



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Lessons from snake venom: new insights into the structural and functional aspects of factor V and factor X

Verhoef, D.

Citation

Verhoef, D. (2021, September 22). *Lessons from snake venom: new insights into the structural and functional aspects of factor V and factor X*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3213580>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3213580>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Nederlandse samenvatting

Bloedstolling is een essentieel proces waarbij het bloed stolt om een beschermende barrière te vormen ter voorkoming van bloedverlies. De vorming van een bloedstolsel wordt normaal gesproken in gang gezet na schade aan de endotheelcellen van een bloedvat. Dit leidt vervolgens tot activering van bloedplaatjes welke ter plekke een bloedprop vormen waarmee de beschadigde vaatwand wordt afgedicht. Deze initieële prop is echter vrij zwak en moet verstevigd worden om goed op zijn plek te kunnen blijven. Het verstevigen van de bloedprop gebeurt met behulp van een aantal gespecialiseerde eiwitten uit het bloed. Deze eiwitten, ook wel stollingsfactoren genoemd, worden vanuit het bloed aangetrokken tot de beschadigde celmembranen van endotheelcellen en bloedplaatjes. Deze stollingsfactoren maken vervolgens in en om de bloedprop heen een verstevigend netwerk van polymeren aan. Deze polymeren worden geproduceerd door het bloedstollingsenzym trombine welke het stollingseiwit fibrinogeen omzet in fibrinepolymeren. De enzymatische werking van trombine moet echter uiterst nauwkeurig worden gecontroleerd om te voorkomen dat er geen fibrinepolymeren elders in het bloed kunnen ontstaan. Wanneer dit niet het geval is kan dit bijvoorbeeld leiden tot een pathologische en levensbedreigende aandoening genaamd trombose. Onvoldoende trombine-activiteit kan daarentegen resulteren in een verminderde afzetting van fibrine waardoor er een instabiel bloedstolsel ontstaat. Dit kan uiteindelijk leiden tot herhaaldelijk bloeden waardoor er gevaarlijke complicaties kunnen optreden.

Trombine wordt normaal gesproken in een inactieve pro-enzym vorm in het bloed gehandhaafd, deze vorm noemt men protrombine. De omzetting van protrombine in trombine wordt verricht door een enzymatisch complex genaamd protrombinase. Dit complex bestaat uit twee essentiële stollingsfactoren: geactiveerd factor V (vijf) en geactiveerd factor X (tien); FVa en FXa in het kort. Beide stollingsfactoren worden normaal gesproken alleen geactiveerd na schade aan de vaatwand. Normaal gesproken kunnen FVa en FXa uitsluitend een complex vormen op celmembranen, bijvoorbeeld op geactiveerde bloedplaatjes en beschadigd endotheel van de vaatwand. Zodanig vindt de omzetting van protrombine in trombine alleen plaats op plekken waar er sprake is van vaatschade. Ter voorkoming van trombose circuleren er bovendien verschillende antistollingseiwitten in het bloed welke de werking van trombine, FVa en FXa kunnen beperken. In deze context is het gif van de Australische gifslang *Pseudonaja textilis*, de 'common brown snake', zeer interessant. Het gif van deze slang bevat namelijk een krachtig enzymcomplex dat veel lijkt op het menselijke protrombinase, met als uitzondering dat het protrombine kan omzetten in afwezigheid van een beschadigd celmembraan. Het prothrombinase uit slangengif bestaat uit homologe FVa en FXa stollingseiwitten welke zeer efficiënt het bloedstollingsstelsel van prooidieren kunnen ontregelen.

De FVa en FXa homologen uit slangengif zijn bovendien ongevoelig voor de beperkende werking van antistollingseiwitten. Een slangenbeet leidt zodanig tot een overactief stollingssysteem en het ontstaan van micro-stolsels welke zeer grote schade aan weefsels en organen toebrengen. In dit proefschrift heb ik de moleculaire structuur en functionele eigenschappen van het *P. textilis* slangengif FXa-FVa-complex bestudeerd met als doel om het krachtige stollingspotentiaal hiervan te kunnen benutten voor toekomstig medisch gebruik.

