP. The two antibodies were used for immunohistochemical localisation of MGP in human calcified areas. MGP was associated with the extracellular matrix of non-calcified bone and with chondrocytes in cartilage. In the healthy human arterial vessel wall, MGP antigen was demonstrated in association with smooth muscle cells and elastic laminae of the tunica media, and with the extracellular matrix of the adventitia. The co-localization with the elastic laminae was lost at sites of medial calcification: in both human and

rat arteries, high amounts of MGP were found in the extracellular matrix at borders of intimal and medial calcification. Native MGP is difficult to isolate from human bones and due to solubility problems, processing of a recombinant MGP-fusion protein chimera to obtain MGP was unsuccessful. Therefore, in Chapter 5 we describe the total chemical synthesis of MGP by tBoc solid-phase peptide synthesis (SPPS) and native chemical ligation. Two peptides, Tyr¹-Ala⁵³ and Cys⁵⁴-Lys⁸⁴, were separately synthesised and subsequently coupled with native chemical ligation.

As described above, a blockade of vitamin K-reductase by coumarin inhibits γ -glutamyl carboxylation leading to undercarboxylated Gla-proteins. In Chapter 6 we describe an animal model in which the extra-hepatic γ -glutamyl carboxylase was inhibited using warfarin, whereas the hepatic enzyme remained unaffected. Using this model we demonstrated that, in contrast to vitamin K1, menaquinone-4 (MK-4) prevents warfarin-induced arterial calcification. Furthermore, we demonstrated both a better bio-availability and a more effective utilisation of MK-4 in the arterial vessel wall. Although both vitamin K1 and MK-4 have a 2-methyl-naphthoquinone group in common, and both function as a cofactor for γ -glutamyl carboxylase, our observations demonstrate a marked difference between both vitamers. These results are consistent with the strong inverse correlation found between vitamin K2 intake and artery calcification, myocardial infarction and total cardiac death [67]. Kawashima *et al.* showed that high menaquinone intake suppressed the progression of atherosclerotic plaques, intimal thickening and pulmonary atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits [99].

MGP is expressed by vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the arterial vessel wall and thought to play a role in the inhibition of soft-tissue calcification. In Chapter 7 we added the synthetic full length MGP to calcifying human aortic VSMCs cultures. We showed that *in vitro* at a concentration of 500 ng/mL synthetic full length MGP inhibited VSMCs calcification. In this Chapter we also demonstrate a difference between vitamin K1 and menaquinone-4 on VSMCs nodule formation. Vitamin K1 had no effect, whereas MK-4 inhibited nodule formation by 50%. This inhibitory activity of MK-4 was not γ -glutamyl carboxylase dependent and therefore suggests a second, yet unknown, function for vitamin K2.

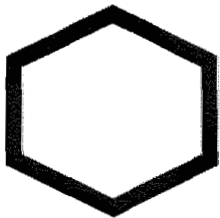
Various Japanese studies have demonstrated a strong decrease of bone loss and even an increase of bone mineral density by a high-dose MK-4 treatment (45 mg/day) [1, 151]. Remarkably, the used dose is much higher than can be understood from the regular function of vitamin K. Also, using cell and tissue culture experiments it was shown that: (a) among all the poly-isoprenoids known as vitamin K side chains, only geranylgeraniol was capable of

inhibiting osteoclast activity [81], and (b) MK-4 specifically induced apoptosis of osteoclasts in experimental model systems [97]. Together with the observed differences between vitamin K1 and K2 described in Chapter 6, this has led to a new hypothetical function for the geranylgeranyl side chain of MK-4. The reported inhibitory effect of MK-4 on bone loss is comparable to those obtained with bisphosphonate treatment. Like bone loss, also vascular media calcification can be completely abolished by both bisphosphonate treatment [163], and by high-dose MK-4 treatment (Chapter 6), but not by treatment with K1. Bisphosphonates are well known inhibitors of osteoclastic bone resorption. Nitrogen-containing bisphosphonates are specific inhibitors of the enzyme farnesyl-pyrophosphate synthase and in bone this leads to reduced production of the compounds farnesyl-pyrophosphate and geranylgeranyl-pyrophosphate [186]. The latter compounds are needed for the prenylation of signal-transducing proteins such as rho, rac, and ras, which stimulate osteoclast activity and bone resorption [238]. In this way it can be understood that bisphosphonates lead to disturbed signal transduction, followed by loss of cellular organization and leading to inactivation of the osteoclasts and their subsequent apoptosis. The function of the geranylgeranyl side chain in MK-4 would thus be that it serves as a competitive inhibitor in the prenylation of signal transduction proteins, in such a way that the naphthoquinone group in MK-4 could block either the phosphorylation of farnesyl and geranylgeranyl or the protein coupling to farnesyl- and geranylgeranyl-pyrophosphate. As a consequence, high doses of MK-4 may bind to and thus saturate the geranylgeranyl-binding sites in the prenylating enzyme system, which makes clear why high doses of MK-4 are required for *in vivo* effects comparable with those obtained with bisphosphonates.

