

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20418> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Wang, Jiong-Wei

**Title:** Weibel-Palade body formation and exocytosis in von Willebrand disease

**Issue Date:** 2013-01-17

## Samenvatting

De vorming van de endotheel specifieke Weibel-Palade bodies (WPB) wordt gestuurd door de von Willebrand factor (VWF) [1]. WPB zijn organellen die dienen als een intracellulaire opslag van vele bioactieve moleculen waaronder P-selectine en tissue plasminogeen activator (t-PA) en het stollingseiwit VWF [2]. Mutaties in VWF zouden de vorming en exocytose van WPB kunnen verstoren en leiden tot de meest frequent voorkomende erfelijke bloedingsneiging bij mensen, de ziekte van von Willebrand (VWD) [3].

Hoewel de vorming en het biologische belang van WPB in het verleden uitgebreid is bestudeerd, blijft de pathofysiologie van VWD nog slecht begrepen. De pathogene effecten van VWF mutaties zijn in detail bestudeerd, maar die studies hebben zich beperkt tot de analyse van constitutieve VWF secretie en multimerisatie. Dat kwam vooral door het ontbreken van geschikte celsystemen om de effecten van VWF mutaties op WPB vorming en exocytose te bestuderen. In **Hoofdstuk 2** hebben we de rol van VWF in de vorming van WPB gereviewd en hebben we de studies naar VWF mutaties in de context van VWD bediscussieerd. Defecten in VWF secretie leiden tot een kwantitatief tekort aan VWF en dragen bij aan de bloedingsneiging bij VWD [4]. De pathofysiologie van VWF mutaties is uitgebreid bestudeerd in diverse heterologe cellijnen, zoals COS cellen, waarin VWF niet wordt opgeslagen. VWF wordt *in vivo* vooral opgeslagen in WPB en uitgescheiden door vasculair endotheel en daardoor kunnen cellijnen zoals COS cellen niet alle aspecten van de VWF biologie weergeven. Navelstrengendotheelcellen (Human umbilical vein endothelial cells - HUVECs) zijn in principe geschikter en zijn verkregen voor onderzoek naar VWD [5-9], maar HUVECs met specifieke VWF mutaties zijn maar zeer beperkt beschikbaar. Er is echter steeds meer bewijs dat HEK293 cellen, waarin VWF wordt opgeslagen in WPB-achtige organellen [10], en 'blood outgrowth endothelial cells' (BOECs) geïsoleerd uit perifere bloed van patiënten een beter onderzoeksmodel vormen voor dergelijk onderzoek (**Hoofdstukken 3 en 6**).

In **Hoofdstuk 3** hebben we de morfologie en functie van pseudo-WPB bestudeerd die gevormd worden in HEK293 cellen na expressie van VWF. Die pseudo-WPB lijken in veel aspecten op WPB in endotheel. Door transiente expressie in HEK293 cellen van VWF mutaties die geassocieerd zijn met kwantitatieve VWF defecten hebben we kunnen aantonen, dat vier missense mutaties in het D3 en CK-domein van VWF de opslag in pseudo-WPB verminderden en dat dit gepaard ging met retentie van VWF in het endoplasmatische reticulum (ER). De VWF variant

p.Cys1060Tyr vormde iets minder pseudo-WPB dan WT-VWF, terwijl p.Cys1149Arg, p.Cys2739Tyr en p.Cys2754Trp nog slechts enkele en abnormale pseudo-WPB vormden. Als gevolg daarvan gaven die drie mutaties aanleiding tot ernstig verstoorde, gereguleerde secretie van VWF. Deze resultaten bevestigden de mogelijkheid om HEK293 cellen te gebruiken voor het bestuderen van de pathogeniciteit van VWF mutaties met betrekking tot de intracellulaire opslag en gereguleerde secretie. Ook werd de sleutelrol van het VWF D3 domein in de vorming van WPB bevestigd [11,12]. Tevens suggereert deze studie dat ook mutaties in het CK domein en niet alleen in het D'D3 domein invloed hebben op de biogenese van WPB.

