



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).

SOMMARIO

Il fattore von Willebrand (VWF) è una glicoproteina multimerica nota per essere coinvolta nell'emostasi primaria, in quanto media l'adesione delle piastrine al sito di danno vascolare, ma anche per il suo ruolo di carrier del FVIII. L'alterazione quantitativa o qualitativa del VWF causa la malattia di von Willebrand (VWD), un disordine emorragico comune. Al contrario, un aumento dei livelli di VWF è risultato essere associato a diversi disturbi trombotici, come la trombosi arteriosa, l'ictus ischemico e trombosi venosa.

In questa tesi è stato discusso il duplice ruolo del VWF sia nelle nel versante emorragico che in quello trombotico, con particolare attenzione alla VWD e alla trombosi venosa profonda (TVP).

Nella prima parte, abbiamo descritto l'approccio utilizzato per eseguire la diagnosi di VWD, compreso l'uso di strumenti *in silico* e di sistemi d'espressione eterologhi per confermare il ruolo causale delle varianti del VWF nell'insorgenza della VWD.

Nel **capitolo 2**, abbiamo descritto l'approccio utilizzato per effettuare una diagnosi differenziale tra VWD di tipo 2A e 2B in un paziente pediatrico portatore di una variante *de novo*. La caratterizzazione biochimica ci ha permesso di escludere la VWD tipo 2M data la perdita dei multimeri ad alto peso molecolare e la ridotta capacità di legare il collagene. La scoperta di una delezione non riportata in letteratura, nonostante la sua localizzazione nel dominio A2, non ha permesso di discriminare tra VWD di tipo 2A e 2B. L'approccio convenzionale prevede l'esecuzione dell'aggregazione piastrinica indotta da ristocetina (RIPA) per discriminare la VWD di tipo 2B dagli altri difetti di tipo 2. Questo test necessita di una quantità relativamente elevata di sangue fresco, soprattutto nel caso di pazienti pediatrici. Pertanto, abbiamo optato per un approccio alternativo utilizzando un ELISA per valutare la capacità del VWF plasmatico di legare la proteina GPIIb/IIIa ricombinante caratterizzata dalla presenza di due mutazioni gain-of-function (VWF:GPIIbM). Questo test, che può essere eseguito utilizzando un volume ridotto di plasma congelato, ci ha portato a confermare che il nostro paziente era affetto da VWD di tipo 2A.

Nei **capitoli 3 e 4**, abbiamo combinato l'uso di strumenti predittivi *in silico* e di sistemi eterologhi per dimostrare il ruolo patogenico delle varianti del VWF identificate nei nostri pazienti VWD. In entrambi i capitoli sono stati eseguiti studi di espressione *in vitro* mediante trasfezione transiente dei vettori di espressione wild-type (WT) e mutati in cellule HEK293. Nel **capitolo 3**, abbiamo valutato l'effetto della variante p.Arg1379Cys, precedentemente associata alla VWD di tipo 1, identificata in cinque pazienti non imparentati. Di questi, uno era stato diagnosticato come affetto da VWD di tipo 1, mentre gli altri quattro avevano una diagnosi di tipo 2M. Quest'ultimi erano anche portatori eterozigoti del polimorfismo p.Ala1377Val, il cui ruolo è stato inizialmente sottovalutato. La valutazione *in silico* ha mostrato che entrambe le varianti destabilizzano il dominio A1, portandoci a ipotizzare un effetto sinergico che si traduce in una ridotta capacità del VWF mutato di legare la GPIIb/IIIa. Abbiamo quindi testato la capacità delle proteine VWF ricombinanti WT, mutati e dell'ibrido di legare la rGPIIb/IIIa

ricombinante in presenza di concentrazioni crescenti di ristocetina. In questo modo, abbiamo potuto confermare che l'effetto sinergico esercitato da queste due varianti è responsabile del fenotipo di tipo 2M dei pazienti.

Il **capitolo 4** descrive la caratterizzazione di due pazienti italiani non imparentati, diagnosticati come affetti da VWD di tipo 1. Entrambi sono risultati portatori eterozigoti della stessa variante p.Thr274Pro localizzata nel propeptide del VWF (VWFpp). Questa variante ha mostrato un effetto dominante negativo in contrasto con quello delle altre varianti trovate nelle sue vicinanze, che erano responsabili della VWD di tipo 3 (recessiva) o della VWD di tipo 2A/IIC.

Pertanto, abbiamo deciso di eseguire uno studio *in vitro* che includeva immunofluorescenza allo scopo di chiarire il meccanismo che causa la malattia. I nostri risultati hanno dimostrato che la p.Thr274Pro è responsabile del fenotipo dei pazienti attraverso un meccanismo combinato che comprende i difetti di sintesi e di secrezione e un processo di multimerizzazione alterato del VWF.

