



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Personalized treatment for von Willebrand disease by RNA-targeted therapies

Jong, A. de

Citation

Jong, A. de. (2020, April 7). *Personalized treatment for von Willebrand disease by RNA-targeted therapies*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136853>

Version: 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/1887/136853>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136853> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Jong, A. de

Title: Personalized treatment for von Willebrand disease by RNA-targeted therapies

Issue date: 2020-04-07

Nederlandse samenvatting

De ziekte van von Willebrand is de meest voorkomende erfelijke bloedingsziekte met een prevalentie van ongeveer één patiënt op elke 10.000 mensen. Patiënten ontwikkelen voornamelijk blauwe plekken, bloedneuzen of tandvleesbloedingen. Vrouwen hebben vaak ook hevig menstrueel bloedverlies en sommige patiënten die ernstiger zijn aangedaan kunnen gewrichtsbloedingen of darmbloedingen ontwikkelen. Bloedingen na verwondingen zullen minder snel stoppen. Ook kunnen ernstige bloedingen ontstaan tijdens een operatie of kiesextractie. Bloedingen bij de ziekte van von Willebrand worden veroorzaakt door een defect in de von Willebrand factor (VWF). VWF is een groot multimeereiwit dat wordt aangemaakt in endotheelcellen, de cellen die de vaatwand bekleden, en in megakaryocyten, cellen van waaruit de bloedplaatjes worden aangemaakt. In dit proefschrift bespreken we alleen de rol van VWF dat in het endotheel wordt geproduceerd. Na synthese van VWF monomeren in het endotheel worden in het endoplasmatisch reticulum twee VWF monomeren aan elkaar gekoppeld, zodat er een VWF dimeer wordt gevormd. Vervolgens zullen de dimeren aan elkaar worden gekoppeld in het Golgicomplex en zo een groot VWF multimeer vormen. Deze VWF multimeren worden opgeslagen in endotheelcellen in langgerekte opslagorganellen, de zogenoemde Weibel-Palade-lichaampjes. Op het moment van vaatschade zullen signalen ervoor zorgen dat VWF uit het endotheel wordt uitgescheiden. Door de aanwezigheid van stroming in de bloedvaten zal het VWF zich uitrollen tot hele lange VWF strengen. Door het uitrollen van VWF kunnen bloedplaatjes binden, waardoor de bloedstelping start. VWF wordt vervolgens geknipt waardoor VWF vrij gaat circuleren in het bloed. In de circulatie heeft VWF nog een belangrijke functie: het binden van het stollingseiwit factor VIII. Doordat VWF en factor VIII gebonden aan elkaar zijn, zal factor VIII langer in het bloed kunnen blijven circuleren. De ziekte van von Willebrand kan worden veroorzaakt door een defect in alle mechanismen die hierboven beschreven zijn en patiënten worden aan de hand van het specifieke defect ingedeeld in verschillende typen van de ziekte van von Willebrand; types 1, 2A, 2B, 2M, 2N en 3. Patiënten met de ziekte van von Willebrand type 1 hebben een verlaagde concentratie van VWF in het bloed. Dit kan worden veroorzaakt door een verlaagde productie, maar ook door een defect in het uitscheiden van VWF uit het endotheel of doordat het VWF te snel door het lichaam wordt afgebroken. Patiënten met de ziekte van von Willebrand type 2A hebben afwijkende VWF multimeren. Dit kan worden veroorzaakt doordat het proces van dimerizatie of multimerizatie in de cellen zelf defect is, maar ook doordat de VWF multimeren te snel worden afgebroken. Bij de ziekte van von Willebrand type 2B en 2M is er een defect in het binden van VWF aan bloedplaatjes, met in type 2B een verhoogde binding aan bloedplaatjes, en in type 2M een verlaagde binding aan bloedplaatjes. Een verminderde binding van VWF aan stollingsfactor VIII is het onderliggende probleem in patiënten met de ziekte van von Willebrand type 2N. Als laatste, patiënten met type 3 van de ziekte van von Willebrand hebben een volledige afwezigheid van VWF in het bloed.