Sommige type 1 VWD patiënten hebben een verminderde respons op behandeling met DDAVP [13]. De meeste VWF mutaties bij deze patiënten blijken gelokaliseerd te zijn in de A1-A3 domeinen. Aangezien de stijging in plasma VWF door DDAVP berust op exocytose van WPB [14], zou de vorming van WPB in die patiënten verstoord kunnen zijn door VWF mutaties. Deze hypothese werd getoetst door de effecten van kwantitatieve VWF mutaties in de A domeinen op de intracellulaire opslag en gereguleerde secretie van VWF te bestuderen (**Hoofdstuk 4**). We toonden aan dat vijf van de zes mutaties inderdaad de vorming van pseudo-WPB verstoorde en dat met name de VWF mutaties p.Leu1307Pro en p.Val1822Gly de gereguleerde secretie verminderden, zowel in homozygote als heterozygote vorm. Beide mutaties p.Leu1307Pro en p.Val1822Gly werden geïdentificeerd in patiënten met een verminderde respons op DDAVP, wijzend op hun schadelijke effect *in vivo* op de biogenese van WPB. De afname van gereguleerde secretie van VWF door p.Ser1285Pro voorspelt een slechte respons op DDAVP in de patiënten met die mutatie maar daarvan zijn geen data beschikbaar. Verder toonden p.Arg1374His, p.Arg1583Trp en p.Tyr1584Cys een normale secretie van VWF ondanks dat p.Arg1374His en p.Tyr1584Cys wel de morfologie van pseudo-WPB verstoorde. De pathogene rol van p.Arg1374His is niet conclusief in deze studie. De effecten van de mutaties p.Ser1285Pro, p.Leu1307Pro en p.Tyr1584Cys op WPB formatie en gereguleerde secretie zoals waargenomen in de transfectie experimenten werden bevestigd in endotheel cellen (BOECs) geïsoleerd uit bloed van de desbetreffende patiënten (**Hoofdstuk 6**).

Mutaties van cysteines in VWF zijn regelmatig gevonden in patiënten met VWD (mutatie database [www.vwf.group.shef.ac.uk/](http://www.vwf.group.shef.ac.uk/)). De meeste van die cysteinemutaties zijn gevonden in type 1 of type 3 VWD, en slechts in vijf gevallen werden ze gevonden in type 2 VWD. Opvallend genoeg blijken alle vijf die mutaties

te leiden tot het verdwijnen van één van de drie specifieke cysteïnes - p.Cys1099, p.Cys2771 en p.Cys2773 - die betrokken zijn bij de interchain disulfidebruggen van VWF [15,16]. Alle overige cysteïnemutaties verstoren waarschijnlijk intrachain disulfidebruggen van VWF [15,16] en zijn geassocieerd met verlaagde plasma VWF concentraties (**Hoofdstuk 5**). Op grond van de duidelijk onderscheidende effecten van deze twee types cysteïnemutaties hebben we de hypothese opgesteld, dat verstoorde intrachain of interchain disulfidebrugvorming in VWF verschillende effecten heeft op de WPB vorming. In **Hoofdstuk 5** hebben we de vorming van pseudo-WPB na expressie van VWF varianten met verstoorde intrachain (p.Cys1130Phe en p.Cys2671Tyr) of interchain (p.Cys2773Ser) disulfidebrugvorming bestudeerd. Mutaties van cysteïnes die betrokken zijn bij de vorming van interchain disulfidebruggen hebben geen invloed op de opslag in WPB noch op de secretie van VWF. Echter mutaties van cysteïnes die intrachain disulfidebruggen vormen leiden tot gereduceerde VWF opslag en secretie ten gevolge van ER retentie.

Hoewel HEK293 cellen een veelbelovend model zijn voor het bestuderen van de structuur-functierelatie van VWF zijn er nog wel enkele beperkingen. Door overexpressie van het VWF eiwit en door problemen met het imiteren van werkelijke heterozygotie kunnen sommige vragen moeilijk beantwoord worden met dit systeem. Een meer ideaal modelsysteem zou gebaseerd zijn op endotheelcellen afkomstig van de patiënten zelf. Aangezien de beschikbaarheid van HUVECs van VWD patiënten zeer beperkt is, hebben we de geschiktheid van BOECs - endotheelcellen geïsoleerd uit het perifere bloed van de patiënten zelf - voor het bestuderen van de pathogeniciteit van specifieke VWF mutaties onderzocht (**Hoofdstuk 6**). We hebben vastgesteld dat het inderdaad mogelijk is om BOECs te verkrijgen van meerdere VWD patiënten en dat het fenotype van de patiënt door dit model nauwkeurig wordt weergegeven. We hebben aangetoond dat BOECs een goed model vormen voor het bestuderen van de VWF string formatie en voor het testen van de respons van endotheelcellen op diverse stimuli. Een opvallende bevinding was dat BOECs niet reageren op DDAVP stimulatie. Een belangrijke beperking van dit modelsysteem is de variatie tussen verschillende klonen en celpassages waardoor het moeilijk is om goed de basale secretie te bepalen. Bovendien is het onderzoek afhankelijk van de beschikbaarheid van patiënten met specifieke VWF mutaties en de zygotie van de mutaties. Wat deze aspecten betreft zijn HEK293 cellen veel flexibeler.

