



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Characterization of mouse coagulation (regulatory) genes with use of RNAi

Safdar, H.

Citation

Safdar, H. (2014, November 4). *Characterization of mouse coagulation (regulatory) genes with use of RNAi*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29594>

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/1887/29594>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29594> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Safdar, Huma

Title: Characterization of mouse coagulation (regulatory) genes with use of RNAi

Issue Date: 2014-11-04

Chapter 8

Summary

Summary in Dutch

(Nederlandse samenvatting)

Over the past years epidemiological studies have revealed a number of acquired risk factors - including estrogen and thyroid hormones, obesity, immobility, pregnancy, malignancies, surgery and metabolic syndrome - that increase the risk of venous thrombosis. Several of these acquired risk factors coincide with changes in the plasma coagulation profile and lead to a hypercoagulable state. Since the liver is the major organ for the production of coagulation factors, this hypercoagulable state may occur when altered transcription of coagulation genes in the liver leads to an imbalance in the ratio of pro- and anti-coagulant proteins in the plasma.

Mechanisms by which acquired risk factors modulate transcription of coagulation genes and lead to the hypercoagulable state are not completely elucidated. Therefore, we aimed to study the mechanisms underlying alterations in hepatic coagulation gene transcription in more detail in an attempt to increase our understanding of why a thrombotic risk condition coincides with abnormal coagulation profiles. RNA interference (via synthetic small interfering RNA; siRNA) was used as a tool to study genes involved in coagulation and coagulation control in mice.

General background on venous thrombosis, risk factors and the possible mechanisms by which these factors increased the risk of venous thrombosis are discussed in **chapter 1**. Alterations in coagulation profile by thrombotic risk factors occur probably by modulation of gene transcription in the liver. Gene transcription can be modulated at several levels, ranging from transcription factors, hormone-mediated nuclear hormone receptors, co-regulators or intermediate factors. Furthermore, to study the mechanisms underlying alterations in hepatic coagulation gene transcription, several experimental models and methodologies are reviewed. Mice and siRNA-induced gene silencing are discussed as a potential suitable model system and approach for studies described in this dissertation.

As part of **chapter 2**, we investigated the contribution of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) to controlling hepatic transcription of anticoagulant and fibrinolytic factors *in vitro* and *in vivo*. To study the contribution of HNF4 α , a dual approach was used; conditional liver-specific *Hnf4 α* -null mouse (*in vivo*) and siRNA-mediated fast and acute silencing of HNF4 α in mouse primary hepatocytes (*in vitro*). This latter approach was used to exclude delayed/indirect effects of HNF4 α deletion (in *Hnf4 α* -null mouse) on transcript levels of anticoagulant and fibrinolytic factors. We showed that HNF4 α is critical in regulating hepatic transcription of anticoagulant and fibrinolytic factors *in vivo* and *in vitro*.

In **Chapter 3** we established the use of siRNA-mediated gene silencing *in vivo*. Efficient, fast, acute and strong knockdown of transcription factors HNF4 α and C/EBP α was achieved with sequence specific synthetic siRNA in mouse liver. Hepatic gene expression levels of a number of procoagulant, anticoagulant and fibrinolytic factors were affected upon acute and fast knockdown of HNF4 α and C/EBP α in mouse liver, which demonstrated a direct role of these factors (HNF4 α and C/EBP α) in controlling hepatic gene transcription. Moreover, this study showed that synthetic siRNA forms a powerful and relatively simple tool to determine the role of hepatic transcription factors involvement *in vivo*.

Estrogen hormones are able to modulate gene expression of coagulation factors via estrogen receptor α (ER α). Moreover, a factor like forkhead protein (FOXA1), an intermediate protein which acts as a pioneer factor, is a major determinant of estrogen-ER α function in breast and non-breast cancer cells, whereas knowledge of the function of hepatic FOXA1 and interaction with hepatic ER α is missing. In **Chapter 4** we investigated the role of FOXA1 in absence of estrogen and as an intermediate factor in estrogen response in mouse liver. siRNA-mediated knockdown of FOXA1 in mouse liver was associated with altered coagulation gene expression in absence of estrogen, which showed the role of FOXA1 in regulation of

coagulation gene transcription. Additionally, we showed that hepatic FOXA1 is required for estrogen-bound-ER α chromatin binding in mouse liver, as it is in (human) estrogen responsive cancer cells.

