



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The unique procoagulant adaptations of *pseudonaja textilis* venom factor V and factor X

Schreuder, M.

Citation

Schreuder, M. (2022, September 22). *The unique procoagulant adaptations of pseudonaja textilis venom factor V and factor X*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3464432>

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/1887/3464432>

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

Chapter 9

Nederlandse Samenvatting





Nederlandse Samenvatting

De stollingscascade speelt een belangrijke rol in de vorming van een bloedstolsel om bloedverlies te beperken na vasculaire schade. Wanneer het stollingsstelsel geactiveerd wordt, wordt er via een serie van enzymatische reacties een sterk fibrine netwerk aangelegd. Dit fibrine netwerk stabiliseert het initiële bloedstolsel dat gevormd wordt door de aggregatie van bloedplaatjes en dat het gat in het bloedvat als eerste afsluit. Centraal in de stollingscascade staan de plasma-eiwitten factor V (FV) en factor X (FX) die na activatie worden aangeduid als factor Va (FVa) en factor Xa (FXa). In de stolling functioneert FVa als cofactor van het enzym FXa en samen vormen deze eiwitten het zogenaamde protrombinase complex dat verantwoordelijk is voor de omzetting van protrombine naar het essentiële stollingsenzym trombine. Om ongewenste stolling te voorkomen kan dit complex alleen gevormd worden in de aanwezigheid van calcium en een negatief-geladen membraan dat voornamelijk aangeleverd wordt door de geactiveerde bloedplaatjes die zich op de plek van de wond bevinden. Wanneer er genoeg trombine en fibrine aangemaakt is zorgen specifieke antistollingsfactoren ervoor dat er niet teveel bloedstolling plaatsvindt door de procoagulante factoren te inactiveren. De inactivatie van FVa speelt een belangrijke rol in het stopzetten van de bloedstolling en wordt gereguleerd door geactiveerd proteïne C (APC). APC knipt FVa op drie verschillende plekken in het FVa A2 domein wat leidt tot dissociatie van het A2 domein. Doordat het A2 domein belangrijke bindingsplekken voor FXa en protrombine bevat kan het protrombinase complex na dissociatie niet meer gevormd worden en verliest dit complex zijn activiteit. Daarnaast wordt het enzym FXa door verschillende antistollingsfactoren geïnactiveerd, waarvan tissue factor pathway inhibitor (TFPI) en antitrombine de belangrijkste zijn. Deze antistollingsfactoren binden in de actieve centrum van FXa en blokkeren daarmee de toegang voor het substraat protrombine.

Afwijkingen in stollings- of antistollingsfactoren kunnen de regulatie van de bloedstolling verstoren en resulteren in bloedingscomplicaties of overmatige bloedstolling, ook wel trombose genoemd. Een belangrijke afwijking in FV is de R506Q mutatie (FV Leiden) die ervoor zorgt dat APC FVa in mindere mate kan inactiveren met als gevolg een zevenvoudig verhoogd risico op trombose. Het verstoren van de bloedstolling kan echter ook een krachtig instrument zijn. Slangen die tot de meest giftige ter wereld behoren gebruiken uniek gemodificeerde stollingseiwitten om het bloed ongecontroleerd te laten stollen. De gif geïnduceerde stolsels resulteren in een hart- en/of herseninfarct waardoor het prooidier geïmmobiliseerd raakt. Het gif van dergelijke slangen heeft zo'n desastreus effect op de bloedstolling doordat het speciale FV- en FX-achtige eiwitten bevat. Onderzoek aan een van deze slangen, *Pseudonaja textilis*, heeft aangetoond dat het in het gif aanwezige FV (ptFV) en FX (ptFX) unieke eigenschappen hebben die