De ziekte van von Willebrand is een erg diverse ziekte, waardoor de diagnose lastig kan zijn. Het stappenplan in de diagnostiek van de ziekte van von Willebrand staat beschreven in **hoofdstuk 2** van dit proefschrift. Allereerst wordt de patiënt gevraagd naar de persoonlijke bloedingsgeschiedenis en of bloedingen ook veelvuldig voorkomen in de familie. Wanneer de mogelijkheid bestaat dat de patiënt een bloedingsziekte heeft, zullen er een aantal standaard testen worden afgenomen om andere bloedingsziekten uit te sluiten. Als de diagnose van de ziekte van von Willebrand aannemelijk is, zullen ziektespecifieke testen worden afgenomen. In deze testen wordt de VWF concentratie en VWF en factor VIII activiteit in het plasma van de patiënt bepaald. Als de diagnose van de ziekte van von Willebrand is gesteld, zullen nog een aantal extra testen worden afgenomen om de specifieke type van de ziekte te bepalen. Voorbeelden van deze testen zijn het analyseren van de VWF multimeren en de binding van VWF aan factor VIII en collageen.

De ziekte van von Willebrand wordt in de meeste gevallen veroorzaakt door mutaties in VWF. Al vanaf het begin van de jaren 90 van de vorige eeuw zijn mutaties in VWF beschreven in de literatuur. In **hoofdstuk 3** is een overzicht gemaakt van alle mutaties in VWF die beschreven zijn tot het begin van 2017. In totaal zijn er ongeveer 750 verschillende variaties in VWF gekoppeld aan de ziekte van von Willebrand. Van deze variaties is voor 220 mutaties daadwerkelijk bewezen dat deze tot de ziekte van von Willebrand leiden. Bewijs hiervoor is geleverd door het bestuderen van deze mutaties in ziektemodellen. Veelvuldig gebruikte ziektemodellen zijn cellen waarin het mutant VWF tot expressie wordt gebracht. Ook is er in de literatuur gebruik gemaakt van VWF deficiënte muizen waarin het VWF tot expressie werd gebracht. De meeste mutaties die de ziekte van von Willebrand type 1, 2A, 2B en 2M veroorzaken zijn dominant negatieve mutaties. Dit betekent dat maar 1 van de 2 VWF allelen defect hoeft te zijn om de ziekte te veroorzaken. De ziekte van von Willebrand type 2N en 3 wordt veroorzaakt door recessieve mutaties. In het geval van recessieve mutaties moeten beide VWF allelen zijn aangedaan om de ziekte te krijgen.

Aangezien de ziekte van von Willebrand meestal wordt veroorzaakt door dominant negatieve mutaties, hadden we als hypothese dat het remmen van het mutante VWF allel, zonder het gezonde 'wild type' allel te remmen, een positief effect heeft op de functie van VWF en dat daarbij ook het fenotype van de ziekte van von Willebrand zou kunnen verbeteren. Dit idee zou een eventuele nieuwe therapeutische benadering zijn voor een populatie van patiënten met de ziekte van von Willebrand die onvoldoende baat hebben bij de huidige therapieën. Voor het remmen van specifiek het mutante VWF allel hebben we in dit proefschrift gebruik gemaakt van zogenoemde 'small interfering' RNAs (siRNAs). siRNAs zijn korte dubbelstrengs RNA moleculen die ontworpen worden volledig complementair aan een 'messenger' RNA (mRNA) sequentie. Volledige complementariteit van het siRNA aan een mRNA zal leiden tot afbraak van het mRNA. Hierdoor zal er geen eiwit geproduceerd kunnen worden. Echter kan

