

Genetic mechanisms of inherited bleeding disorders as a basis for personalised medicine approaches

Citation for published version (APA):

Todaro, A. (2024). *Genetic mechanisms of inherited bleeding disorders as a basis for personalised medicine approaches*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20240424at>

Document status and date:

Published: 01/01/2024

DOI:

[10.26481/dis.20240424at](https://doi.org/10.26481/dis.20240424at)

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.

Download date: 02 May. 2024

CHAPTER 7

Summary

Nederlandse samenvatting

SUMMARY

Haemostasis is a finely regulated process that prevents excessive bleeding or clotting. However, genetic mutations in haemostasis-related genes can disrupt this delicate equilibrium, resulting in a bleeding disorder or a thrombotic event.

This thesis focusses on specific genetic defects responsible for bleeding disorders as potential targets for molecular therapeutic approaches. In particular, this thesis focusses on FV and FV-short and on VWF.

Chapter 1 provides an introduction on the mechanisms of haemostasis to stop the bleeding and to prevent blood loss in case of vascular damage. In addition, it describes the bleeding disorders caused by defects of VWF and FV. This chapter also introduces FV-short, a splicing isoform of FV, and the bleeding disorders associated with FV-short over-expression.

Chapter 2 describes a patient with von Willebrand disease (VWD) carrying two *VWF* variants: a novel mutation (R760S) and a common SNP (R924Q). The R760S mutation was extensively characterised and investigated *in vitro*. *In silico* model suggested that the R760S mutation could interfere with cleavage of the propeptide from pre-pro-VWF and this was demonstrated experimentally. In addition, persistence of the propeptide was found to interfere with VWF-FVIII binding. *VWF* mRNA analysis in the patient confirmed the presence of the two mutations in *cis* and revealed that only the mutated allele was expressed. The 'wild type' allele appeared not to be expressed. The underlying cause is still under investigation.

Chapter 3 investigates a patient with FV-deficiency due to a nonsense mutation in *F5* exon 13. The proband is homozygous for this nonsense mutation and has a moderate bleeding tendency. This type of mutation may respond to treatment with agents that enhance the natural readthrough. Analysis of FV (mRNA and protein) resulted favourable for a readthrough correction approach, thus *in vitro* and *ex vivo* experiments were carried out to rescue the impaired FV. COS-1 cells were transfected with *F5* cDNA carrying the nonsense mutation and treated with 5 different agents that were shown in literature to enhance readthrough. *In vitro*, three agents proved able to rescue the expression of functional FV. A cytotoxicity assay performed on three different cell lines revealed that all compounds have some degree of cytotoxicity, except ELX-02. In the *ex vivo* model, patient's megakaryocytes were differentiated from peripheral blood stem cells and treated with the same five compounds. Upon treatment, FV expression in the patient's megakaryocytes was restored. In addition, megakaryocytes were able to internalise G418-corrected mutant FV and DAP-corrected mutant FV, a key finding

for the clinical application of these agents.

Chapter 4 introduces FV-short, the isoform of FV arising from alternative splicing of exon 13 of the *F5* mRNA, resulting in an in-frame deletion of 702 amino acids of the B domain. FV-short tightly binds TFPI α , stabilising it in the circulation and enhancing its inhibitory activity. Mutations that enhance FV-short expression (FV-East Texas, FV-Amsterdam and FV-Atlanta) cause higher levels of TFPI α , resulting in bleeding disorders. In this chapter we explore the possibility of downregulating FV-short using morpholino antisense oligonucleotides (MAOs). A liver cell line (HepG2) that naturally expresses FV and FV-short was used as model. Genetic analysis of HepG2 cells showed a normal *F5* gene copy number; common SNPs were identified but none of them was located at or close to FV-short donor and acceptor splice sites. Furthermore, HepG2 cells express more FV than FV-short, just like normal hepatocytes. Specific MAOs targeting donor or acceptor splice site of FV-short were designed and tested for their ability to downregulate FV-short. Upon 48 h treatment with increasing doses of MAOs (0–50 μ M), both MAOs, alone or in combination, decreased the expression of FV-short mRNA. Since an assay to measure FV-short is not yet available, a qPCR was designed and carefully optimised to quantify FV-short mRNA.

In **chapter 5** we report preliminary results on the use of specific MAOs and siRNAs to downregulate FV-short in *in vitro* models of FV-short over-expression. COS-1 cells were transiently transfected with WT *F5* cDNA or with *F5* cDNAs carrying the FV-East Texas, FV-Amsterdam or FV-Atlanta mutations. FV-short expression in transfected cells was comparable to the FV-short expression found in patients carrying the corresponding mutation. Specific MAOs targeting the donor and acceptor splice sites of each variant were designed and tested, but they did not result in FV-short mRNA downregulation. Differently, siRNAs designed to specifically target the unique FV-short junction created by the alternative splicing event resulted in dose-dependent downregulation of FV-short mRNA expression.

Chapter 6 integrates all the findings of this thesis and discusses them in the light of current literature. Conclusions and future perspectives are given.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Hemostase is een nauwkeurig gereguleerd proces dat overmatig bloeden of stollen voorkomt. Genetische mutaties in hemostasegerelateerde genen kunnen dit delicate evenwicht echter verstoren, wat kan leiden tot een bloedingsstoornis of een trombose. Dit proefschrift richt zich op het bestuderen van specifieke genetische mutaties die verantwoordelijk zijn voor bloedingsstoornissen als potentiële target voor moleculair therapeutische benaderingen. In het bijzonder richt dit proefschrift zich op FV en FV-short en op VWF.