The association of MGP with the extracellular matrix, the presence of a predicted signal-peptide, and Gla-residues within its N-terminal domain suggests it to be an extracellular protein. In Chapter 8 we show an intracellular localization of MGP in cultured human aortic VSMCs, human breast cancer epithelial cells (T47D), and human osteoblastic osteosarcoma cells (MG-63). These data are in contrast with the extracellular location of MGP *in vivo* and indicates that the protein must be secreted via a presently unknown mechanism by cells. We found that VSMCs undergoing apoptosis released apoptotic bodies which contained MGP. In addition, in normal cell cultures which expressed MGP, numerous small MGP containing vesicular structures could be detected. Therefore, apoptotic body or vesicle release could facilitate MGP export from cells.

During the past decade it became clear that vitamin K-dependent proteins are not only involved in the blood coagulation process. An example of such a protein is the matrix Gla protein, which has an important role in the prevention of soft tissue calcification. Together with the proposed second, yet

unknown, function of menaquinone-4 this makes the scientific field of γ -glutamyl carboxylation, vitamin K, and matrix Gla protein of potential relevance in cardiovascular research.



chapter 9.2

discussie en samenvatting

De γ -glutamylcarboxylering van specifieke glutaminezuurresiduen is een posttranslationele modificatie die plaats vindt bij verschillende diersoorten. De aanwezigheid van het enzym γ -glutamyl carboxylase in de fruitvlieg suggereert een vroege ontwikkeling van het proces gedurende de evolutie [120, 243]. Nadat een immatuur eiwit over de membraan van het ruw endoplasmatische reticulum is getransporteerd, worden specifieke glutaminezuurresiduen omgezet in γ -carboxyglutaminezuren (Gla). Bij deze omzetting zijn de volgende componenten betrokken: het transmembraan enzym γ -glutamyl carboxylase welk zorgt voor katalysatie van de reactie, vitamine K als co-factor, ten minste twee reductases voor de recycling van vitamine K, en het te carboxyleren eiwit (Hoofdstuk 1, Figuur 3.2). Dit substraat eiwit wordt een Gla-eiwit of een vitamine K-afhankelijk eiwit genoemd.

Gla-eiwitten kunnen in drie groepen worden onderverdeeld: I. Gla-eiwitten betrokken bij bloedstolling: prothrombine, factoren VII, IX en X, proteïne C, proteïne S en proteïne Z. II: Gla-eiwitten betrokken bij verkalking van weefsels: matrix Gla proteïne (MGP) en osteocalcine (OC). En III: andere Gla-eiwitten zoals de proline-rijke Gla-eiwitten en Gas6. Bij al deze eiwitten is de aanwezigheid van Gla-residuen een vereiste voor de binding van calcium-ionen (Ca^{2+}) en/of de calcium-afhankelijke interactie met negatief geladen oppervlakken.