Deletion of anticoagulant factors (antithrombin and protein C) is embryonic lethal in mice therefore precluding the use of these knockout mice in gene function studies or as thrombosis model. siRNA-mediated gene silencing provided a relatively simple tool to study the function of such proteins in adult mice, which is described in **chapter 5**. Combined gene silencing of both of these factors resulted in thrombosis-related severe coagulopathy in adult mice, showing the vital anticoagulant function of these proteins in adult mouse. Moreover, silencing of antithrombin and protein C provided a relatively easy, controlled, and novel mouse thrombosis model.

Single nucleotide polymorphism (SNP) studies demonstrated the association of the human chromosome 4q35.2 locus with increased risk for deep venous thrombosis. In **chapter 6**, the aim was to search for experimental evidence for putative common regulatory elements in the orthologous mouse gene cluster of the human 4q35.2 locus that contains the coagulation factor XI (*F11*), prekallikrein (*Klk1*) and cytochrome P450 family member (*Cyp4v3*) genes. We analyzed transcript levels of *F11*, *Klk1* and *Cyp4v3* in several metabolically challenged mice in which hepatic *F11* transcript levels were impacted. Metabolic conditions included HNF4 α deletion, (natural and synthetic) estrogen hormone treatment, thyroid hormone, and high fat diet in mice. We observed parallel hepatic transcriptional response of *F11* and *Klk1* for high fat feeding condition. In contrast, strikingly parallel hepatic transcript response of *F11* and *Cyp4v3* were observed in all studied conditions except for thyroid hormone suggesting the presence of shared regulatory elements.

In **chapter 7**, findings presented in this dissertation and possibilities for future research are discussed on basis of available recent literature.

In summary, we utilized a siRNA strategy throughout this dissertation, which proved to be a valuable tool to study genes in mice that are suspected to play a role in the pathophysiology of venous thrombosis. We showed that transcription factors like HNF4 α , C/EBP α and FOXA1 (directly) regulated the expression levels of a number of hepatic coagulation genes. We suggest that these transcription factors are potentially relevant for the etiology of venous thrombosis. Depletion of antithrombin and protein C leads to the formation of thrombi and fibrin deposition, showing the importance of these factors in adult mouse hemostasis and provided a novel mouse model featuring a spontaneous (venous) thrombotic phenotype. Studies described in this dissertation may contribute to a better understanding of which genes are involved in coagulation (control) and how thrombotic risk factors result in a hypercoagulable state.

Summary in Dutch - Nederlandse samenvatting

In de afgelopen jaren hebben verschillende epidemiologische studies aangetoond dat een aantal verworven factoren, waaronder anticonceptiepill gebruik (oestrogeen hormoon), schildklierhormonen, obesitas, immobiliteit, zwangerschap, (bepaalde) tumoren, chirurgie en metabool syndroom, het risico op veneuze trombose verhogen. Sommige verworven risicofactoren gaan samen met veranderingen in het plasma stollingsprofiel en leiden tot een protrombotische verschuiving van de hemostase balans (hypercoagulatie). Omdat de lever van groot belang is voor de aanmaak van plasma stollingsfactoren kan de verstoring van deze balans o.a. een gevolg zijn van veranderingen in transcriptie regulatie van stollingsgenen in de lever. Afwijkende transcriptie van stollingsgenen kan gevolgen hebben voor de balans van pro- en antistolling eiwitten in het plasma. Echter, mechanismen waarbij verworven risicofactoren de gentranscriptie van stollingsfactoren zodanig beïnvloeden dat een protrombotische verschuiving van de hemostase balans ontstaat zijn niet volledig bekend. Daarom was het doel van het onderzoek om een gedetailleerde studie te verrichten naar veranderingen in de gentranscriptie van stollingsfactoren in de lever van muizen. Door de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan transcripcionele regulatie van stollingsfactorgenen beter in kaart te brengen verschaffen we meer inzicht in de samenhang tussen trombotische risicocondities en abnormale bloedstollingsprofielen. We hebben voornamelijk gebruik gemaakt van RNA-interferentie (m.b.v. synthetische korte interfererende RNA, siRNA) technieken om genen te bestuderen die betrokken zijn bij transcriptie regulatie van bloedstolling factoren in de muis.

