Universiteit Leiden
The Netherlands

Weibel-Palade body formation and exocytosis in von Willebrand disease

Wang, J.W.

Citation
Wang, J. W. (2013, January 17). *Weibel-Palade body formation and exocytosis in von Willebrand disease*. Retrieved from https://hdl.handle.net/1887/20418

Version:	Corrected 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/1887/20418

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

Cover Page

Universiteit Leiden

Leiden University Repository

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

总结

Weibel-Palade 小体是血管内皮细胞特有的一种分泌性杆状细胞器，其形成依赖于一种高分子糖蛋白，即血管性血友病因子（von Willebrand factor, VWF 因子）。VWF 因子由巨核细胞和血管内皮细胞合成，主要分布于血浆、血小板和内皮细胞中 [1]。在血管内皮细胞中，VWF 因子储存在 Weibel-Palade 小体中，并为该细胞器的主要成分。此外，Weibel-Palade 小体中还储存有 P-选择素、组织型纤溶酶原激活剂（t-PA）等多种生物活性因子[2]。VWF 因子的基因突变可导致该因子功能缺陷或血浆浓度降低，从而引起一种人类最常见的遗传性出血性疾病 - 血管性血友病（von Willebrand disease，VWD）[3]。血管性血友病分三种类型：I 型特点为血浆中的 VWF 因子低于正常浓度的 50%；II 型表现为血浆中的 VWF 因子功能异常，其又可以细分为 A、B、M 和 N 四种亚型；III 型病人的血浆中 VWF 因子浓度极低或缺乏，出血症状比 I 型和 II 型更为严重。本课题主要研究了 VWF 因子的基因突变对 Weibel-Palade 小体的形成和胞吐所造成的的影响，从分子和细胞生物学角度对血管性血友病的发病机制进行了探索。同时，本课题还建立了研究血管性血友病发病机制的细胞模型。

尽管学界对于 Weibel-Palade 小体的形成和生理作用已经进行过较深入的探索，但对其在引起血管性血友病中的病理生理作用并不清楚。虽然对于 VWF 因子基因突变的病理作用已经有很细致的研究，但是由于缺乏适合研究 Weibel-Palade 小体形成和胞吐的细胞模型，使得以往的研究大多局限于分析基因突变对 VWF 因子的持续性分泌（constitutive secretion）和多聚体形成的影响。在本论文**第二章**，我们综述了 VWF 因子在 Weibel-Palade 小体形成中的作用以及血管性血友病病理机制的研究进展。VWF 因子分泌异常可以导致血浆中 VWF 因子量的缺失，从而诱发出血性倾向即血管性血友病[4]。VWF 因子基因突变的病理作用已经在 COS 等一些细胞系中进行过广泛而深入的研究。但是，由于这些细胞系不能储存 VWF 因子，导致无法用于研究基因突变对 VWF 因子的细胞内储存以及调节性分泌（regulated

secretion）等方面的影响。相比之下，从血管性血友病病人体内分离的人脐静脉内皮细胞更适合用于这方面的研究[5-9]。但缺点主要为具有特定 VWF 因子基因突变的人脐静脉内皮细胞很难获得，导致这类细胞很难大范围应用。近些年的研究表明，人胚胎肾细胞系（HEK293）和从病人外周血中分离的内皮细胞（BOECs）非常适合用于研究 VWF 因子基因突变所诱发的血管性血友病的病理机制[10]（见**第三章**和**第六章**）。

在**第三章**，我们研究了 VWF 因子基因突变对 Weibel-Palade 小体的形成和功能的影响。经转染表达 VWF 因子后，HEK293 细胞能够形成类 Weibel-Palade 小体（pseudo WPB，为便于理解，此章中统称 Weibel-Palade 小体）。在 HEK293 细胞中形成的 Weibel-Palade 小体在形态和功能方面与血管内皮细胞中的 Weibel-Palade 小体极为相似。通过在 HEK293 细胞中表达四种 VWF 因子基因突变体（2 个基因突变在 VWF 因子 D3 功能区，2 个基因突变在 VWF 因子 CK 功能区），我们发现这些降低 VWF 因子血浆浓度的基因突变减少了 Weibel-Palade 小体的数量并导致 VWF 因子储留在内质网中。VWF 因子突变体 p.Cys1060Tyr 轻度减少了 Weibel-Palade 小体的数量，而 VWF 因子突变体 p.Cys1149Arg，p.Cys2739Tyr 和 p.Cys2754Trp 只形成很少量且形态异常的 Weibel-Palade 小体，从而严重减弱了 VWF 因子的调节性分泌。这些实验结果表明 HEK293 细胞系可用于研究 VWF 因子基因突变对该因子的细胞内储存和调节性分泌的影响，同时也证实了 VWF 因子 D3 功能区在 Weibel-Palade 小体形成过程中所起的重要作用[11,12]。此外，该项研究还表明，除 D'D3 功能区外，VWF 因子的 CK 功能区也会影响 Weibel-Palade 小体的生成。