de normale regulering van deze eiwitten omzeilen. Waar het humane FV in plasma circuleert als een inactieve procofactor en geactiveerd wordt via proteolyse op een aantal specifieke knipplekken, is ptFV van nature al actief als cofactor voor geactiveerd ptFX (ptFXa). Een zuur en basisch gedeelte van het FV B domein voorkomt in humaan FV dat het ongeactiveerde FV als cofactor kan dienen voor FXa. In ptFV is echter een groot deel van het B domein afwezig, waaronder de essentiële zure en basische onderdelen. Daarnaast is aangetoond dat ptFV resistent is tegen APC, ondanks dat ptFV geknipt wordt door APC in het A2 domein. Verder is het ptFV-ptFXa complex actief in afwezigheid van een negatief-geladen membraan en het kan daardoor potentieel overal in de bloedbaan de bloedstolling stimuleren. De mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de APC resistentie of voor de activiteit van het ptFVa-ptFXa complex in de afwezigheid van een normaal essentiële membraan zijn tot nu toe niet bekend. In dit proefschrift is getracht om de mechanismen van deze unieke eigenschappen te ontrafelen door de functie van enkele bijzondere structurele elementen in ptFV en ptFX te bestuderen. We hebben dit geprobeerd te doen door enkele chimere eiwitten te maken waarbij deze structurele elementen uitgewisseld zijn tussen humaan en *P. textilis* FV/FX en vervolgens zijn de functionele consequenties onderzocht.

De interactie die eiwitten met elkaar aangaan zijn doorgaans van cruciaal belang voor hun functie. Een suboptimale binding tussen FVa en FXa kan bijvoorbeeld de omzetting van protrombine verminderen en ervoor zorgen dat er te weinig bloedstolling plaatsvindt. Karakterisering van de bindingsplekken kan daarmee niet alleen belangrijke informatie verschaffen over het werkingsmechanisme van de eiwitten, maar biedt ook de mogelijkheid om de interactie te beïnvloeden voor therapeutische doeleinden. In **hoofdstuk 2** bespreken we de huidige literatuur die ingaat op de interactie van FVa met FXa en protrombine en proberen we specifieke bindingsplekken te identificeren. Dit overzicht geeft een richtlijn voor vervolgonderzoeken met doelgerichte experimenten die bindingsplekken verder kunnen karakteriseren.

In **hoofdstuk 3** proberen we het mechanisme dat aan de basis ligt van ptFV's functionele resistentie voor APC te ontrafelen. APC knipt humaan FVa in het A2 domain op de plekken R306, R506, en R679. De knip op R506 resulteert in een intermediair FVa eiwit met ~50% cofactor activiteit. De R306 positie wordt veel langzamer geknipt dan de R506 positie, maar deze knip is essentieel om FVa volledig te kunnen inactiveren. Het doel van de R679 plek is niet geheel duidelijk. Eerdere studies hebben laten zien dat ptFV door APC op K507 wordt geknipt, een vergelijkbare positie als R506 in het humane FVa. Echter in tegenstelling tot humaan FVa wordt ptFV niet op een vergelijkbare R306 positie geknipt. Omdat deze knipplek essentieel is voor de inactivering van humaan FVa zou de afwezigheid van een R306 knipplek mogelijk de resistentie van ptFV voor APC kunnen

verklaren. Daarnaast bevat ptFV een unieke disulfide brug die het A2 domein met het A3 domein verbindt. Deze covalente verbinding zou potentieel de A2 domein dissociatie kunnen voorkomen. In **hoofdstuk 3** hebben we FV varianten gegenereerd waarbij de R306 regio is uitgewisseld tussen humaan FV en ptFV. Daarnaast hebben we een ptFV variant gecreëerd waarbij we eveneens de disulfide brug hebben verwijderd middels mutagenese. Door deze FV varianten via functionele experimenten te karakteriseren hebben we aangetoond dat deze elementen de resistentie voor APC niet kunnen verklaren. Echter een belangrijke observatie in onze studie was dat incorporatie van de R306 knipplek niet leidde tot dissociatie van het A2 domein na de behandeling met APC. Dit impliceert dat het ptFV A2 domein via sterke non-covalente interacties gelinkt is aan de A1-A3 domeinen. In vervolggexperimenten hebben we getracht om deze interacties te identificeren. Via 'Moleculaire Dynamische' simulaties konden we aantonen dat de A2 domein dissociatie in humaan FVa geïnduceerd wordt door verlies aan bindingsaffiniteit tussen het A1 en A2 domein. Daarentegen bevat ptFV een sterke bindingsinteractie die gefaciliteerd wordt door een specifieke A2 domein loop, de zogenaamde A2 domein loop2, met het A1 domein. Deze stabiele interactie voorkomt mogelijk de A2 domein dissociatie en zou dus een belangrijke oorzaak kunnen zijn van de APC resistentie.