Zoals in **Hoofdstukken 2-5** werd aangetoond zijn HEK293 cellen geschikt voor het

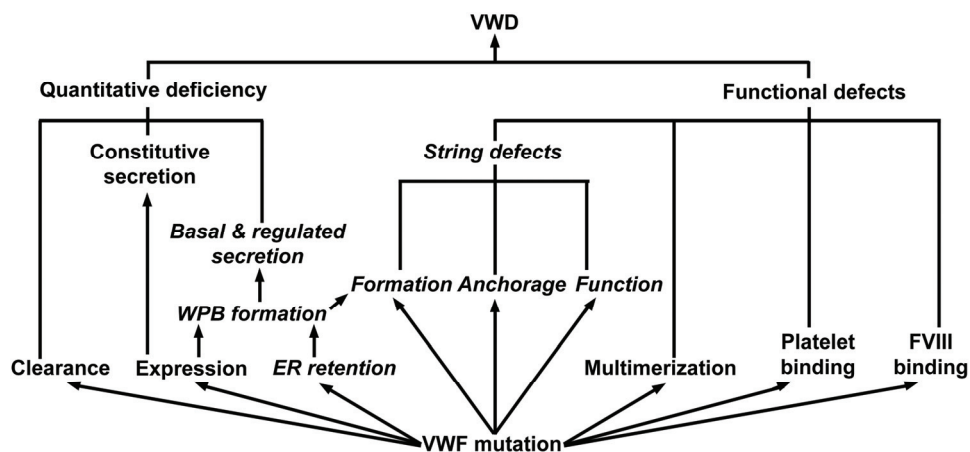
bestuderen van intracellulaire opslag in pseudo-WPB en de geregleerde secretie van VWF. In **Hoofdstuk 7** hebben we onderzocht of we ook VWF string formatie met dit model kunnen onderzoeken. Alle studies tot dusver hadden gesuggereerd dat VWF strings specifiek zijn voor endotheelcellen, maar wij hebben nu voor het eerst aangetoond dat VWF strings ook gevormd kunnen worden op HEK293 cellen. Net als endotheliale VWF strings binden de strings op HEK293 cellen ook trombocyten tijdens stroming. Met dit systeem hebben we aangetoond dat P-selectine noch alphaVbeta3 integrine noodzakelijk zijn voor VWF string formatie. Ook bleken structurele veranderingen in VWF van invloed op de VWF string formatie.

VWF strings zijn samengesteld uit zeer lange (ultra-large) VWF multimeren en worden gevormd op geactiveerde endotheelcellen na exocytose van WPB. De VWF strings vangen trombocyten en bevorderen daarmee de stolselvorming en het weefselherstel [17]. Wanneer de VWF string formatie volledig of gedeeltelijk verloren gaat, dan zou dat kunnen bijdragen aan de bloedingsneiging bij VWD. In **Hoofdstuk 8** hebben we de effecten bestudeerd van de VWF mutatie p.Arg1205His in twee VWD type Vicenza patiënten: een vrouwelijke patiënt heterozygoot voor p.Arg1205His met een zeer mild fenotype en een mannelijke patiënt 'compound' heterozygoot voor p.Arg1205His en p.Arg924Gln met een ernstig fenotype. In zowel HEK293 cellen als in BOECs hebben we aangetoond dat p.Arg1205His de VWF productie en secretie vermindert, terwijl p.Arg924Gln de VWF string formatie verstoort. Deze resultaten lieten zien dat de lage plasma spiegels van VWF bij p.Arg1205His niet alleen het gevolg zijn van versnelde klaring maar ook van lage intracellulaire productie van VWF. De verstoring van de VWF string formatie door p.Arg924Gln draagt mogelijk bij aan het ernstigere fenotype van de patiënt die 'compound' heterozygoot is voor p.Arg1205His en p.Arg924Gln. Waardoor de string formatie verminderd is bij de mutatie p.Arg924Gln moet nog verder onderzocht worden. Hoewel p.Arg924Gln de geregleerde secretie iets verminderde, was er geen duidelijk effect op de pseudo-WPB formatie en daarom postuleren we dat deze mutatie de string formatie beïnvloedt via de verankering van de strings op het celoppervlak.