研究发现，一些 I 型血管性血友病人对 DDAVP 的反应很弱[13]。有趣的是，这些病人的基因突变大多数发生在 VWF 因子 A1 - A3 功能区。鉴于学界普遍认为 DDAVP 引起的血浆 VWF 因子浓度的升高是由于 Weibel-Palade 小体发生了胞吐[14]，我们推测这些病人的基因突变导致了 Weibel-Palade 小体生成异常。为证实该

假设，我们在**第四章**中分析了 A 功能区的六个基因突变对 VWF 因子的胞内储存和调节性分泌的影响。除 p.Arg1583Trp 之外，另外五个基因突变导致 Weibel-Palade 小体形成异常。p.Leu1307Pro 和 p.Val1822Gly 两个基因突变在纯合子或杂合子状况下均减弱了 VWF 因子的调节性分泌，表明了这两个基因突变在体内也可能阻碍 Weibel-Palade 小体的形成。p.Ser1285Pro 也减弱了 VWF 因子的调节性分泌，预示着具有该基因突变的病人可能对 DDAVP 的反应较弱，但目前尚缺乏体内实验证据。虽然具有基因突变 p.Arg1374His，p.Arg1583Trp 或 p.Tyr1584Cys 的 VWF 因子分泌正常，但是 p.Arg1374His 和 p.Tyr1584Cys 形成的 Weibel-Palade 小体具有形态方面的缺陷，故无法证实 p.Arg1374His 的病理作用。HEK293 细胞系中揭示的 p.Ser1285Pro、p.Leu1307Pro 和 p.Tyr1584Cys 基因突变对 Weibel-Palade 小体和 VWF 因子调节性分泌的影响在血管性血友病人的内皮细胞（BOECs）中得到了证实（**第六章**）。

VWF 因子半胱氨酸突变体在血管性血友病人中很常见（血管性血友病数据库 www.vwf.group.shef.ac.uk/）。尽管大部分半胱氨酸基因突变都发生在 I 型和 III 型病人中，但是有五个半胱氨酸基因突变发生在 II 型病人中。而且所有这五个基因突变的位点都发生在三个用于形成 VWF 因子分子间二硫键的半胱氨酸位置上：p.Cys1099、p.Cys2771 和 p.Cys2773[15,16]。除这五个基因突变外，其余半胱氨酸突变可能只影响 VWF 因子分子内二硫键的形成[15,16]，而且都和病人体内降低的 VWF 因子血浆浓度有关（**第五章**）。鉴于这两类半胱氨酸对 VWF 因子血浆浓度具有不同影响，我们推测 VWF 因子分子内和分子间二硫键形成缺陷会对 Weibel-Palade 小体的形成造成不同影响。通过分析破坏 VWF 因子分子内二硫键（p.Cys1130Phe 和 p.Cys2671Tyr）或分子间二硫键（p.Cys2773Ser）的形成对 Weibel-Palade 小体形成的影响，我们在**第五章**中得出结论：破坏 VWF 因子分子间二硫键的半胱氨酸突变不影响 VWF 因子在 Weibel-Palade 小体中的储存和分泌，而破坏分子内二硫键的半胱氨酸突变会降低 VWF 因子的储存和分泌，并使 VWF 因子