In **hoofdstuk 4** hebben we de functionele rol van de verlengde A2 domein C-terminus (A2T) in ptFV onderzocht. Na activering bestaat FVa uit een zware keten (A1 en A2 domeinen) en een lichte keten (A3, C1, en C2 domeinen) die non-covalent met elkaar verbonden zijn. Het A2T vormt een lange keten van aminozuren welke interacties aangaat met FXa en protrombine. De exacte functie van deze regio is niet geheel duidelijk. Hoewel tegenstrijdige resultaten gepubliceerd zijn duiden eerdere studies op een rol in de vorming van het protrombinase complex of de binding van protrombine. Sequentie analyses tonen aan dat de lengte van het FV A2T relatief gelijk is gebleven tijdens de evolutie. Het is daarom opvallend dat, vergeleken met het humane A2T, het A2T verlengd is met 31 aminozuren in het gif FV van de *Elapidae* slangen. Om de rol van het verlengde A2T in ptFV te ontrafelen hebben we FV varianten gegenereerd waarin het A2T uitgewisseld is tussen humaan FV en ptFV. Protrombinase experimenten toonden aan dat het ptFV A2T niet significant beter of slechter aan (pt)FXa of protrombine bindt in de aanwezigheid van negatief-geladen fosfolipiden. Daarentegen vonden we tot onze verassing dat de FV varianten met het ptFV A2T significant meer activiteit vertoonden in vergelijkbare experimenten waarin deze fosfolipiden afwezig waren. Bovendien was de fosfolipide-onafhankelijke activiteit van een ptFV eiwit met het humane A2T vrijwel volledig verdwenen. Experimenten waarbij gebruik werd gemaakt van fosfolipase C om eventuele lipiden die zich als onzuiverheid in de eiwit preparaten bevinden te verwijderen bevestigden onze waarneming dat het ptFV A2T verantwoordelijk is voor de cofactor activiteit in de afwezigheid van fosfolipiden. De fosfolipide-onafhankelijke

activiteit was echter alleen waarneembaar in de aanwezigheid van ptFXa en dit geeft aan dat ptFXa een essentieel element bevat dat deze reactie mogelijk maakt. Welk structureel element in ptFXa hiervoor verantwoordelijk is, is niet bekend.

Onze uitkomsten lieten daarnaast ook zien dat het ptFV A2T een belangrijk element is welke ptFV in staat stelt om protrombine om te zetten na proteolyse door APC. Vervanging van het ptFV A2T voor de overeenkomstige humane regio verminderde de cofactor activiteit aanzienlijk na behandeling met APC. Dit suggereert dat het ptFV A2T een substantiële rol speelt in de APC-resistentie en vermoedelijk mogelijk gemaakt wordt door productieve interacties aan te gaan met ptFXa en/of protrombine. Deze suggestie werd verder ondersteund door onze waarneming dat de afname van cofactor activiteit geen gevolg was van de A2 domein dissociatie. Samengevat hebben we substantieel bewijs gevonden dat evolutie van het FV A2T een cruciale bijdrage heeft geleverd aan de extreme procoagulante eigenschappen van ptFV. De in dit hoofdstuk verkregen resultaten impliceren dat het ptFV A2T stabiele interacties aan kan gaan met ptFXa en protrombine in condities waarin dit normaal niet mogelijk is, namelijk in de afwezigheid van negatief-geladen fosfolipiden of na proteolyse door de natuurlijke remmer APC.

