



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Pathophysiology of von Willebrand factor in bleeding and thrombosis

Pagliari, M.T.

Citation

Pagliari, M. T. (2023, September 20). *Pathophysiology of von Willebrand factor in bleeding and thrombosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3641439>

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/1887/3641439>

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

SAMENVATTING

Von Willebrand factor (VWF) is een multimeer glycoproteïne dat vooral betrokken is in de primaire hemostase bij het aantrekken van bloedplaatjes naar de plaats van vaatbeschadiging en tevens functioneert VWF als dragereiwit voor stollingsfactor VIII (FVIII). Kwantitatieve of functionele veranderingen van VWF zijn verantwoordelijk voor de ziekte van Von Willebrand (VWD). Omgekeerd is gebleken, dat verhoogde concentraties van VWF geassocieerd zijn met verschillende trombotische aandoeningen, zoals arteriële trombose, herseninfarct en veneuze trombo-embolie. De dubbele rol van VWF bij zowel het ontstaan van bloedingen als trombose, met een focus op VWD en diep veneuze trombose (DVT), wordt in dit proefschrift besproken.

In het eerste deel van de thesis hebben we de diagnostische benadering van VWD beschreven, inclusief het gebruik van *in silico* tools en heterologe celsystemen om de oorzakelijkheid van VWF varianten bij het ontstaan van VWD vast te stellen.

In **Hoofdstuk 2** hebben we de diagnostische benadering beschreven hoe er onderscheid gemaakt kon worden tussen type 2A en 2B VWD bij een kind dat drager bleek van een *de novo* en niet eerder gerapporteerde VWF variant. Op basis van biochemische karakteristieken, namelijk het ontbreken van hoog moleculair gewicht VWF multimeren en een verlaagde VWF collageen binding (VWF:CB), kon VWD type 2M worden uitgesloten. Het identificeren van een nieuwe, nog onbekende deletie in het A2 domein, maakte het niet mogelijk om op basis van de mutatie onderscheid te maken tussen type 2A en 2B VWD. De conventionele benadering om type 2B van de andere types 2 VWD te onderscheiden vereist het verrichten van de zogenaamde ristocetine geïnduceerde plaatjes aggregatie (RIPA) test. Deze assay vereist echter een relatief groot volume vers afgenomen bloed, hetgeen met name bij kinderen minder wenselijk is. Daarom hebben we een alternatieve benadering gekozen, waarbij gebruik gemaakt is van een plaatjes-afhankelijke VWF activiteitsbepaling (VWF:GPIbM ELISA). Deze bepaling kan, met slechts een kleine hoeveelheid ingevroren plasma, onderscheid maken tussen type 2B VWD en de overige types 2. Met deze benadering konden we bevestigen dat er bij onze patiënt sprake was van type 2A VWD.

In **Hoofdstukken 3 en 4** hebben we voorspellende *in silico* modellen en heterologe celsystemen toegepast om de pathogene rol te bewijzen van VWF varianten die waren gevonden bij VWD patiënten. In beide hoofdstukken zijn *in vitro* expressie studies verricht met behulp van transiente transfectie in HEK293 cellen van wild type en mutante expressievectoren. In **Hoofdstuk 3** hebben we het effect bestudeerd van de eerder beschreven type 1 variant p.Arg1379Cys, die we gevonden hadden in vijf niet verwante patiënten. Van deze vijf patiënten was er één gediagnosticeerd als type 1 VWD, terwijl de andere vier getypeerd waren als type 2M VWD. Deze laatste vier waren ook drager van een polymorfisme, p.Ala1377Val, waarvan de bijdrage aanvankelijk was onderschat. De *in silico* analyse toonde, dat beide varianten het A1 domein destabiliseren, hetgeen ons deed hypothetiseren dat beide varianten mogelijk een synergistisch effect hebben

leidend tot een verlaagde VWF bindingscapaciteit voor GPIb. Daarna hebben we de capaciteit van wild type, mutant en hybride recombinant (r)VWF voor binding aan recombinant glycoproteïne Ib α (rGPIb α) getest in de aanwezigheid van oplopende concentraties ristocetine. Via deze aanpak waren we in staat om te bevestigen, dat het synergistische effect van de twee varianten verantwoordelijk is voor het type 2M fenotype in de patiënten.

In **Hoofdstuk 4** is de karakterisering beschreven van twee niet-verwante Italiaanse patiënten die gediagnostiseerd waren als type 1 VWD. Beiden bleken heterozygoot drager van dezelfde nieuwe VWF variant p.Thr274Pro gelokaliseerd in het VWF propeptide (VWFpp). Deze variant toonde een dominant-negatief effect in tegenstelling tot eerder beschreven varianten in hetzelfde gebied die verantwoordelijk zijn voor type 3 of type 2A/IC VWD. Derhalve hebben we *in vitro* expressie studies verricht, inclusief immunofluorescentie, met als doel het ziektemechanisme op te helderen. Onze resultaten toonden aan, dat p.Thr274Pro verantwoordelijk is voor het fenotype van de patiënt via een gecombineerd mechanisme van verstoorde synthese, secretie en een verminderd multimerisatie proces.