储留在内质网中。

尽管 HEK293 细胞系很适合用于研究 VWF 因子结构和功能之间的关系，该细胞模型仍具有一定的缺陷。譬如在该细胞模型中 VWF 因子会过度表达，从而很难精确模拟病人体内的杂合子基因突变。因此，从病人体内分离的内皮细胞将是更加理想的细胞模型。由于很难获得病人的脐静脉内皮细胞，我们在**第六章**中探索了利用分离的病人外周血内皮祖细胞（BOECs）研究特定基因突变的病理机制的可行性。我们发现从大量病人中分离外周血内皮祖细胞具有可操作性，并且此类细胞能够反映病人的特定症状。此外，我们发现外周血内皮祖细胞还适合用于研究 VWF 因子线状结构（VWF string）的形成以及检测病人内皮细胞对不同刺激的反应。有趣的是，我们发现这种内皮细胞对 DDAVP 的刺激没有反应，表明外周血内皮祖细胞的应用也具有局限性。其主要局限性在于较难精确定量研究 VWF 因子的基础型分泌（basal secretion），而且该研究局限于能够招募到的病人以及在这些病人中基因突变的合子状况。从这个角度来说，HEK293 细胞系具有更大的灵活性，几乎可以研究所有的基因突变。

在**第七章**，我们探索了 HEK293 细胞是否能用于研究 VWF 因子线状结构的形成。尽管国际上的研究都表明 VWF 因子线状结构只在血管内皮细胞上形成，我们却首次证实该结构也能在非内皮细胞上形成。在 HEK293 细胞上形成的 VWF 因子线状结构也能像在血管内皮细胞上形成的线状结构一样粘附血小板。利用这种新的研究模型，我们证实 VWF 因子线状结构的形成既不需要 P 选择素也不需要内皮细胞 alphaVbeta3 整合素，而且 VWF 因子结构的变化可以影响 VWF 因子线状结构的形成。

VWF 因子线状结构是由 VWF 因子的高聚体组成。Weibel-Palade 小体发生胞吐后，VWF 因子线状结构出现在活化的内皮细胞表面。VWF 因子线状结构能够聚集血小板从而促进血栓形成和组织修复[17]。VWF 因子线状结构的缺失可能导致血管性血友病。因此，在论文**第八章**，我们从 VWF 因子线状结构的角度研究了 VWF

因子基因突变 p.Arg1205His 的病理机制。两名 Vicenza 型血管性血友病人被用于本研究：一名女性病人具有杂合状态的基因突变 p.Arg1205His，只有非常轻微的出血症状；一名男性病人具有两个基因突变，p.Arg1205His 和 p.Arg924Gln，分布位于两个等位基因上，有较严重的出血倾向。我们发现 p.Arg1205His 减弱了 VWF 因子的合成与分泌，而 p.Arg924Gln 减弱了 VWF 因子线状结构的形成。这一发现在外周血内皮祖细胞和 HEK293 细胞中均得到证实。这一结果表明 p.Arg1205His 降低 VWF 因子血浆浓度不仅是由于该突变加快了 VWF 因子降解速度，还与细胞内该蛋白的合成缺陷有关。具有 p.Arg924Gln 和 p.Arg1205His 双突变的病人表现出更严重的出血倾向可能是由于 p.Arg924Gln 对 VWF 因子线状结构形成的影响。p.Arg924Gln 减弱 VWF 因子线状结构形成的机制尚需进一步研究。由于 p.Arg924Gln 虽然轻微减弱了 VWF 因子的调节性分泌，但并没有影响 Weibel-Palade 小体的形成，我们推测该基因突变可能减弱 VWF 因子线状结构在细胞表面的滞留，从而造成 VWF 因子线状结构形成的缺陷。

结论和展望

本课题着重从 Weibel-Palade 小体的形成和 VWF 因子调节性分泌的角度探索了 VWF 因子量的缺失所引起的血管性血友病的病理机制，促进了我们对血管性血友病分子及细胞水平的病理机制的理解。该研究表明 HEK293 细胞系和外周血内皮祖细胞适用于研究血管性血友病中 VWF 因子结构和功能的关系。利用这两种细胞模型，我们发现血管性血友病中 VWF 因子量的缺失是由 VWF 因子细胞内储存和分泌的缺陷引起的（图 1.）。这一病理机制已被其他研究人员证实[10,18,19]。此外，我们发现 VWF 因子结构的改变，如血管性血友病人的基因突变引起的 VWF 因子结构变化，可以影响 VWF 因子线状结构的形成和功能。在正常的流体剪切应力（shear stress）下，即动脉中 10~70 dynes/cm^2 或静脉中 1~6 dynes/cm^2[20]，血浆中的 VWF 因子很难粘附血小板，而在活化的血管内皮细胞表面形成的 VWF 因子线状结构却能够粘附并募集血流中的血小板，从而在血管损伤处引发血栓形成。因此，

