

Coagulation factor V deficiency

Citation for published version (APA):

Nuzzo, F. (2016). *Coagulation factor V deficiency: from molecular diagnosis to molecular therapy*. Uitgeverij BOXPRESS. <https://doi.org/10.26481/dis.20160114fn>

Document status and date:

Published: 01/01/2016

DOI:

[10.26481/dis.20160114fn](https://doi.org/10.26481/dis.20160114fn)

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.

Summary

Nederlandse samenvatting

Summary

Coagulation factor V (FV) is a large liver-derived glycoprotein present in plasma and platelets. After proteolytic activation, it serves as an essential cofactor in the conversion of prothrombin to thrombin, accelerating this reaction by several orders of magnitude. This function makes FV indispensable to life. FV deficiency is a rare autosomal recessive bleeding disorder caused by loss-of-function mutations in the *F5* gene. The associated bleeding tendency is extremely variable and poorly correlated with plasma FV levels. Since FV concentrates or recombinant FV preparations are not available, treatment and prophylaxis of FV-deficient patients still relies on fresh frozen plasma, with potential complications such as volume overload, allergic reactions and transmission of infectious agents.

The work described in this thesis focusses on the molecular genetics of FV deficiency as a starting point for the development of personalized molecular therapies.

Chapter 1 provides a general overview of the hemostatic system and the coagulation cascade, with particular emphasis on the structure, functions and pivotal regulatory role of FV. Moreover, it introduces the genetic bases, clinical manifestations and unresolved issues of FV deficiency. Since the core of this thesis is dedicated to splicing mutations and their correction using antisense-based approaches, **Chapter 2** discusses the process of pre-mRNA splicing, the various mechanisms by which genetic mutations can alter normal splicing and the emerging strategies to correct aberrant splicing using antisense molecules.

Chapter 3 describes the development and validation of a multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for the efficient detection of large deletions and duplications in the *F5* gene. Application of this assay to 14 genetically unresolved FV-deficient patients led to the identification of a novel ~2-kb deletion spanning intron 8 through intron 10,

demonstrating the potential utility of this in-house assay in the molecular diagnosis of FV deficiency.

Chapters 4-6 share *F5* pre-mRNA splicing as a common theme. **Chapter 4** is a preliminary report of a novel *F5* splicing mutation affecting the canonical donor splice site of intron 3 (IVS3+2T>C*), identified in the homozygous state in a toddler with undetectable plasma FV levels and multiple intracranial hemorrhages. The mutation introduces a mismatch at the invariable +2 position of the donor splice site consensus sequence, most likely leading to exon 3 skipping. However, *F5* mRNA analysis could not be performed yet. **Chapter 5** presents the genetic and functional characterization of a patient with severe FV deficiency and moderate bleeding symptoms. This patient was found to be doubly heterozygous for a missense mutation in exon 4 (Cys165Ser) and an apparently synonymous variant in exon 8 (1371C>G). Analysis of the patient's cDNA, in combination with a detailed *in silico* analysis and splicing assays in a minigene model, indicated that the latter mutation actually disrupts *F5* pre-mRNA splicing, activating a cryptic splice site in exon 8 and causing the in-frame deletion of 18 nucleotides from the mature mRNA. Additional experiments in the minigene model showed that this aberrant splicing event could be corrected in a specific and dose-dependent manner by a morpholino antisense oligonucleotide designed to mask the incorrect splicing signal introduced by the 1371C>G mutation. **Chapter 6** extends the application of antisense technology to a *F5* deep-intronic mutation (IVS8+268A>G) identified in the homozygous state in a patient with severe FV deficiency and life-threatening bleeding manifestations. This mutation causes the activation of a cryptic donor splice site in intron 8, leading to the retention of an intronic pseudo-exon with an in-frame stop codon in the mature mRNA. A mutation-specific morpholino antisense oligonucleotide and an engineered U7 small nuclear RNA (U7snRNA) corrected this splicing defect in a specific and dose-

dependent manner, not only in a minigene model of the *F5* IVS8+268A>G mutation, but also in the patient's own megakaryocytes obtained by *ex vivo* differentiation of circulating hematopoietic progenitors, effectively restoring FV protein expression in these cells. Overall, these data provide proof-of-principle for the efficacy of antisense-based therapeutic approaches in severe FV deficiency.