De Deense wetenschapper Henrik Dam beschreef in 1929 als eerste een aandoening die werd veroorzaakt door een slecht werkend carboxylase proces. Sindsdien zijn verscheidene pathologische symptomen beschreven welke het gevolg zijn van remming of slecht functioneren van componenten betrokken bij de γ -glutamyl carboxylase reactie. Kijken we naar het carboxylerings proces (Hoofdstuk 1, Figuur 3.2) dan wordt duidelijk dat diverse oorzaken kunnen leiden tot de aanmaak van niet gecarboxyleerde Gla-eiwitten en het daaropvolgende (pathologische) fenotype. Als eerste, remming van het vitamine K-reductase als gevolg van coumarine inname of een mutatie kan resulteren in een slecht hergebruik van vitamine K en uiteindelijk tot uitputting van de beschikbare vitamine K voorraad. Als tweede, een mutatie in het Gla-eiwit kan leiden tot een slechte herkenning van het substraat door het enzym γ -glutamyl carboxylase [79] of tot het niet verwijderen van het propeptide van het uiteindelijke eiwit [251]. Als derde, een mutatie in het γ -glutamyl carboxylase gen kan leiden tot een slecht werkzaam enzym. Dit laatste is echter een zeldzame aandoening. In de hoofdstukken 2.1 en 2.2 worden twee patiënten beschreven met dezelfde mutatie in het γ -glutamyl carboxylase gen. Beide patiënten zijn de eerste nakomelingen van bloedverwante ouders en zijn homozygoot voor een punt mutatie in exon 11 van het γ -glutamyl carboxylase gen. De mutatie veroorzaakt de omzetting van een tryptofaan codon (TGG) naar een serine codon (TCG) van aminozuur residu 501 (W501S) in γ -glutamyl carboxylase.

Als gevolg van deze mutatie zijn zowel de hepatische als extra-hepatische Gla-eiwitten niet gecarboxyleerd, hetgeen leidt tot een erfelijke gecombineerde deficiëntie van alle vitamine K-afhankelijke eiwitten. Voor een snelle detectie van de mutatie werd een RFLP-techniek opgezet, op basis van drie aanwezige BstNI restrictie enzym herkenningsplaatsen in het onaangedane allel en twee BstNI plaatsen in het aangedane allel (Hoofdstuk 2.1). Met behulp van deze methode werd het autosomale recessieve overervingpatroon van deze ziekte aangetoond.

Erfelijke gecombineerde deficiëntie van alle vitamine K-afhankelijke eiwitten is een zeldzaam voorkomende bloedingaandoening, waarvan maar door enkele auteurs melding wordt gemaakt [12, 19, 37, 95, 154]. Tot nu toe zijn maar twee patiënten bekend waarbij een mutatie resulteert in een defect γ -glutamyl carboxylase enzym [19, 209]. Dit suggereert dat de meeste mutaties in het γ -glutamyl carboxylase enzym reeds in de embryonale fase tot de dood leiden en dien ten gevolge niet gevonden worden. Met andere woorden, alleen mutaties welke leiden tot een milde disfunctie van γ -glutamyl carboxylase zijn niet lethaal voor het embryo. De bevinding dat orale vitamine K toediening in de hier onderzochte patiënten resulteerde in herstel van de klinische symptomen, ondersteunt dit. Voor de geboorte worden de vitamine K-afhankelijke stollingseiwitten aangemaakt op een niveau (ca. 20%) ver beneden het niveau gevonden bij volwassenen [158]. Na de geboorte neemt de synthese toe en is een hogere vitamine K inname nodig voor een volledige γ -glutamyl carboxylering.

Een tweede oorzaak voor het effect van orale vitamine K toediening werd gevonden in de moleculaire achtergrond van de W501S mutatie (Hoofdstuk 3). Recombinant γ -glutamyl carboxylase werd tot expressie gebracht in insect cellen om het effect van de W501S mutatie op de enzymatische functie te onderzoeken. Er werd aangetoond dat de mutatie waarschijnlijk in het propeptide bindende gedeelte van γ -glutamyl carboxylase zit. De conversie van tryptopfaan residu 501 tot een serine leidt tot een afgenomen herkenning en binding van het substraat (propeptide) aan γ -glutamyl carboxylase. Bijvoorbeeld, het van bloedstollingsfactor IX afgeleide substraat FIXproGla bindt 80 maal slechter aan W501S γ -glutamyl carboxylase dan aan het wildtype enzym. Het is aangetoond dat een propetide welk covalent gekoppeld is aan een Gla-domein een substantiële afname in de K_m voor KH_2 induceert [88, 209]. Het is daarom omgekeerd ook mogelijk dat de verlaagde affiniteit voor een propeptide, veroorzaakt door de W501S mutatie, de K_m voor cofactor KH_2 negatief beïnvloed. Om meer inzicht te verkrijgen in de rol van MGP in vasculaire verkalking, werden monoklonale antilichamen (Hoofdstuk 4) en synthetisch MGP (Hoofdstuk 5) gemaakt. De twee monoklonale antilichamen die hier worden beschreven werden opgewekt tegen synthetische peptiden homologe aan de