VWF 因子线状结构形成或功能缺陷可能引起出血症状。

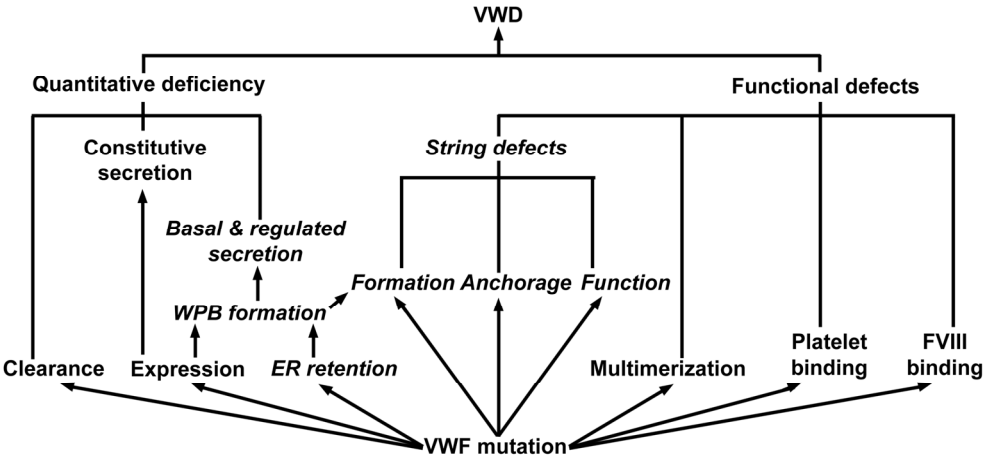

图 1. 血管性血友病病理机制示意图。

VWF 因子基因突变通过复杂的机制导致 VWF 因子量的缺失或功能缺陷，从而引起血管性血友病。本博士论文提出了新的致病机理（斜体部分）：1）Weibel-Palade 小体的形成和胞吐缺陷；2）VWF 因子线状结构的形成和驻留障碍或功能的缺失。注释：持续性分泌（constitutive secretion）是指 VWF 因子直接从内质网分泌的途径；基础性分泌（basal secretion）是指 VWF 因子在没有任何刺激存在下从 Weibel-Palade 小体分泌的途径；调节性分泌（regulated secretion）是指 Weibel-Palade 小体受到刺激后分泌 VWF 因子的途径。缩写：VWF - VWF 因子；VWD - 血管性血友病；WPB - Weibel-Palade 小体。

血管内皮细胞的 Weibel-Palade 小体通过基础分泌途径分泌的 VWF 因子可能是血浆 VWF 因子的主要来源[21,22]。通过调节性分泌途径即刺激引起的胞吐，VWF 线状结构可以形成在血管内皮细胞表面并聚集血小板，从而引起血小板粘附和凝聚。由于任何一条分泌途径的缺陷都可能导致血管性血友病，因此，我们推测血管性血友病的未来研究方向将是：1）VWF 因子基因突变的病理机制必须在能够形成 Weibel-Palade 小体的细胞模型中研究，如 HEK293 细胞系和从病人外周血分离的内皮祖细胞；2）关于 VWF 因子基因突变的病理作用的分析，除 VWF 多聚体之

外，Weibel-Palade 小体的形成与胞吐，VWF 因子线状结构的生成和功能等需要纳入分析参数；3）鉴于 Weibel-Palade 小体是若干炎症因子如 P-选择素和 angiopointin-2 的胞内储存器，而且 VWF 因子本身也调控血管生成[23]，研究血管性血友病病人的炎症反应和血管变化可能是未来的研究方向之一。我们认为在分析 VWF 因子基因突变的病理作用时，增加以上三个方面的病理分析，更有利于临床医生更好地理解血管性血友病的病理机制，从而提出更好的治疗方案，使患者受益。

文献

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, Batlle 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.