

Poster P.18.123

FROM COAGULATION TO ANGIOGENESIS: NEW ROLES FOR FVIII IN ENDOTHELIAL FUNCTIONALITY

Olgasi C.*^[1], Famà R.^[1], Walker G.^[1], Cucci A.^[1], Borroni E.^[1], Merlin S.^[1], Borsotti C.^[1], Oliviero S.^[2], Follenzi A.^[1]

^[1]Università del Piemonte Orientale ~ Novara ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Torino ~ Torino ~ Italy

Hemophilia A (HA) is a rare bleeding disorder caused by the absence or dysfunction of FVIII protein (1). Based on its residual activity, there are several degrees of severity and spontaneous bleeding episodes can occur more frequently in severe HA patients (2). These bleedings primarily consist of spontaneous hemarthroses that occur without any clear cause (3). Standard therapies are ineffective in preventing recurrent joint bleedings and hemophilic arthropathy development remain one of the main complications in the management of the HA patients (2-5). Moreover, recent studies evaluated the cardiovascular risk in HA patients evidencing an endothelial dysfunction compared to healthy controls (6). The impairment of vessel stability in HA patients is not understood and the impact of this defect related to the absence or low activity of FVIII as never been explored. Our preliminary data show that in severe HA; the endothelium is more permeable than the healthy controls suggesting a role of FVIII in vessel stability relating to spontaneous bleeding without trauma. We have identified significant differences in our HA and healthy endothelial cell (EC) model systems. HA ECs have altered endothelial features with a reduced tubulogenic and migration potential. RNA-seq and proteomic analyses have revealed that HA and healthy ECs display different gene expression and protein profiles. The impaired phenotype was partially attenuated after transduction of HA-ECs with a lentiviral vector (LV) expressing a short form of FVIII deleted for the B-domain (BDD), suggesting its extra-coagulative role, mainly due to B domain, in enhancing vessel stability. To date, very little is known about the differences in the genetic profile between healthy and hemophilic ECs. Such information is crucial in order to understand if key cell targets are missing in HA patients at the cellular level, thus impairing EC functionality. As the vascular network is indispensable for homeostasis in the human body, it is important to understand if FVIII is crucial for EC survival, stability and migration, which will help, shape the future regenerative therapeutic approaches. To elucidate this extra-coagulative role, we will engineer our EC models by gene editing to generate isogenic cells to analyze the transcriptome, epigenetic status and secretome profile in HA and healthy ECs. These cells will be corrected using LV expressing full-length (FL) or BDD-FVIII under the control of the naïve promoter to dissect the involved molecular targets. Using gene and cell therapy approaches we will investigate whether restored FL-FVIII can improve vessel stability in addition to the bleeding defect in a HA mouse model. Therefore, the study of the extracoagulative role of FVIII can offer new therapeutic gene and cell therapy strategies for the management of HA patients and can pave the way for the development of a combined strategy that can result in a more efficient treatment of HA.

Dalla coagulazione all'angiogenesi nuovi ruoli del FVIII nella funzionalità endoteliale

L'emofilia A (HA) è una patologia rara causata dall'assenza o dalla presenza della proteina del FVIII non funzionante. In base all'attività residua del FVIII, si riconoscono diversi gradi di severità della malattia ed episodi di sanguinamento spontaneo possono essere più frequenti nei pazienti con HA grave. Tali sanguinamenti consistono in emartrosi spontanee che avvengono senza una causa definita. Le terapie standard non hanno effetto nel prevenire i sanguinamenti, pertanto l'artropatia rimane una delle principali complicazioni nel trattamento dei pazienti HA. Inoltre, studi recenti hanno riportato un maggiore rischio cardiovascolare nei pazienti HA rispetto ai sani, evidenziando una disfunzione

endoteliale. La causa della differenza nella stabilità dei vasi nei pazienti HA, rispetto ai sani, non è ancora stata compresa e la correlazione tra i sanguinamenti spontanei e la presenza o la bassa attività del FVIII non è ancora stata studiata. I nostri dati preliminari mostrano come, nei pazienti con HA grave, l'endotelio sia più permeabile rispetto ai sani, suggerendo un ruolo del FVIII nella stabilità dei vasi. Infatti, le endoteliali (EC) degli emofilici hanno una ridotta capacità di formare tubuli ed una minore efficienza nella migrazione rispetto alle EC sane. L'analisi dei geni e delle proteine ha evidenziato differenze significative tra le EC HA e quelle sane. Tale fenotipo è parzialmente attenuato dopo la trasduzione con un vettore lentivirale (VL) usato per l'espressione del FVIII deleto del dominio B nelle endoteliali HA, suggerendo un ruolo extra coagulativo, probabilmente legato al dominio B, nel migliorare la stabilità dei vasi. Al momento le differenze nel profilo genico tra le EC sane ed HA non sono conosciute ma tale informazione potrebbe risultare cruciale nell'identificazione della causa dell'instabilità dei vasi nei pazienti HA. Pertanto per elucidare il ruolo extra coagulativo del FVIII, ingegnerizzeremo le EC sane con gene editing per generare cellule isogeniche ed analizzare il trascrittoma, lo stato epigenetico ed il profilo di secrezione nelle EC HA e sane. Tali cellule saranno, inoltre corrette usando un VL contenente il FVIII-B deleto o la forma completa (FL) sotto il controllo del promotore naturale. Utilizzando approcci di terapia genica e cellulare valuteremo se la reintroduzione del FVIII-FL può portare al miglioramento della stabilità dei vasi oltre alla correzione del difetto di coagulazione in modelli murini di malattia. Pertanto, lo studio del ruolo extra coagulativo del FVIII può offrire nuove strategie terapeutiche nel trattamento dei pazienti emofilici ed aprire la strada per lo sviluppo di strategie combinate di terapia cellulare e genica per migliorare il trattamento dell'emofilia A.

(1) J. Graw, H.-H. Brackmann, J. Oldenburg, R. Schneppenheim, M. Spannagl, and R. Schwaab, "Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 6, no. 6, pp. 488–501, 2005.

(2) J. V. Luck, M. Silva, E. C. Rodriguez-Merchan, N. Ghalambor, C. A. Zahiri, and R. S. Finn, "Hemophilic arthropathy.," *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. p. 12(4):234-45, 2004.

(3) M. L. Simpson and L. A. Valentino, "Management of joint bleeding in hemophilia," *Expert Review of Hematology*. p. 5(4):459-68, 2012.

(4) K. Knobe and E. Berntorp, "Haemophilia and joint disease: pathophysiology, evaluation, and management," *J. Comorbidity*, vol. 1, pp. 51–59, 2011.

(5) S. S. Acharya, R. N. Kaplan, D. Macdonald, O. T. Fabiyi, D. DiMichele, and D. Lyden, "Neoangiogenesis contributes to the development of hemophilic synovitis," *Blood*, vol. 117, no. 8, pp. 2484–2493, 2011.

(6) P. W. Kamphuisen and H. Ten Cate, "Cardiovascular risk in patients with hemophilia," *Blood*. p.123(9):1297-301, 2014.

Emofilia A

Coordinator: Antonia Follenzi

Partner: Salvatore Oliviero

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

Telethon Project (nr):

GGP19201

Disease Name:

Hemophilia A

Keywords:

Hemophilia A, endothelial cells, vessel stability