In het eerste deel van dit proefschrift is de relatie onderzocht tussen verschillende moleculaire modificaties die uniek zijn voor het *P. textilis* gif FV molecuul (ptFV) en de uitzonderlijke functionele eigenschappen van dit molecuul. Onder normale omstandigheden wordt FVa in het bloed als niet-actief molecuul bewaard (aangeduid als FV) totdat er activatie van de stolling optreedt. Het niet-actieve FV molecuul bestaat uit zes subeenheden, drie zogenaamde A-domeinen, een groot B-domein welke de activiteit van het eiwit reguleert, en twee C-domeinen. Activering van FV vindt plaats nadat het B-domeinsegment is verwijderd door de enzymatische werking van trombine of FXa. Eerdere studies hebben aangetoond dat het B-domein vrijwel volledig afwezig is in de genetische code van ptFV, waardoor het molecuul in principe direct actief zou moeten zijn nadat het aangemaakt is. In **hoofdstuk 2** werd onderzocht of deze genetische eigenschap uniek is voor ptFV, of dat het een algemeen kenmerk is voor FV moleculen in slangen. Om dit te onderzoeken werd er cDNA uit de lever van 13 verschillende slangensoorten geïsoleerd en met behulp van DNA sequencing geanalyseerd. Elke slangensoort bleek twee afzonderlijke cDNA transcripten van FV te hebben: een lang transcript met een volledige B-domein sequentie en een aanzienlijk korter transcript zonder B-domein sequentie. Bij vrijwel alle slangensoorten werd in het lange transcript tevens een zogenaamde 'pre-RNA-splice site' teruggevonden. Deze ontdekking doet vermoeden dat de functie van het ptFV molecuul aangepast kan worden door het B-domein segment uit het RNA te verwijderen nog voordat het molecuul wordt aangemaakt. De belangrijkste vinding is echter dat het B-domein segment in het algemeen deel uitmaakt van slangen FV en mogelijk dus nog steeds functioneert als een potentiële regulator van FV activiteit.

In **hoofdstuk 3** zijn de functionele aspecten van het ptFV molecuul op moleculair niveau onderzocht door nieuwe varianten van dit eiwit te maken, en deze vervolgens te testen op hun vermogen om protrombine omzetting te ondersteunen. Zoals eerder vermeld kan het *P. textilis* gif FXa-FVa-complex protrombine omzetten in afwezigheid van een procoagulant celmembraan zoals dat van geactiveerde bloedplaatjes. Deze eigenschap wordt lipidenonafhankelijke FVa-functie genoemd. Deze specifieke functie stelt het gifmolecuul in staat om door het hele lichaam de bloedstolling te activeren. In hoofdstuk 3 is onderzocht of de lipidenonafhankelijke functie van ptFV is voortgekomen uit de aanwezigheid van een unieke covalente

verbinding tussen het A2- en A3-domein van ptFV. Een dergelijke covalente link zou mogelijk het gifmolecuul kunnen stabiliseren waardoor het beter in staat is om zijn functie uit te oefenen in afwezigheid van een lipidenoppervlak. Interessant genoeg ontbreekt deze covalente verbinding in de ptFV variant die in de lever van de slang wordt aangemaakt. Echter, zowel de gif- en lever-ptFV bleken beiden in staat om lipidenonafhankelijke protrombineconversie te ondersteunen. Dit toont aan dat de covalente verbinding tussen het A2- en A3-domein geen rol speelt in de lipidenonafhankelijke functie van het ptFV gifmolecuul. In een eerdere studie werd daarnaast aangetoond dat de functie van het ptFV molecuul niet verstoord kon worden door geactiveerd proteïne C (APC), een belangrijk anti-stollings enzym dat FVa af kan breken. In hoofdstuk 3 is tevens vastgesteld dat de covalente verbinding tussen het A2- en A3 domein ook niet betrokken is bij het behoud FVa functie na afbraak door APC.