## Conclusies en perspectieven

De studies die in dit proefschrift beschreven zijn, richten zich op de pathogene mechanismen - in het bijzonder intracellulaire opslag in WPB en geregleerde secretie - die ten grondslag liggen aan VWD met een voornamelijk kwantitatief

VWF defect. Deze onderzoeken hebben ons begrip van VWD op moleculair en cellulair niveau vergroot. HEK293 cellen en BOECs bleken twee waardevolle modelsystemen voor het onderzoek naar de structuur-functie van VWF. Met deze celsystemen hebben we aangetoond dat VWF mutaties de opslag en secretie van VWF kunnen belemmeren en daardoor kunnen leiden tot VWF deficiëntie bij patiënten (Figuur 1). Een dergelijk mechanisme is ook door andere groepen gevonden [10,18,19]. Verder hebben we aangetoond dat verandering in de VWF structuur door mutaties die van nature voorkomen bij VWD patiënten de VWF string formatie en functie kunnen moduleren. Bij normale shear stress (10–70 dynes/cm<sup>2</sup> in arteriën en 1–6 dynes/cm<sup>2</sup> in venen [20]) bindt oplosbaar VWF in plasma zelden plaatjes, maar VWF strings gevormd op geactiveerd endotheeloppervlak zijn in staat om spontaan plaatjes te vangen uit stromend bloed en daarmee de stolselvorming te initiëren ter plaatse van vaatschade. Dus veranderingen in VWF string formatie en functie kunnen bijdragen aan de bloedingsneiging bij VWD. De belangrijkste bron van plasma VWF is waarschijnlijk het VWF dat via basale



**Figuur 1. Pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan VWD.**

VWF mutaties leiden tot kwantitatieve of functionele defecten in VWF via complexe mechanismen en vervolgens tot VWD. Dit proefschrift heeft enkele nieuwe mechanismen (aangegeven in *italics*) opgeleverd die ten grondslag liggen aan deze bloedingsneiging: defecten in WPB formatie en exocytose, en defecten in VWF strings (formatie, verankering en functie). De 'constitutieve secretie' route verwijst naar VWF secretie direct vanuit het ER; de 'basale secretie' route verwijst naar secretie van VWF vanuit de WPB bij afwezigheid van stimulatie; de 'gereguleerde secretie' route verwijst naar secretie van VWF vanuit WPB onder invloed van bepaalde stimuli. VWF, von Willebrand factor; VWD, ziekte van von Willebrand; en WPB, Weibel-Palade body.

secretie wordt uitgescheiden vanuit endotheliale WPB [21,22]. VWF strings die gevormd worden na (geïnduceerde) exocytose van WPB hechten aan het endotheliale oppervlak en rekruteren trombocyten en mediëren zo de plaatjes adhesie en aggregatie. Defecten in elk van deze processen kunnen bijdragen aan het fenotype van VWD. Daarom stellen we voor dat toekomstig onderzoek naar de pathofysiologie van VWD aan de volgende randvoorwaarden voldoet: 1) de effecten van VWF mutaties zouden geanalyseerd moeten worden in celsystemen waarin VWF, net als *in vivo*, wordt opgeslagen in (pseudo)-WPB zoals HEK293 cellen en BOECs afkomstig van patiënten; 2) naast multimerenanalyse, zou de formatie en exocytose van WPB evenals de vorming en functie van VWF strings moeten worden onderzocht om de pathogene effecten van VWF mutaties volledig te karakteriseren; 3) aangezien WPB ook dienen als intracellulaire pool van diverse inflammatoire

mediatoren, zoals P-selectine en angiopoietine-2, en aangezien VWF zelf mogelijk ook een rol speelt in de regulatie van angiogenese [23], zouden veranderingen in inflammatie en vasculaire remodeling bij VWD patiënten ook bestudeerd kunnen worden. Inclusie van deze drie aspecten in de analyse van VWF mutaties zal leiden tot een beter begrip van de complexe mechanismen die aan het fenotype van VWD patiënten ten grondslag liggen en zal de patiënten tot voordeel strekken.