La seconda parte di questa tesi si è concentrata sulla caratterizzazione della VWD di tipo 3, la forma più rara e grave di questa malattia. Nel **capitolo 5** abbiamo valutato se i rapporti tra VWFpp e antigene VWF (VWF:Ag) e tra attività coagulante del FVIII (FVIII:C) e VWF:Ag potessero essere utilizzati per determinare il meccanismo fisiopatologico di questa malattia. Abbiamo dimostrato che il rapporto VWFpp/VWF:Ag è in grado di identificare i portatori omozigoti/eterozigoti composti di varianti missenso, come già descritto per i pazienti con VWD di tipo 1. Il rapporto VWFpp/VWF:Ag suggerisce quindi che i livelli di VWF estremamente ridotti misurati in questi pazienti sono dovuti a una sua rapida eliminazione dalla circolazione. Nei pazienti tipo 1, un rapporto FVIII:C/VWF:Ag aumentato è solitamente riscontrato nei pazienti portatori di un allele nullo ed è quindi indicativo di una ridotta sintesi. Tuttavia, tutti i pazienti tipo 3 avevano un FVIII:C/VWF:Ag incrementato, ma simile indipendentemente dal tipo di difetto genetico.

La terapia dei pazienti con VWD di tipo 3 prevede la somministrazione di concentrati contenenti VWF o VWF ricombinante (rVWF). Lo sviluppo di alloanticorpi contro il VWF e/o di reazioni anafilattiche sono effetti collaterali della terapia sostitutiva rari, ma importanti. Nel **capitolo 6** è stata valutata la prevalenza degli alloanticorpi anti-VWF nella corte del 3WINTERS-IPS. A causa della mancanza di un metodo di riferimento (gold-standard), abbiamo scelto di eseguire un test ELISA indiretto in grado di rilevare tutti gli anticorpi anti-VWF. Per identificare gli anticorpi neutralizzanti (inibitori) abbiamo scelto un metodo basato su Bethesda utilizzando il test che valuta la capacità residua del VWF di legare il collagene, il VWF:CB. Gli alloanticorpi anti-VWF sono stati riscontrati nell'8,4% della popolazione. Abbiamo confermato che lo sviluppo di anticorpi neutralizzanti rappresenta un evento raro (prevalenza del 6%) e si riscontra principalmente nei pazienti di tipo 3 portatori omozigoti di difetti nulli. I pazienti positivi per gli anticorpi anti-VWF sono stati ulteriormente testati con altri due metodi basati su Bethesda, che utilizzano rispettivamente il VWF:GPIIbM e il VWF:Ag ELISA. Entrambi i metodi sono stati in grado

di identificare gli inibitori del VWF in un numero inferiore di pazienti rispetto al metodo basato su Bethesda che utilizza il VWF:CB. Tuttavia, il metodo basato su Bethesda che utilizza VWF:GPIbM ha identificato un ulteriore paziente che era risultato negativo agli inibitori del VWF:CB. Nel complesso, questi dati hanno confermato che la stima della prevalenza è fortemente influenzata dall'epitopo riconosciuto dagli alloanticorpi e quindi dal tipo di test utilizzato.

L'ultima parte della tesi mirava a valutare se la riduzione dell'attività dell'ADAMTS13 e l'alterazione dell'equilibrio ADAMTS13-VWF giocano un ruolo nella patogenesi della TVP. Nel **capitolo 7**, abbiamo condotto uno studio caso-controllo per valutare l'associazione tra i livelli plasmatici dell'ADAMTS13, VWF, FVIII e la TVP. Abbiamo dimostrato che una lieve diminuzione dei livelli di attività dell'ADAMTS13 è associata a un moderato aumento del rischio di TVP, mentre abbiamo confermato la forte associazione tra l'aumento dei livelli di VWF:Ag e FVIII:C e l'aumentato rischio di TVP.

Inoltre abbiamo provato che una leggera riduzione dell'attività dell'ADAMTS13 in combinazione con l'incremento dei livelli plasmatici del VWF porta ad un notevole incremento del rischio di TVP.

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dopo l'esclusione dei pazienti i cui campioni erano stati raccolti a meno di tre mesi dall'evento di TVP e/o durante la terapia anticoagulante.

Successivamente, abbiamo deciso di indagare se le varianti localizzate nei geni ADAMTS13, VWF e F8 potessero contribuire a spiegare i livelli alterati delle rispettive proteine codificate, come descritto nel **capitolo 8**. A tale scopo, una popolazione più ampia di pazienti TVP e di volontari sani è stata sequenziata mediante NGS. Abbiamo confermato che le varianti rare dell'ADAMTS13 sono associate ad un incremento del rischio di TVP. Inoltre, i pazienti con TVP portatori di una variante rara dell'ADAMTS13 presentavano un'attività dell'ADAMTS13 inferiore rispetto ai non portatori. Diversamente, né le varianti rare di VWF né quelle di F8 sono state associate alla TVP, indicando così che altri meccanismi sono responsabili dell'aumento dei livelli plasmatici di VWF e FVIII.

Infine, il **capitolo 9** comprende una discussione generale e prospettive future sugli argomenti descritti in questa tesi.