In **hoofdstuk 4** zijn aanvullende functionele aspecten van het ptFV molecuul onderzocht door hybride varianten (chimera's) van ptFV en humaan FV te ontwerpen en te testen. Hiertoe zijn er twee chimera's van FV gemaakt waarbij de A-domeinen van menselijk FV werden gekoppeld aan de C-domeinen van het ptFV, of vice versa. Functionele analyse van deze chimeren toonde aan dat de ptFV C-domeinen niet relevant waren voor de lipidenonafhankelijke FVa-functie. Namelijk, de chimeer die de A-domeinen van ptFV omvatte in combinatie met de C-domeinen van humaan FV was goed in staat om protrombine omzetting te ondersteunen in afwezigheid van lipiden. De chimeer die de humane A-domeinen en de ptFV C-domeinen omvatte was daarentegen niet in staat om protrombine omzetting onder vergelijkbare omstandigheden te ondersteunen. In hoofdstuk 4 was ook de relatie tussen de stabiliteit van het FV molecuul en het vermogen om aan lipidenoppervlakken te binden onderzocht. De chimeer bestaande uit de humane A-domeinen en ptFV C-domeinen bleek een verbeterde stabiliteit te hebben, terwijl de chimeer bestaande uit de ptFV A-domeinen en humane C-domeinen een verslechterde stabiliteit had. Het vermogen om aan het lipidenoppervlak te binden was daarentegen juist verbeterd in deze chimeer. Tegelijkertijd bleek het vermogen om aan het lipidenoppervlak te binden afgenomen in de chimeer bestaande uit de A-domeinen van ptFV en C-domeinen van humaan FV. Deze bevindingen tonen aan dat het vermogen van de C-domeinen om het lipidenoppervlak te binden is gekoppeld aan de stabiliteit van het gehele FV molecuul.

In het tweede deel van dit proefschrift zijn de structurele en functionele eigenschappen van het FX molecuul uit slangengif nader onderzocht. In **hoofdstuk 5** werd aangetoond dat het ptFXa slangengif enzym ongevoelig is voor inhibitie van zijn katalytische activiteit door kleine moleculaire remmers van FXa, zoals apixaban, rivaroxaban en edoxaban. Deze synthetische FXa remmers worden vaak voorgeschreven als antistollingsmiddelen om trombose te voorkomen,

maar kunnen als bijwerking ook ernstige bloedingen veroorzaken. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de moleculaire structuur van ptFXa op een belangrijk punt afwijkt van humaan FXa. Namelijk, in het serine protease domein van ptFXa is de polypeptide keten van de '99-loop' aanmerkelijk langer dan die van humaan FXa. Deze 99-loop maakt onderdeel uit van de zogenaamde 'katalytische site' van het enzym en is belangrijk voor de herkenning van andere moleculen die betrokken zijn bij de bloedstolling. In hoofdstuk 5 werden drie hybride varianten van het humane FXa gekarakteriseerd waarin de originele 99-loop was vervangen door de 99-loop uit drie verschillende slangengif FXa's. Deze hybride FXa varianten bleken allen aanzienlijk minder gevoelig te zijn voor inhibitie door synthetische FXa remmers, maar functioneerden verder nagenoeg gelijk aan humaan FXa. In theorie zouden deze hybride varianten het dus mogelijk maken om de bloedstolling te herstellen bij patiënten welke synthetische FXa remmers als antistollingsmiddelen gebruiken. Een van deze drie hybride FXa moleculen, genaamd VMX-C001, is momenteel in preklinische ontwikkeling als medicijn tegen FXa remmers voor patiënten die herstel van de bloedstolling nodig hebben, bijvoorbeeld bij een inwendige bloeding of wanneer er onmiddellijk geopereerd moet worden.

In **hoofdstuk 6** is een deel van het preklinische onderzoek beschreven dat werd uitgevoerd ten behoeve van de ontwikkeling van VMX-C001. Om een geschikt diermodel te identificeren voor de preklinische ontwikkeling van VMX-C001 zijn er met behulp van routinematige en speciale stollingstesten verschillende dierenplasma's getest. Hierbij werd ontdekt dat geactiveerd humaan FX versneld wordt geremd in het plasma van konijnen, ratten en in het bijzonder muizen. Dit maakt deze plasma's minder geschikt voor onderzoek met humaan FX. Deze nieuwe bevindingen benadrukken echter ook dat er soortspecifieke verschillen zijn welke de interpretatie van stollingsproeven kunnen beïnvloeden. Kleine dieren worden vaak gebruikt als experimenteel model in preklinisch onderzoek. Omdat het plasma van ratten gevoelig genoeg was voor veelgebruikte stollingsproeven kunnen deze dieren evenwel goed dienst doen als een relevant diermodel voor de preklinische evaluatie van VMX-C001.