een ‘mismatch’ tussen een siRNA en mRNA ervoor zorgen dat de siRNA niet goed kan binden, waardoor de siRNA zijn functie niet goed kan uitvoeren. Hierdoor kan het mRNA normaal worden omgezet in eiwit. Om onderscheid te maken tussen het mutante en gezonde *VWF* allel moet een siRNA worden ontworpen tegen een heterozygote variatie in het *VWF* gen. Dit zou de genetische variatie kunnen zijn die leidt tot de dominant negatieve mutatie zelf, aangezien de patiënt altijd heterozygoot is voor deze mutatie. Een andere mogelijkheid is om gebruik te maken van heterozygote ‘single nucleotide variaties’ (SNPs). SNPs zijn genetische variaties die van nature voorkomen in ons DNA, maar die niet perse geassocieerd zijn met ziekten. Sommige van deze SNPs komen heel vaak voor, wat betekent dat veel personen in een populatie heterozygoot zijn voor deze SNPs. Door een siRNA te gebruiken tegen een heterozygote SNP die op hetzelfde allel ligt als de dominant negatieve mutatie, zou het dus ook mogelijk kunnen zijn om de productie van het mutante allel te remmen. In dit proefschrift is gekozen om siRNAs te ontwerpen tegen deze veelvoorkomende SNPs, aangezien we met een gering aantal SNPs een groot gedeelte van de populatie kunnen bestrijken. Als we elke afzonderlijke mutatie willen gebruiken als target voor de siRNAs, zijn (gezien de grote hoeveelheid aan *VWF* mutaties) veel meer siRNA ontwerpen nodig. In een therapeutisch perspectief zou het niet haalbaar zijn al die siRNAs te testen. Daarom hebben we voor dit proefschrift gebruik gemaakt van vier verschillende SNPs en zijn er siRNAs ontworpen voor beide allelen van deze vier SNPs. Met deze vier SNPs is het mogelijk om 74 procent van de populatie te bereiken. In **hoofdstuk 4** hebben we getest of de siRNAs die we hebben ontworpen, daadwerkelijk effectief zijn. Dit is gedaan in ‘human embryonic kidney’ 293 (HEK293) cellen, cellen die van nature geen *VWF* aanmaken. Door het tegelijkertijd transfecteren van twee *VWF* plasmiden met twee verschillende SNP allelen, en een siRNA die één de twee *VWF* allelen zou moeten remmen, hebben we gekeken of de ontworpen allel specifieke siRNAs functioneel waren. Hierdoor hebben we een set van siRNAs kunnen selecteren die efficiënt en specifiek *VWF* allelen konden remmen. Op het moment dat we de siRNAs aanboden aan cellen die zowel het wild type *VWF* als een mutant (type 2A) *VWF* produceerden, zagen we de productie van het mutante *VWF* verlagen en ook een duidelijke verbetering van het multimerisatiefenotype.

De studies in HEK293 cellen waren heel effectief voor het selecteren van effectieve siRNAs. Echter produceren deze cellen geen *VWF* van nature. Om deze reden wilden we ook in een ander, fysiologisch relevanter, celtype het bewijs leveren dat allel specifieke siRNAs effectief zijn in het verbeteren van een von Willebrand fenotype. ‘Endothelial colony forming cells’ (ECFCs) zijn gekweekte endotheelcellen die uit bloed kunnen worden geïsoleerd en ook daadwerkelijk endotheelspecifieke eigenschappen hebben. Aangezien deze cellen ook uit patiënten kunnen worden geïsoleerd, is het een aantrekkelijk ziektemodel om de allel specifieke siRNAs in uit te testen. In **hoofdstuk 5** optimaliseren we het gebruik van de ECFCs als ziektemodel. Voor de optimalisatie hebben we 16 verschillende ECFC lijnen, die we hebben kunnen isoleren van zes verschillende gezonde proefpersonen, gekarakteriseerd op allerlei *VWF*-gerelateerde eigenschappen. We merkten veel verschillen op tussen de cellen, zowel op

het gebied van de celmorfologie als de productie van VWF door de cellen. Een belangrijke associatie die we vonden was de associatie tussen de celdichtheid en VWF productie, waarbij ECFC lijnen met een hoge celdichtheid (kleinere cellen) meer VWF produceerden dan cellen met een lage celdichtheid (grote cellen). Verder konden cellen met een lage celdichtheid beter tubes (kleine vaatjes) vormen in Matrigel. We hebben ook getracht de oorzaak voor de verschillen tussen de ECFC lijnen te achterhalen door middel van genexpressie studies. Daarbij zagen we dat cellijnen met een lage celdichtheid meer veroudering en mesenchymale eigenschappen hadden. Het is erg belangrijk om de variatie tussen de verschillende ECFC lijnen te erkennen wanneer onderzoek wordt gedaan met ECFCs. Het is daarom aan te raden om alleen ECFC lijnen met dezelfde eigenschappen met elkaar te vergelijken. Bijvoorbeeld bij het karakteriseren van een patiënten ECFC lijn is het belangrijk deze te vergelijken met een controle ECFC lijn met dezelfde cellulaire karakteristieken. Wanneer je de effecten van een bepaalde behandeling, bijvoorbeeld behandeling met siRNA, onderzoekt in een patiënten ECFC lijn, zal je echter de behandelde patiënten ECFCs met onbehandelde patiënten ECFCs vergelijken. Cellen zijn dan hun eigen interne controle en kunnen op die manier zonder aarzeling gebruikt worden.