## Referenties

1. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; **6**:217-246.
2. Metcalf DJ, Nightingale TD, Zenner HL, Lui-Roberts WW, Cutler DF. Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci* 2008; **121**:19-27.
3. Wang JW, Eikenboom J. Von Willebrand disease and Weibel-Palade bodies. *Hamostaseologie* 2010; **30**:150-155.
4. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**:395-424.
5. Booyse FM, Quarfoot AJ, Chediak J, Stemerman MB, Maciag T. Characterization and properties of cultured human von Willebrand umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1981; **58**:788-796.
6. Levene RB, Booyse FM, Chediak J, Zimmerman TS, Livingston DM, Lynch DC. Expression of abnormal von Willebrand factor by endothelial cells from a patient with type IIA von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**:6550-6554.
7. Federici AB, de Groot PG, Moia M, Ijsseldijk MJ, Sixma JJ, Mannucci PM. Type I von Willebrand disease, subtype 'platelet low': decreased platelet adhesion can be explained by low synthesis of von Willebrand factor in endothelial cells. *Br J Haematol* 1993; **83**:88-93.
8. de Groot PG, Federici AB, de Boer HC, d'Alessio P, Mannucci PM, Sixma JJ. von Willebrand factor synthesized by endothelial cells from a patient with type IIB von Willebrand disease supports platelet adhesion normally but has an increased affinity for platelets. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A* 1989; **86**:3793-3797.
9. Ewenstein BM, Warhol MJ, Handin RI, Pober JS. Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel-Palade body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* 1987; **104**:1423-1433.
  10. Michaux G, Hewlett LJ, Messenger SL, Goodeve AC, Peake IR, Daly ME, Cutler DF. Analysis of intracellular storage and regulated secretion of 3 von Willebrand disease-causing variants of von Willebrand factor. *Blood* 2003; **102**:2452-2458.
  11. Michaux G, Abbitt KB, Collinson LM, Haberichter SL, Norman KE, Cutler DF. The physiological function of von Willebrand's factor depends on its tubular storage in endothelial Weibel-Palade bodies. *Dev Cell* 2006; **10**:223-232.
  12. Huang RH, Wang Y, Roth R, Yu X, Purvis AR, Heuser JE, Egelman EH, Sadler JE. Assembly of Weibel-Palade body-like tubules from N-terminal domains of von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**:482-487.
  13. Castaman G, Lethagen S, Federici AB, Tosetto A, Goodeve A, Budde U, Battle J, Meyer D, Mazurier C, Fressinaud E, Goudemand J, Eikenboom J, Schneppenheim R, Ingerslev J, Vorlova Z, Habart D, Holmberg L, Pasi J, Hill F, Peake I, Rodeghiero F. Response to desmopressin is influenced by the genotype and phenotype in type 1 von Willebrand disease (VWD): results from the European Study MCMDM-1VWD. *Blood* 2008; **111**:3531-3539.
  14. Kaufmann JE, Vischer UM. Cellular mechanisms of the hemostatic effects of desmopressin (DDAVP). *J Thromb Haemost* 2003; **1**:682-689.
  15. Katsumi A, Tuley EA, Bodo I, Sadler JE. Localization of disulfide bonds in the cystine knot domain of human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 2000; **275**:25585-25594.
  16. Purvis AR, Gross J, Dang LT, Huang RH, Kapadia M, Townsend RR, Sadler JE. Two Cys residues essential for von Willebrand factor multimer assembly in the Golgi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**:15647-15652.
  17. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, Bernardo A, Arceneaux W, Shrimpton CN, Schade AJ, McIntire LV, Fujikawa K, Lopez JA. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 2002; **100**:4033-4039.
  18. Castaman G, Giacomelli SH, Jacobi P, Obser T, Budde U, Rodeghiero F, Haberichter SL, Schneppenheim R. Homozygous type 2N R854W von Willebrand factor is poorly secreted and causes a severe von Willebrand disease phenotype. *J Thromb Haemost* 2010; **8**:2011-2016.
  19. Castaman G, Giacomelli SH, Jacobi PM, Obser T, Budde U, Rodeghiero F, Schneppenheim R, Haberichter SL. Reduced von willebrand factor secretion is associated with loss of weibel-palade body formation. *J Thromb Haemost* 2012; **10**:951-958.
  20. Papaioannou TG, Stefanadis C. Vascular wall shear stress: basic principles and methods. *Hellenic J Cardiol* 2005; **46**:9-15.
  21. Giblin JP, Hewlett LJ, Hannah MJ. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* 2008; **112**:957-964.
  22. Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, Voorberg J, Eikenboom J. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood* 2011; **117**:5033-5043.
  23. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, Dryden NH, McKinnon TA, Sutton RE, Payne EM, Haskard DO, Hughes AD, Cutler DF, Laffan MA, Randi AM. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* 2011; **117**:1071-1080.