Het tweede deel van dit proefschrift richtte zich op de karakterisering van type 3 VWD, de zeldzaamste en ernstigste vorm van deze bloedingsziekte. In **Hoofdstuk 5** hebben we onderzocht of de ratio van VWFpp over VWF antigeen (VWF:Ag) en de ratio van FVIII stollingsactiviteit (FVIII:C) over VWF:Ag gebruikt kunnen worden om het pathofysiologische mechanisme van de ziekte vast te stellen. We hebben laten zien, dat de VWFpp/VWF:Ag ratio homozygote/compound heterozygote dragers van een missense variant kan identificeren, zoals ook was beschreven voor type 1 VWD. Bovendien wees de VWFpp/VWF:Ag ratio er ook op, dat de sterk verlaagde VWF concentratie bij deze patiënten op zijn minst gedeeltelijk verklaard wordt uit snellere klaring van VWF uit de circulatie. Daarentegen bleek de FVIII:C/VWF:Ag ratio niet geschikt om dragers van null defecten te onderscheiden van dragers van missense varianten.

Behandeling van type 3 VWD patiënten bestaat uit de toediening van concentraten die plasma VWF of rVWF bevatten. De ontwikkeling van VWF alloantilichamen en/of anafylactische reacties zijn zeldzame maar ernstige bijwerkingen van de substitutietherapie toegepast bij type 3 VWD patiënten.

In **Hoofdstuk 6** is de prevalentie van alloantilichamen tegen VWF in het 3WINTERS-IPS cohort vastgesteld. Vanwege het ontbreken van een goud-standaard is er gekozen voor een indirecte ELISA assay die alle anti-VWF antilichamen kan detecteren en voor een Bethesda-gebaseerde methode die gebruik maakt van de VWF:CB. Anti-VWF alloantilichamen werden vastgesteld in 8,4% van de studie populatie. We hebben bevestigd, dat het ontwikkelen van neutraliserende antilichamen een zeldzame gebeurtenis is met een prevalentie van 6% en dat ze voornamelijk voorkomen bij type 3 patiënten die homozygoot zijn voor null allelen. Twee andere Bethesda-gebaseerde methodes die gebruik maken van ofwel VWF:GPIbM of VWF:Ag ELISA zijn uitgevoerd bij

een subgroep patiënten. Beide methodes waren in staat om VWF remmers te identificeren in een kleiner aantal patiënten. Echter, de VWF:GPIbM gebaseerde Bethesda-methode identificeerde een extra patiënt die negatief getest was voor VWF:CB remmers. Tezamen bevestigden deze gegevens dat de geschatte prevalentie van alloantilichamen tegen VWF sterk beïnvloed wordt door het epitooop waartegen de antilichamen gericht zijn en dat de prevalentie dus afhankelijk is van het type assay dat gebruikt wordt.

Het laatste deel van het proefschrift richtte zich op de vraag of verlaging van de ADAMTS13 activiteit dan wel verandering in het ADAMTS13-VWF evenwicht een mogelijke rol speelt in de pathogenese van DVT.

In **Hoofdstuk 7** hebben we een case-controle onderzoek verricht waarin de associatie tussen plasma ADAMTS13, VWF en FVIII concentraties en DVT is geëvalueerd. We toonden aan dat een geringe daling van ADAMTS13 activiteit geassocieerd is met een matig verhoogd risico op DVT, terwijl we een sterke associatie tussen verhoogde VWF:Ag en FVIII:C spiegels en DVT bevestigden. Interessante bevinding was dat een licht verlaagde plasma ADAMTS13 activiteit in combinatie met een verhoogde VWF spiegel geassocieerd bleek met een sterk verhoogd DVT risico. Deze bevindingen werden verder bevestigd na een sensitiviteitsanalyse waarbij patiënten werden geëxcludeerd waarvan de bloedmonsters binnen drie maanden na de DVT waren verzameld of tijdens antistollingsbehandeling.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 8**, hebben we vervolgens onderzocht of varianten gelokaliseerd in de *ADAMTS13*, *VWF*, en *F8* genen bijdragen aan de veranderde plasma concentraties van deze eiwitten. Met dit doel is een grotere populatie van DVT patiënten en gezonde controles gesequenced met behulp van NGS. We vonden, dat zeldzame varianten van *ADAMTS13* alleen geassocieerd zijn met risico op DVT. Bovendien hadden DVT patiënten die drager zijn van een zeldzame *ADAMTS13* variant een lagere ADAMTS13 activiteit dan patiënten zonder die variant. In tegenstelling waren noch *VWF*, noch *F8* varianten geassocieerd met DVT, hetgeen suggereert dat andere mechanismen verantwoordelijk zijn voor de verhoogde VWF en FVIII plasmaspiegels.

Tot slot bevat **Hoofdstuk 9** een algemene discussie en toekomstperspectieven betreffende de onderwerpen beschreven in dit proefschrift.