Voordat de effecten van alle specifieke siRNAs worden onderzocht in patiënten ECFCs is het belangrijk om eerst de effecten te bestuderen die siRNA-gemedieerde verlaging van VWF heeft op de functie van VWF. Zeker aangezien in eerder onderzoek is aangetoond dat het verlagen van de productie van VWF door middel van een siRNA leidt tot kortere, meer rondvormige, Weibel-Palade-lichaampjes. Ook werd in deze eerdere studie een verhoogde secretie van VWF gezien na het verlagen van de VWF productie in endotheelcellen. We hebben deze eerdere bevindingen gereproduceerd in **hoofdstuk 6** van dit proefschrift, maar laten in dit hoofdstuk ook zien dat het remmen van VWF productie door middel van siRNAs resulteert in verhoogde secretie van voornamelijk kleinere VWF multimeren. Deze veranderingen in VWF productie en multimerisatie zijn belangrijk om in het achterhoofd te houden bij het bestuderen van siRNA behandelingen in patiënten ECFCs.

In **hoofdstuk 7** is bekeken of de siRNAs die zijn geselecteerd in de studies in HEK293 cellen (hoofdstuk 4), ook in ECFCs efficiënt en specifiek *VWF* allelen kan remmen. Deze siRNAs bleken inderdaad ook effectief te zijn in ECFCs, wat bestudeerd is op zowel eiwit als RNA niveau in ECFCs verkregen van gezonde controles. Daarnaast hebben we succesvol ECFCs geïsoleerd van een patiënt met de ziekte van von Willebrand type 2A. Deze patiënt had afwijkende VWF multimeren, een verlaagde binding van VWF aan collageen en retentie van VWF in het endoplasmatisch reticulum. Uit genotype data bleek dat deze patiënt heterozygoot is voor één van de SNPs waarvoor siRNAs zijn ontworpen. Behandeling van de patiënt ECFCs met een siRNA gericht tegen de SNP gelegen op hetzelfde allel als de dominant negatieve mutatie, leidde tot een verbetering in de fenotype van de patiënt ECFCs.

De studies in HEK293 cellen en ECFCs resulteerde in veelbelovende resultaten. Echter kunnen een aantal belangrijke aspecten in de fysiologie van de ziekte van von Willebrand niet worden bestudeerd in deze statische celmodellen. Daarom was het laatste doel in dit proefschrift, beschreven in **hoofdstuk 8**, om de effecten van allel specifieke siRNAs te testen in een heterozygoot muismodel voor de ziekte van von Willebrand. Heterozygote von Willebrand muizen met een type 2B fenotype zijn gegenereerd door mutant en wild type VWF tot expressie te brengen in de muizen. Voor deze studie is gebruik gemaakt van een veel bestudeerde type 2B mutatie: VWF p.Val1316Met. Deze mutatie leidt in mensen, maar ook in muizen tot verlaagde plaatjesaantallen, vergrote plaatjes en een verhoging van VWF dat circuleert in een actieve conformatie. Het remmen van het mutante allel, door middel van een siRNA gericht tegen de VWF p.Val1316Met mutatie zelf, leidde tot correctie van het fenotype met een correctie in plaatjesaantallen, normalisatie van de plaatjes grootte en een verlaging van circulerend actief VWF.

Samenvattend leveren studies die beschreven staan in dit proefschrift het bewijs dat allel specifieke remming van VWF door middel van siRNAs effectief is en resulteert in verbeteringen van verschillende fenotypen van de ziekte van von Willebrand. Dit is bestudeerd in HEK293 cellen, in ECFCs en in een muismodel voor de ziekte van von Willebrand. Deze resultaten zijn veelbelovend voor de verdere ontwikkeling van allel specifieke siRNAs als nieuw behandelingsstrategie voor patiënten met de ziekte van von Willebrand.