sequenties 3-15 en 63-75 van humaan MGP en herkennen beiden zowel recombinant als synthetisch MGP. De twee antilichamen werden gebruikt voor immunohistochemische lokalisering van MGP in humane verkalkte gebieden. MGP is geassocieerd met de extracellulaire matrix van niet verkalkt bot en met chondrocyten in kraakbeen. In de gezonde humane arteriële vaatwand werd MGP antigeen aangetoond in associatie met gladde spier cellen en de elastische lamina van de tunica media en met de extracellulaire matrix van de adventitia. De co-lokalisatie met de elastische lamina ging verloren in gebieden van mediale verkalking. In zowel humane als rat arteriën werden grote hoeveelheden MGP gevonden in de extracellulaire matrix aan de grensvlakken van intima en mediale verkalking. Natuurlijk voorkomend MGP is moeilijk te isoleren uit humaan bot en door oplosbaarheids problemen was de verwerking van recombinant chimeer MGP niet succesvol. Daarom wordt in Hoofdstuk 5 de totale chemische synthese van MGP door middel van tBoc solid-phase peptide synthesis (SPPS) en native chemical ligation beschreven. De twee peptiden, Tyr¹-Ala⁵³ en Cys⁵⁴-Lys⁸⁴, werden afzonderlijk gemaakt en vervolgens gekoppeld door middel van native chemical ligation.

Zoals hierboven beschreven leidt een blokkade van het vitamine K-reductase door coumarine tot remming van de γ -glutamyl carboxylering en zo tot niet gecarboxyleerde Gla-eiwitten. In hoofdstuk 6 wordt een dier model beschreven waarin het extrahepatische γ -glutamyl carboxylase werd geremd door middel van warfarine, terwijl het hepatische enzym niet werd beïnvloed. Met behulp van dit model werd aangetoond dat menaquinone-4 (MK-4), in tegenstelling tot vitamine K1, de warfarine geïnduceerde arteriële verkalking voorkomt. Daarnaast werd een betere biologische beschikbaarheid en een meer efficiënt gebruik van MK-4 door de arteriële vaatwand aangetoond. Hoewel vitamine K1 en MK-4 beiden een 2-methylnaphtoquinone groep hebben en beiden fungeren als co-factor voor γ -glutamyl carboxylase, tonen deze resultaten een opmerkelijk verschil aan tussen beide vitaminen. De hier gepresenteerde resultaten zijn in overeenstemming met de gevonden sterke inverse correlatie tussen vitamine K2 inname en respectievelijk arteriële verkalking, het risico op een hart aanval en totale cardiale dood [67]. Deze bevindingen worden ondersteund door de resultaten van Kawashima *et al.* Zij hebben aangetoond dat een hoge menaquinone inname de ontwikkeling van atherosclerotische plaques onderdrukt in hypercholesterolemische konijnen [99].

MGP wordt tot expressie gebracht door vasculaire gladde spier cellen (VSMCs) in de arteriële vaatwand en speelt een belangrijke rol in de remming van verkalking in zachte weefsels. In hoofdstuk 7 wordt de toevoeging van synthetisch MGP aan verkalkende humane aorta VSMCs culturen beschreven. Er werd aangetoond dat in dit *in vitro* systeem een synthetische

MGP concentratie van 500 ng/ml de verkalking van VSMCs remt. Met dit model werd ook aangetoond dat vitamine K1 en MK-4 een verschillend effect hadden op de vorming van VSMCs nodules. Vitamine K1 had geen effect, terwijl MK-4 de vorming van nodules met 50% remde. Deze remmende activiteit van MK-4 was niet afhankelijk van γ -glutamyl carboxylase en dit suggereert een tweede, tot op heden nog niet bekende, functie voor MK-4.