Naast de exceptionele mechanismen die ptFV in staat stellen om de bloedstolling ongecontroleerd te stimuleren bevat ptFX ook verschillende elementen die op unieke wijze zijn aangepast tijdens de evolutie. Een van deze elementen is een opzienbarende verkorting van het activatie peptide. Hoewel het activatie peptide van alle FX-homologen uit tenminste 40 residuen bestaat, waaronder het ptFX dat tot expressie komt in de lever, is het activatie peptide van het gif ptFX slechts 27 residuen lang. In **hoofdstuk 5** hebben we de consequenties van deze verkorting op de activering en activiteit van FX bestudeerd. Afhankelijk van de stimulus waarmee de stolling geïnitieerd is wordt FX geactiveerd door het intrinsieke (factor VIIIa-factor IXa) of extrinsieke (tissue factor-factor VIIa) tenase complex. Met behulp van FX varianten waarin het activatie peptide is uitgewisseld tussen humaan FX en ptFX hebben we laten zien dat de FX activatie via het extrinsieke tenase complex onafhankelijk van het activatie peptide verloopt. Dit is in overeenstemming met eerdere studies die erop wezen dat het activatie peptide geen rol speelt in de FX activatie uitgevoerd door dit complex. Daarentegen was de activatie door het intrinsieke tenase complex vrijwel volledig geremd in onze FX variant met het ptFX activatie peptide (hFX-ptAP). Competitie studies demonstreerden verder dat het humane activatie peptide van FX een belangrijke bindingsplek herbergt voor het intrinsieke tenase complex. Onze waarnemingen geven daarmee aan dat het ptFX activatie peptide resistentie tegen het intrinsieke tenase complex induceert doordat

een belangrijke bindingsplek voor dit complex niet aanwezig is in het ptFX activatie peptide.

Daarnaast hebben we bestudeerd of de zymogeniciteit van FX is veranderd als gevolg van de uitwisseling van het activatie peptide. Resultaten uit een eerdere studie suggereerden dat ptFX actief is in zymogene, niet geactiveerde, vorm. Uit onze kinetische data blijkt dat het gif activatie peptide hiervoor verantwoordelijk is. De protrombine conversie door onze chimere ptFX en humaan FX varianten was namelijk sterk verminderd of verhoogd, respectievelijk, ten opzichte van hun wild-type tegenhangers. De zymogene activiteit bleek volledig afhankelijk te zijn van FVa. Verassend genoeg bleek daarnaast dat actieve centrum remmers zoals antitrombine, TFPI, en de directe FXa remmer apixaban niet binden aan hFX-ptAP. Deze data suggereren dat het verkorte gif-FX activatie peptide cofactor binding en vorming van een prematuur protrombinase-complex mogelijk maakt. De FVa-FX interactie induceert vervolgens structurele veranderingen in het enzym die het katalytisch centrum beschikbaar maken en FX in staat stellen om zijn natuurlijke substraat om te zetten. Hoe het gif activatie peptide de resistentie voor het intrinsieke tenase complex of de verhoogde zymogene activiteit precies mogelijk maakt is niet bekend. Wellicht zou de afwezigheid van een zuur/hydrofoob gebied dat verwijderd is uit het gif activatie peptide en/of N- of O-gebonden glycanen deze observatie kunnen verklaren.