Achtergrondinformatie over veneuze trombose, risicofactoren en de mogelijke mechanismen waardoor deze factoren het risico op veneuze trombose verhogen worden besproken in **hoofdstuk 1**. Door het

moduleren van gentranscriptie in de lever, kunnen trombotische risicofactoren mogelijk veranderingen in het coagulatieprofiel veroorzaken. Deze gentranscriptie kan op verschillende niveaus gemoduleerd worden, variërend van transcriptie factoren, hormoon-gerelateerde nucleaire hormoon receptoren, co-regulators of intermediaire factoren. Bovendien worden een aantal experimentele modellen en methodieken bediscussieerd die gebruikt kunnen worden om de onderliggende mechanismen van transcriptionele veranderingen van stollingsgenen in de lever te bestuderen. Muizen en siRNA-geïnduceerde reductie (knockdown) van genexpressie worden besproken als een mogelijke geschikte modelsysteem en aanpak voor de studies beschreven in dit proefschrift.

Als onderdeel van **hoofdstuk 2** onderzochten we de bijdrage van hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in de lever op de transcriptionele regulatie van antistollings- en fibrinolytische factoren *in vitro* en *in vivo*. Er werd een tweeledige aanpak gebruikt om de bijdrage van HNF4 α te bestuderen: gebruik van conditionele lever-specifieke Hnf4 α -null muizen (*in vivo*) en door siRNA-gemedieerde snelle en acute knockdown van HNF4 α expressie in primaire hepatocyten van muizen (*in vitro*). Deze laatste benadering is gebruikt om latere/indirecte effecten van HNF4 α deletie (in Hnf4 α -null muizen) op transcriptie niveaus van antistollings- en fibrinolytische factoren uit te sluiten. We hebben aangetoond dat HNF4 α essentieel is in de lever voor de transcriptionele regulatie van antistollings- en fibrinolytische factoren *in vivo* en *in vitro*.

In **hoofdstuk 3** hebben we siRNA-gemedieerde *in vivo* knockdown toegepast om de expressie van specifieke genen te reduceren. Efficiënte, snelle, acute en sterke knockdown van twee verschillende transcriptiefactoren HNF4 α en C/EBP α in muizenlever werd bereikt met sequentie-specifieke synthetische siRNA. Genexpressie niveaus van een aantal pro-stolling, antistolling en fibrinolytische factoren werden beïnvloed door acute en snelle knockdown van HNF4 α en C/EBP α in muizenlever wat

aanduid op een directe rol van deze eiwitten (HNF4 α en C/EBP α) in de transcriptionele regulatie van lever genen. Bovendien toonde deze studie aan dat synthetische siRNA een krachtige en relatief eenvoudig hulpmiddel is om de rol van lever transcriptiefactoren *in vivo* te bepalen.

Oestrogeen hormonen zijn in staat om de genexpressie van stollingsfactoren te moduleren via oestrogeenreceptor α (ER α). Bovendien is er een factor zoals het forkhead eiwit (FOXA1), een intermediair eiwit dat functioneert als een pionier factor, FOXA1 heeft een belangrijk rol in hormoongevoelige borstkankercellen. De kennis rondom de functie van de lever FOXA1 en interactie van FOXA1 met ER α in lever ontbreekt. In **hoofdstuk 4** onderzochten wij de rol van FOXA1 bij afwezigheid van oestrogeen en als intermediair factor in oestrogeenresponse in muizenlever. siRNA-gemedieerde knockdown van FOXA1 in muizenlever werd geassocieerd met een veranderde expressie van stollingsgenen in de afwezigheid van oestrogeen. Hieruit concluderen wij ten eerste dat FOXA1 een sleutelrol vervult in de regulatie van transcriptie van bloedstollingsgenen. Daarnaast toonden we aan dat hepatische FOXA1 nodig is voor oestrogeen-ER α gebonden chromatine binding in muizenlever, zoals in (humane) oestrogeen reagerende kankercellen.