Verschillende Japanse studies tonen een sterk verminderd botverlies en zelfs een toename in botdichtheid aan bij inname van een hoge dosis MK-4 (45 mg/dag) [1, 151]. Opmerkelijk was dat de optimale MK-4 dosis veel hoger is dan kan worden verwacht op basis van een rol als co-factor voor γ -glutamyl carboxylase. Door gebruik te maken van cel en weefsel cultuur experimenten werd aangetoond dat: (a) van alle poly-isoprenoiden bekend als vitamine K zijketens alleen geranylgeraniol osteoclast activiteit remt [81], en (b) MK-4 specifiek apoptose induceert in osteoclasten [97]. Samen met de resultaten beschreven in Hoofdstuk 6 heeft dit geleid tot een nieuwe hypothetische functie voor de geranylgeranyl zijketen van MK-4.

Deze gemelde remmende effecten van MK-4 op bot verlies zijn vergelijkbaar met de resultaten verkregen uit studies met bisfosfonaat behandeling. Daarnaast kan mediale verkalking evenals botverlies worden tegengegaan door behandeling met bisfosfonaten [163] of een hoge dosis MK-4 (Hoofdstuk 6), maar niet door behandeling met vitamine K1. Bisfosfonaten zijn bekende remmers van osteoclastische bot resorptie. Stikstof bevattende bisfosfonaten zijn specifieke remmers van het enzym farnesyl-pyrofosfaat synthase en dit leidt in bot tot een gereduceerde productie van de componenten farnesyl-pyrofosfaat en geranylgeranyl-pyrofosfaat [186]. Deze laatste component is nodig voor de prenylering van signaal overbrengende eiwitten zoals rho, rac en ras welke de osteoclast activiteit en bot resorptie stimuleren [238]. Op deze manier zorgen bisfosfonaten voor een verstoorde signaal overdracht, gevolgd door inactiviteit en apoptose van de osteoclasten. In dit systeem zal de geranylgeranyl zijketen van MK-4 fungeren als een competitieve remmer van de prenylering van signaal overbrengende eiwitten. De naphthoquinone groep van MK-4 kan de fosforylering van farnesyl en geranylgeranyl blokkeren of de eiwit koppeling aan farnesyl- en geranylgeranyl-pyrofosfaat. Als een gevolg hiervan kan een hoge dosis MK-4 binden aan de geranylgeranyl-bindende plaatsen in het prenylerings enzym systeem en deze dus verzadigen. Dit maakt ook meteen duidelijk waarom een hoge dosis MK-4 nodig is voor *in vivo* effecten, vergelijkbaar met die verkregen met bisfosfonaten.

De associatie van MGP met de extracellulaire matrix, de aanwezigheid van een voorspeld signaal-peptide en de Gla-residuen in zijn N-terminus, suggereren dat MGP een extracellulair eiwit is. In Hoofdstuk 8 laten we een

intracellulaire lokalisatie zien voor MGP in een humane aorta VSMCs cultuur, een humane borstkanker epitheel cel (T47D) cultuur en een humane osteosarcoma cel (MG-63) cultuur. Deze gegevens staan in contrast tot de extracellulaire lokalisatie van MGP *in vivo* en suggereren dat het eiwit via een tot nu toe onbekend mechanisme door de cellen wordt uitgescheiden. We vonden dat VSMCs in apoptose MGP bevattende apoptotische lichaampjes vrijgeven. Tevens werden in normale cel culturen, welke MGP tot expressie brengen, membraan blaasjes gedetecteerd met daarin MGP. Apoptotische lichaampjes of membraan blaasjes kunnen dus de afgifte van MGP door cellen verzorgen.

Gedurende de laatste decennia wordt het steeds duidelijker dat vitamine K-afhankelijke eiwitten niet alleen betrokken zijn bij de bloedstolling, maar ook een belangrijke rol spelen in andere processen. Een voorbeeld van zo een vitamine K-afhankelijk eiwit is het matrix Gla proteïne, dat betrokken is bij het voorkomen van zacht weefsel verkalking. Samen met de voorgestelde tweede functie van menaquinone-4 maakt dit het wetenschappelijke veld van γ -glutamyl carboxylering, vitamine K en matrix Gla proteïne van potentieel belang in cardiovasculair onderzoek.