De mechanismen die verantwoordelijk zijn voor de unieke eigenschappen van ptFV en ptFX zouden wellicht vertaald kunnen worden naar humane stollingsfactoren om zodoende eiwitvarianten te genereren met de potentie om bloedingscomplicaties of bloedingsziekten te behandelen. Eerder onderzoek in ons laboratorium heeft aangetoond dat humane FX varianten die een structureel element bevatten afkomstig uit slangengif FX een sterk verminderde sensitiviteit hebben voor de directe FXa remmers. Deze FXa remmers worden als antistollingsmiddel voorgeschreven aan patiënten voor de behandeling en preventie van veneuze trombose of een beroerte. Helaas kunnen als gevolg van het gebruik van deze middelen ernstige bloedingscomplicaties optreden als bijwerking. Een van deze FX varianten, FX-C, had het vermogen om de trombine generatie in plasma geremd door de directe FXa remmers te herstellen. Als zodanig heeft deze variant de potentie om bloedingscomplicaties als gevolg van de directe FXa remmers tegen te gaan. In **hoofdstuk 6** hebben we de tot nu toe ontwikkelde middelen beschreven die de potentie hebben om het effect van de directe FXa remmers op te heffen. Dit overzicht toont de verschillende strategieën die zijn toegepast om de directe FXa remmers weg te vangen of om de bloedstolling te stimuleren in de aanwezigheid van deze antistollingsmiddelen.

In silico simulaties en inhibitie experimenten uit een vorige studie van ons laboratorium toonden aan dat aminozuur substituties in de zogenaamde S4 subsite van FXa's actieve centrum de binding van de directe FXa remmers verminderde. Substitutie van de S4 subsite residue Y99 resulteerde echter in een FX variant met een sterk verlaagd stollingspotentieel. In tegenstelling hiermee behield een FX-variant met een F174-substitutie de stollingsactiviteit. Deze variant zou daarmee mogelijk de directe FXa remmers kunnen omzeilen door de stolling te stimuleren in de aanwezigheid van deze remmers. In **hoofdstuk 7** hebben we het therapeutische potentieel van de FX varianten met een F174 substitutie onderzocht. FXa varianten met de aanpassingen F174A, F174S, of F174I vertoonden een vergelijkbare verlaging in de gevoeligheid voor de directe FXa remmer apixaban. Het omzeilingsmechanisme van de FX-F174A en FX-F174S varianten werd vervolgens uitgebreid gekarakteriseerd. Middels trombine generatie experimenten konden we demonstreren dat onze varianten beschikken over een 10- tot 35-voudige verlaging in de gevoeligheid voor de directe FXa remmers apixaban, rivaroxaban, en edoxaban. Deze waarnemingen wezen erop dat FX varianten met een F174 substitutie de stolling kunnen stimuleren in de aanwezigheid van een fysiologische concentratie FXa remmer. Dit effect bleek een gevolg te zijn van enerzijds een verandering in de S4 subsite waardoor de FXa remmers niet meer stabiel in het actieve centrum konden binden en anderzijds door een verminderde sensitiviteit voor de natuurlijke antistollingseiwit TFPI. Het vermogen om de directe FXa-remmers te omzeilen en de hemostase te herstellen werd vervolgens gevalideerd in plasma afkomstig van patiënten met atriumfibrilleren of veneuze trombose die werden behandeld met apixaban of rivaroxaban. Deze experimenten bevestigden de procoagulante werking van onze FX varianten in de aanwezigheid van de directe FXa remmers. Samengevat hebben deze varianten de potentie om als prohemostatische omzeilingsstrategie te dienen en levensbedreigende bloedingscomplicaties tegen te gaan.

In **hoofdstuk 8** worden de belangrijkste vindingen van het promotieonderzoek samengevat. In dit hoofdstuk worden ook de inzichten, moleculaire mechanismen, en implicaties in meer detail bediscussieerd.