Chapter 7 reports the case of two distantly related FV-deficient patients who, despite being homozygous for the same *F5* missense mutation (Trp582Gly) and having equally undetectable plasma FV levels, showed very different bleeding tendencies. Phenotyping of the patients' plasma revealed two-fold higher levels of the anticoagulant protein full-length tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in the severe bleeder (proband A) than in the moderate bleeder (proband B). Furthermore, thrombin generation experiments in the absence and presence of anti-TFPI antibodies suggested that the difference in plasma TFPI levels may indeed account for the difference in bleeding phenotypes. While the cause of the elevated TFPI level in proband A is still under investigation, these findings support a physiological role for plasma full-length TFPI as a modulator of the bleeding diathesis in severe FV deficiency, pointing at TFPI as an additional therapeutic target in these patients.

Finally, **Chapter 8** puts all findings into perspective, discusses them in the light of current literature and draws some general conclusions. In particular it proposes an optimized workflow for the molecular diagnosis of FV deficiency and it summarizes alternative (and personalized) therapeutic options based on the correction of splicing defects using antisense technology or on the pharmacological inhibition of TFPI.

**F5* nucleotides and FV amino acids in this summary are numbered according to the classical nomenclature, based on Jenny et al. 1987.

Nederlandse samenvatting

Stollingsfactor V (FV) is een groot glycoeiwit dat in de lever wordt aangemaakt en aanwezig is in plasma en bloedplaatjes. De geactiveerde vorm van FV dient als een essentiële cofactor bij de omzetting van protrombine in trombine, waarbij het de trombinevorming orden van grootte versterkt. Hierdoor is FV onmisbaar voor het leven. FV-deficiëntie is een zeldzame autosomaal recessieve aandoening veroorzaakt door mutaties in het *F5* gen. De hieruit volgende bloedingsneiging is variabel en correleert slecht met de FV spiegels in plasma. Omdat FV concentraten of recombinante FV producten niet beschikbaar zijn, zijn FV-deficiënte patiënten nog steeds afhankelijk van vers bevroren plasma voor hun behandeling en profylaxe, met potentiële complicaties zoals circulatoire overbelasting, allergische reacties en overdracht van infecties.

Het werk beschreven in dit proefschrift richt zich op de moleculaire genetica van FV deficiëntie als uitgangspunt voor de ontwikkeling van gepersonaliseerde behandeling door moleculaire therapieën.

Hoofdstuk 1 geeft een algemeen overzicht van het hemostasesysteem en de stollingscascade, met bijzondere nadruk op de structuur, functies en centrale regulerende rol van FV. Het introduceert de genetische basis, klinische symptomen en onopgeloste vragen van FV deficiëntie. Aangezien een groot deel van dit onderzoek gewijd is aan splicing afwijkingen en het corrigeren ervan d.m.v. antisense-therapie, beschrijft **hoofdstuk 2** het proces van pre-mRNA splicing, de verschillende mechanismen waarbij mutaties de normale splicing kunnen verstoren, en het gebruik van antisense moleculen om afwijkende splicing te corrigeren.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling en validatie van een methode, de zogenaamde multiplex ligatie-afhankelijke probe amplificatie (MLPA) test, voor het efficiënt opsporen van grote deleties en duplicaties in het *F5* gen. Deze assay werd toegepast op 14 genetisch

onopgeloste FV-deficiënte patiënten en leidde tot de ontdekking van een nieuwe grote deletie die exon 9 en 10 omvat. Deze bevinding bewijst de bruikbaarheid van onze in-huis ontwikkelde MLPA test in de moleculaire diagnostiek van FV deficiëntie.