Volledige deletie oftewel 'knockout muizen' voor genen betrokken bij de natuurlijke antistolling (zoals antitrombine en proteïne C) zijn niet levensvatbaar en daarom is dit een belangrijk obstakel voor het gebruik van deze methode in gen-functie studies of als diermodel voor trombose studies. Echter, siRNA-gemedieerde knockdown van gen expressie verstrekt een relatief eenvoudig hulpmiddel om de functie van dergelijke eiwitten bij volwassen muizen te bestuderen, dit wordt beschreven in **hoofdstuk 5**. Gecombineerd knockdown van beide factoren leidt tot trombose gerelateerde ernstige coagulopathie bij volwassen muizen hetgeen de vitale anti-coagulerende werking van deze eiwitten bij volwassen muizen aantoonde. Bovendien het knockdown van antitrombine

en proteïne C genexpressie verstrekt een relatief eenvoudige, gecontroleerde en nieuwe muis trombose model.

Single nucleotide polymorfisme (SNP) studies hebben een verband aangetoond tussen de menselijke 4q35.2 gen gebied met een verhoogd risico op diepe veneuze trombose. In **hoofdstuk 6** was het doel om te zoeken naar het experimentele bewijs voor de mogelijk gemeenschappelijk regulerende elementen in de orthologe muizen gen cluster van de menselijke 4q35.2 regio. Dit cluster bestaat uit stollingsfactor XI (*F11*), prekallikreïne (*Klkb1*) en cytochroom P450 familielid (*Cyp4v3*) genen. We hebben het transcript niveaus van *F11*, *Klkb1* en *Cyp4v3* geanalyseerd in diverse muizen met een afwijking in het metabolisme waarin *F11* transcriptie niveaus werden beïnvloed in lever. De geteste metabole defecten zijn HNF4 α deletie, oestrogeen (natuurlijke en synthetische) hormoon, schildklierhormoon en een hoog vet dieet in muizen. De transcriptie van *F11* en *Klkb1* veranderde op een gelijke wijze wanneer de muizen een vetrijk dieet gevoerd werden. Daarentegen transcriptie van *F11* en *Cyp4v3* veranderde op aanzienlijke gelijke wijze in lever in alle onderzochte studie condities behalve in het schildklierhormoon; dit suggereert de aanwezigheid van gedeelde regulerende elementen.

In **hoofdstuk 7** worden de bevindingen in dit proefschrift nader bediscussieerd en mogelijkheden voor toekomstig onderzoek besproken op basis van de beschikbare recente literatuur.

Samenvattend hebben we in dit proefschrift gebruik gemaakt van de siRNA strategie en dat bleek een waardevolle techniek om de functie van genen te bestuderen die vermoedelijk een rol spelen in de pathofysiologie van veneuze trombose. We hebben aangetoond dat transcriptie factoren zoals HNF4 α , C/EBP α en FOXA1 (rechtstreeks) de expressie van een aantal lever stollingsgenen reguleren. We stellen dat deze transcriptie factoren potentieel relevant zijn voor de etiologie van veneuze trombose. Reductie van antitrombine en proteïne C gen expressie leidt tot de vorming van

trombi- en fibrinedepositie in weefsels, wat ten eerste het belang van deze factoren laten zien in hemostase bij volwassen muizen. Ten tweede het verstrekt een nieuw muismodel die een spontane (veneuze) trombotische fenotype aantoont. Studies beschreven in dit proefschrift dragen bij aan een beter begrip van de rol van genen bij de bloedstolling (controle) en hoe risicofactoren van trombose leiden tot een protrombotische verschuiving van de hemostase balans.