Nederlandse Samenvatting voor Leken

Het hart en de bloedvaten vormen een essentieel systeem waarmee zuurstof en belangrijke bouwstenen worden getransporteerd naar de organen en cellen in het lichaam en waarmee tegelijkertijd afvalstoffen worden afgevoerd. Wanneer er sprake is van schade aan de bloedvaten, bijvoorbeeld in het geval van een verwonding, zorgt het bloedstollingsysteem voor de vorming van een bloedstolsel om de wond te dichten en het bloedverlies te beperken. In eerste instantie zullen bloedplaatjes zich aan de open wond hechten om zo het bloedvat te dichten. Bloedplaatjes zijn kleine celfragmenten die als de EHBO'ers van het bloed kunnen worden beschouwd. Het stolsel dat op deze manier gevormd wordt is echter niet sterk genoeg. Om het stolsel te verstevigen worden er zogenaamde fibrinedraaden gevormd door het stollingssysteem. Deze fibrinedraden vormen een kleverig net om de bloedplaatjes stevig bij elkaar te houden. Het stollingssysteem, ook wel coagulatie genoemd, vormt een balans tussen eiwitten die zorgen voor bloedstolling (pro-coagulanten) en eiwitten die de bloedstolling tegengaan (anti-coagulanten).

Eiwitten zijn de minuscule werkers van het lichaam. Vrijwel elk proces in het menselijke lichaam wordt uitgevoerd door eiwitten die opgebouwd zijn uit aminozuren en bestaan in allerlei soorten en maten. De eiwitten die een rol spelen in de bloedstolling worden ook wel stollingsfactoren genoemd. Centraal in de bloedstolling staan de stollingsfactoren genaamd factor V en factor X. Wanneer er schade aan een bloedvat ontstaat worden deze stollingsfactoren geactiveerd en vormen ze samen het zogenaamde protrombinase enzymcomplex. Dit complex is verantwoordelijk voor de activering van het inactieve protrombine tot het actieve eiwit trombine en vormt een erg belangrijke stap in de vorming van een bloedstolsel. Trombine zorgt namelijk voor de vorming van de fibrinedraden die het bloedstolsel verstevigen. Maar nog belangrijker, trombine activeert allerlei stollingsfactoren via verschillende terugkoppelingsmechanismen. Op deze manier wordt er nog veel meer factor Va, factor Xa, en trombine gevormd wat nodig is om genoeg fibrinedraaden te maken. De vorming van trombine wordt daarmee ook wel als een drempel beschouwt; wanneer er eenmaal een bepaalde hoeveelheid trombine gemaakt is zal er een stevig bloedstolsel gevormd worden. Na de vorming van het stevige bloedstolsel worden de anti-coagulante stollingseiwitten geactiveerd. Deze anti-stollingsfactoren inactiveren de pro-coagulante eiwitten om ervoor te zorgen dat het stolsel niet te groot wordt en het bloedvat volledig geblokkeerd wordt.

De balans tussen pro-coagulante en anti-coagulante stollingsfactoren is erg belangrijk en zorgt ervoor dat er niet te weinig of teveel bloedstolling plaatsvindt. Genmutaties

en omgevingsfactoren kunnen deze balans echter beïnvloeden met ernstige gevolgen. Op het moment dat het bloed niet of te weinig stolt kan een wond blijven bloeden en ontstaat er schade aan omliggende weefsels, zoals bijvoorbeeld in het geval van een hersenbloeding. Aan de andere kant, wanneer er een stolsel wordt gevormd op een plek waar dat niet nodig is kunnen bloedvaten verstopt raken en bijvoorbeeld een hartinfarct veroorzaken. Het evenwicht in het stollingssysteem is dus cruciaal om te voorkomen dat er trombose ontstaat of bloedingen optreden.