Hoofdstukken 4-6 hebben als gemeenschappelijk onderwerp de pre-mRNA splicing van het *F5* gen. **Hoofdstuk 4** is een voorlopige beschrijving van een nieuwe homozygote *F5* splicing mutatie (IVS3 +2T>C*) in een peuter met een niet-detecteerbare plasma FV spiegel en meerdere intracranieële bloedingen. Deze mutatie introduceert een mismatch op de geconserveerde +2 positie van de donor splice site consensussequentie van intron 3, met exon 3 skipping als meest waarschijnlijk gevolg, alhoewel dit niet bewezen kon worden omdat de *F5* mRNA analyse nog niet kon worden uitgevoerd. **Hoofdstuk 5** behandelt de genetische en functionele karakterisering van een patiënt met een ernstige FV-deficiëntie en een matige bloedingsneiging. Deze patiënt bleek dubbel heterozygoot voor een missense mutatie in exon 4 (Cys165Ser) en een schijnbaar synonieme variant in exon 8 (1371C>G). Analyse van het cDNA van de patiënt, in combinatie met een gedetailleerde *in silico* analyse en splicing assays in een daartoe opgezet minigenmodel, gaf echter aan dat deze mutatie de *F5* pre-mRNA splicing verstoort door het activeren van een cryptische splice site in exon 8, resulterend in een in-frame deletie van 18 nucleotiden van het mRNA. Additionele experimenten in het minigenmodel toonden aan dat deze afwijkende splicing gecorrigeerd kon worden door de toepassing van een specifieke morfolino antisense oligonucleotide die ontworpen was om de onjuiste splicingsequentie bij de 1371C>G mutatie te verbergen. **Hoofdstuk 6** breidt de toepassing van antisense-technologie uit tot een *F5* “diep-intronische” mutatie (IVS8+268A>G) opgespoord in een homozygote patiënt met een ernstige FV deficiëntie en levensbedreigende bloedingen. Deze mutatie veroorzaakt de activering van een cryptische donor splice site in intron 8 die ervoor zorgt dat een

intronische pseudo-exon met een in-frame stopcodon in het mRNA blijft zitten. Een mutatie-specifieke morfolino antisense oligonucleotide en een gemutageniseerde U7 small nuclear RNA (U7snRNA) corrigeerden dit splicing defect op een specifieke en dosis-afhankelijke wijze, niet alleen in een *in vitro* minigenmodel van de *F5* IVS8+268A>G mutatie, maar ook in lichaamseigen megakaryocyten van de patiënt verkregen door *ex vivo* differentiatie van circulerende hematopoietische stamcellen, leidend tot een effectief herstel van de FV eiwit expressie. Deze resultaten onderbouwen de effectiviteit van antisense-gebaseerde therapeutische benaderingen bij ernstige FV deficiënties.

In **hoofdstuk 7** worden twee gerelateerde FV-deficiënte patiënten gerapporteerd, die allebei homozygoot zijn voor de zelfde *F5* missense mutatie (Trp582Gly) met bijbehorende ondetecteerbare plasma FV spiegels, en toch zeer verschillende bloedingsneigingen vertoonen. Fenotypering van het plasma van deze patiënten wees uit dat de ernstige bloeder (proband A) een tweemaal hogere concentratie van het antistollende eiwit full-length tissue factor pathway inhibitor (TFPI) in zijn plasma had dan de matige bloeder (proband B). Bovendien suggereerden trombinegeneratie experimenten in afwezigheid en aanwezigheid van anti-TFPI antilichamen dat het verschil in TFPI plasma concentraties het verschil in bloedingsfenotype kon verklaren. Hoewel de oorzaak van het verhoogde TFPI niveau in proband A nog onduidelijk is, ondersteunen deze bevindingen een fysiologische rol voor full-length TFPI bij het moduleren van bloedingsneigingen bij ernstige FV deficiëntie, waarbij TFPI als mogelijk doel voor behandeling aangewezen kan worden.

In **hoofdstuk 8** worden alle bevindingen in perspectief gezet en besproken in het licht van de huidige literatuur, resulterend in enkele algemene conclusies en aanbevelingen. Als aanbeveling wordt een geoptimaliseerde workflow voor de moleculaire diagnostiek van FV-deficiëntie voorgesteld. Ten slotte geeft het hoofdstuk een overzicht van alternatieve (en

persoonlijke) therapeutische behandelingen op basis van de correctie van splicingdefecten met behulp van antisense-technologie of op basis van farmacologische remming van TFPI.

*F5 nucleotiden en FV aminozuren in deze samenvatting zijn genummerd volgens de klassieke nomenclatuur gebaseerd op Jenny et al. 1987.