In **hoofdstuk 1** wordt een inleiding gegeven over de mechanismen van hemostase om bloedverlies te voorkomen in geval van vasculaire schade. Daarnaast beschrijft het de bloedingsstoornissen veroorzaakt door defecten in VWF en FV. In dit hoofdstuk wordt FV-short geïntroduceerd, een splicing-isovorm van FV, en de bloedingsstoornissen die geassocieerd zijn met overexpressie van FV-short.

In **hoofdstuk 2** wordt een patiënte met de ziekte van von Willebrand (VWD) beschreven die drager is van twee VWF genetische varianten: een nieuwe mutatie (R760S) en een veel voorkomend polymorfisme (R924Q). De R760S-mutatie werd *in vitro* uitgebreid gekarakteriseerd en onderzocht. Het *in silico*-model suggereerde dat de R760S-mutatie de splitsing van het propeptide van pre-pro-VWF zou kunnen verstoren en dit werd experimenteel aangetoond. Bovendien bleek de persistentie van het propeptide de binding van VWF-FVIII te verstoren. VWF-mRNA-analyse bij de patiënte bevestigde de aanwezigheid van de twee mutaties in cis en onthulde dat alleen het gemuteerde allel tot expressie kwam. Het 'wild type' allel bleek niet tot expressie te komen. De onderliggende oorzaak wordt nog onderzocht.

In **hoofdstuk 3** wordt een patiënt beschreven met FV-deficiëntie als gevolg van een nonsense mutatie in F5 exon 13. De proband is homozygoot voor deze nonsense mutatie en heeft een matige bloedingsneiging. Dit type mutatie kan reageren op behandeling met middelen die de natuurlijke readthrough versterken. Analyse van FV (mRNA en eiwit) resulteerde gunstig voor een readthrough-correctiebenadering, dus werden *in vitro* en *ex vivo* experimenten uitgevoerd om de expressie van FV te herstellen. COS-1-cellen werden getransfecteerd met F5-cDNA dat de nonsense-mutatie draagt en behandeld met 5 verschillende middelen waarvan in de literatuur werd aangetoond dat ze de readthrough versterken. *In vitro* bleken drie middelen in staat de expressie van functionele FV enigszins te herstellen. Een cytotoxiciteitstest uitgevoerd op drie verschillende cellijnen onthulde dat alle geteste middelen een zekere mate van cytotoxiciteit hebben, behalve ELX-02. In het *ex vivo* model werden stamcellen verkregen uit perifere bloed van de patiënt naar megakaryocyten gedifferentieerd en vervolgens

behandeld met dezelfde vijf middelen. Na de behandeling werd de FV expressie in de megakaryocyten van de patiënt hersteld. Bovendien waren megakaryocyten in staat om G418-gecorrigeerde mutante FV en DAP-gecorrigeerde mutante FV te internaliseren, een belangrijke bevinding voor de klinische toepassing van deze middelen.

In **hoofdstuk 4** wordt FV-short geïntroduceerd, de isovorm van FV die voortkomt uit alternatieve splicing van exon 13 van het *F5*-mRNA, resulterend in een in-frame deletie van 702 aminozuren van het B-domein. FV-short bindt stevig aan TFPI α , stabiliseert het in de circulatie en versterkt de antistollende activiteit ervan. Mutaties die de FV-short-expressie verhogen (FV-East Texas, FV-Amsterdam en FV-Atlanta) veroorzaken hogere niveaus van TFPI α , resulterend in bloedingsstoornissen. In dit hoofdstuk onderzoeken we de mogelijkheid om de expressie van FV-short te verminderen met behulp van morfolino antisense oligonucleotiden (MAO's). Als model werd een levercellijn (HepG2) gebruikt die van nature FV en FV-short tot expressie brengt. Genetische analyse van HepG2-cellen toonde een normaal aantal kopieën van het *F5*-gen aan; veelvoorkomende polymorfismen werden geïdentificeerd, maar geen van hen bevond zich op of dichtbij de FV-short-specifieke donor- en acceptor- splicing sites. Bovendien brengen HepG2-cellen meer FV tot expressie dan FV-short, net als primaire hepatocyten. Specifieke MAO's die de donor- of acceptor- splicing sites van FV-short kunnen afdekken werden ontworpen en getest op hun vermogen om FV-short splicing te downreguleren. Na 48 uur behandeling met toenemende doses MAO's (0-50 μ M) zorgden beide MAO's, alleen of in combinatie, voor verminderde expressie van FV-short mRNA. Omdat er nog geen test beschikbaar is om FV-short eiwit te meten, werd een qPCR ontworpen en zorgvuldig geoptimaliseerd om FV-short-mRNA te kwantificeren.

In **hoofdstuk 5** rapporteren we voorlopige resultaten over het gebruik van specifieke MAO's en siRNA's om FV-short expressie te verminderen in *in vitro* modellen van overexpressie van FV-short. COS-1-cellen werden tijdelijk getransfected met WT *F5*-cDNA of met *F5*-cDNA's die de FV-East Texas-, FV-Amsterdam- of FV-Atlanta-mutaties dragen. FV-short expressie in getransfectede cellen was vergelijkbaar met de FV-short expressie gevonden bij patiënten die de overeenkomstige mutatie dragen. Specifieke MAO's gericht op de donor- en acceptor- splicing sites van elke variant werden ontworpen en getest, maar ze resulteerden niet in vermindering van FV-short mRNA. Echter, siRNA's die zijn ontworpen om zich specifiek te richten op de unieke FV-short sequentie gecreëerd door de alternatieve splicing, resulteerden in dosisafhankelijke vermindering van FV-short mRNA-expressie.

In **hoofdstuk 6** worden alle bevindingen van dit proefschrift geïntegreerd en bespreekt deze in het licht van de huidige literatuur. Er worden conclusies en toekomstperspectieven gegeven.