Hoewel een disbalans in het stollingssysteem nadelige gevolgen kan hebben, zijn er verschillende dieren die via hun gif gebruik maken van de bloedstolling om prooidieren te vangen. Met behulp van speciale gifeiwitten, zogenaamde coagulotoxines, verstoren zij de balans om interne bloedingen te induceren (anti-coagulant gif) of vele stolsels in de bloedbaan te vormen (pro-coagulant gif). In beide gevallen probeert het roofdier schade aan te richten aan het hart en/of de hersenen zodat het prooidier niet kan ontsnappen. De coagulotoxines komen met name in slangen voor, waarvan de meest giftige slangensoorten uit Australië afkomstig zijn. Een van deze gifslangen is de *Pseudonaja textilis*, ook wel de Oosterse bruine slang genoemd. Deze slang komt uit de familie koraalslangachtigen (*Elapidae*) en deze soort geldt als de op één na giftigste slang ter wereld. Wanneer deze slang zijn gif injecteert zorgen speciale gifstollingseiwitten dat het bloed in rap tempo stolt, waardoor er hart- en herseninfarcten kunnen ontstaan. Onderzoek heeft aangetoond dat de gif-geïnduceerde bloedstolling wordt veroorzaakt door de stollingseiwitten die erg lijken op de menselijke stollingsfactoren factor V en factor X. Deze slangengif factor V en factor X eiwitten zijn echter geëvolueerd in specifieke gifeiwitten waardoor ze de bloedstolling oncontroleerbaar kunnen stimuleren.

In dit onderzoek hebben we de werking van factor V en factor X uit het slangengif nader onderzocht. In hoofdstuk 2 bestudeerden we de interactie tussen de menselijke geactiveerde factor V en factor X die samen het protrombinase complex vormen. Wanneer we een beter inzicht hebben in hoe deze eiwitten aan elkaar binden en hoe dit complex vervolgens een interactie aangaat met protrombine, komen we meer te weten over hoe deze eiwitten precies werken en welke delen van de eiwitten belangrijk zijn. Dit kan waardevolle informatie opleveren voor patiënten bij wie de bloedstolling niet goed werkt door een defect in één van deze eiwitten. In de hoofdstukken 3 en 4 hebben we onderzocht hoe het kan dat het slangengif factor V zo extreem actief is en niet geïnactiveerd wordt na de vorming van een bloedstolsel. Onze onderzoeksresultaten hebben aangetoond dat twee delen van het slangengif factor V zo geëvolueerd zijn dat het de stabiliteit van het eiwit sterk verhoogd. In hoofdstuk 5 hebben we laten zien dat ongeactiveerd slangengif factor X al op redelijke schaal trombine kan vormen, terwijl dit

niet of vrijwel niet gebeurd met het menselijke factor X. Dit zou mogelijk een belangrijke werking van het gif kunnen zijn aangezien het factor X op deze manier bloedstolsels kan vormen op plekken waar geen verwondingen zijn, zoals in de hartvaten. Met de kennis die we vergaard hebben door de werking van het slangengif te bestuderen kunnen we wellicht nieuwe geneesmiddelen ontwikkelen ter behandeling van patiënten met een bloedingsziekte of bloedingscomplicaties als gevolg van een chirurgische ingreep of bloedverdunners. In de hoofdstukken 6 en 7 worden zulke nieuwe geneesmiddelen beschreven die deels voortkomen uit het onderzoek naar slangengif. Deze nieuwe geneesmiddelen hebben de potentie om bloedingscomplicaties als gevolg van bloedverdunners tegen te gaan, maar verder onderzoek is nodig om hun werking te testen in de patiënten.

Samengevat kan onderzoek naar gifsoorten dus een belangrijke bijdrage leveren aan de kennis van het menselijke lichaam en aan de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen die de behandeling van allerlei ziektes kunnen verbeteren. In ons onderzoek hebben we dit getracht te doen met de stollingsfactoren uit het gif van de Australische slang *Pseudonaja texilis*. Onze resultaten hebben nieuwe structurele elementen geïdentificeerd in ptFV en ptFX die verantwoordelijk zijn voor de unieke stollingsactiviteit van deze gifeiwitten. Daarnaast heeft de informatie uit gifonderzoek geleid tot de generatie van een nieuw potentieel therapeutisch middel dat gebruikt kan worden als behandelingsmethode wanneer patiënten bloedingscomplicaties krijgen ten gevolge van specifieke antistollingsmiddelen.

