

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/23252> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Bijkerk, Roel

Title: MicroRNAs in kidney health and disease

Issue Date: 2014-01-29

Chapter

9

Nederlandse samenvatting

Curriculum Vitae

Dankwoord

List of publications

Samenvatting

Nierziekten zijn een veel voorkomende aandoening welke tot 10% van de bevolking treft en dit aantal is snel groeiend. Chronisch nierfalen treedt op wanneer aandoening als diabetes, hoge bloeddruk, ontstekingen of toxische substanties op den duur tot nierschade leiden. De patient heeft dan niervervangende therapie nodig in de vorm van dialyse of niertransplantatie, procedures die niet succesvol zijn op lange termijn (dialyse) of niet altijd beschikbaar (transplantatie). Omdat microRNAs (miRNAs), die betrokken zijn in posttranscriptionele genregulatie, belangrijk lijken te zijn in praktisch alle biologische processen is het niet langer de vraag of miRNAs betrokken zijn bij nierschade en herstel, maar actueel is welke essentiële processen ze moduleren. Om deze reden zouden miRNAs interessante targets voor therapeutische interventie kunnen zijn. In dit proefschrift zijn studies beschreven die een rol voor miR-155, -126 and -132 beschrijven in de context van nierfunctie.

Hoofdstuk 1 geeft algemene achtergrondinformatie met betrekking tot de prevalentie van nierziekten en het functioneren van de nier in het algemeen. Ook wordt de evolutie en nefrogenese van de nier beschreven, welke als achtergrond dienen voor studies die beschreven zijn in dit proefschrift. Daarnaast wordt de biogenese van miRNAs samengevat gevolgd door een beschrijving van de werking van miRNAs en een korte overview van de relevantie van miRNAs in nierfunctie.

In **Hoofdstuk 2** hebben we de rol van miRNAs, met name miR-155, onderzocht in endotheel-mesenchymale transitie (EndoMT), waarvan wordt gedacht dat het betrokken kan zijn bij het verlies van microvasculaire capillairen in de pathofysiologie van fibrose en orgaanfalen. In EndoMT, endotheelcellen (EC) ondergaan een mesenchymale transitie geassocieerd met het verlies van cel-cel contacten en het verkrijgen van een ‘synthetisch’, contractiel fenotype. In een TGF- β afhankelijk *in vitro* model voor EndoMT hebben we miRNAs geïdentificeerd die differentieel tot expressie kwamen onder normoxische en hypoxische condities. Hierbij werd miR-155 geïdentificeerd als significant opgereguleerd in EndoMT, een effect dat toenam bij hypoxia, wat zelf bijdraagt aan EndoMT. Het blokkeren van miR-155 verhoogde RhoA expressie en activiteit in EC en had invloed op fosforylering van downstream LIMK. MiR-155 overexpressie leidde tot vermindering van RhoA functie. Gebruik makend van een Rho kinase inhibitor konden we EndoMT gedeeltelijk onderdrukken, wat benadrukt dat RhoA een centrale rol speelt

in EndoMT. Overexpressie van miR-155 leidde tot het volledige EndoMT proces blokkeren in vergelijking tot controle cellen, zoals blijkt uit het behoud van EC karakteristieken en de afwezigheid van een mesenchymaal fenotype. Deze data demonstreren dat miR-155 als een negatieve regulator functioneert van RhoA in TGF- β geïnduceerde endotheel-mesenchymale transitive.

Gebaseerd op de ‘seed sequence’ kan voorspeld worden dat miR-126 naast angiogenese (zoals we eerder aangetoond hebben) ook in arteriogenese een rol speelt door middel van regulatie van de expressie van stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). In **Hoofdstuk 3** werd dit onderzocht. Door middel van miR-reporter constructen hebben we gevalideerd dat miR-126 in EC *in vitro* inderdaad SDF-1 expressie inhibeert. Vervolgens onderzochten we de potentiële relevantie hiervan voor de mobilizatie van progenitor cellen. Daarvoor bekeken we de migratie van humane CD34+ progenitor cellen naar chemotactische factoren in endotheel cel-geconditioneerd medium. Antagomir-geïnduceerd inhiberen van miR-126 verhoogde SDF-1 expressie in ‘human umbilical vein endothelial cells’ en stimuleerde migratie van de CD34+ cellen. In het eerder genoemde muismodel voor ischemie in de achterpoot konden we een sterke toename in circulerende Sca-1+/Lin- progenitor cellen waarnemen in antagomir-126 behandelde muizen in vergelijking tot scramblemir behandelde controle muizen. Immunohistochemische kleuring van de capillairen in de post-ischemische kuitspier toonden een verhoging aan van SDF-1 expresserende CD31-positieve capillairen als gevolg van miR-126 inhibitie, terwijl in gezonde controle muizen dit mobilizatie effect door middel van miR-126 inhibitie niet kon worden aangetoond. Kortom, miR-126 kan SDF-1 expressie reguleren in EC. In de context van een ischemisch event leidt systemische miR-126 inhibitie tot mobilizatie van Sca-1+/Lin- progenitor cellen naar de perifere circulatie, potentieel ten gevolge van verhoogde SDF-1 expressie door endotheel cellen die aanwezig zijn in ischemisch weefsel.

Ischemie/reperfusie schade (IRI) is een centraal fenomeen in niertransplantatie. Het managen van de effecten van nier IRI is cruciaal voor korte- en lange termijn overleving van de getransplanteerde nier na transplantatie. Het peritubulaire capillaire netwerk zou zeer goed de centrale factor kunnen zijn in het herstel na IRI. Naar aanleiding van onze eerdere bevindingen dat miR-126 een centrale rol speelt in vasculaire integriteit, hebben we in **Hoofdstuk 4** onderzocht of overexpressie van miR-126 in beenmerg cellen kan helpen bij het herstel na IRI. Met behulp van een lentiviraal construct hebben we miR-126 tot overexpressie gebracht in beenmerg cellen. Vervolgens werden deze



cellen geïnjecteerd in lethaal bestraalde muizen. Acht weken na reconstitutie van het beenmerg ondergingen de muizen bilaterale nier IRI. We vonden functionele bescherming tegen IRI door overexpressie van miR-126 zoals aangetoond met verlaagde ureum levels. Bovendien waren schademarkers Kim-1 en NGAL lager. Deze bescherming was geassocieerd met verhoogde capillaire dichtheid en een toegenomen influx van beenmerg afkomstige cellen. We demonstreerden dat een verhoogd aantal endotheel cellen afkomstig zijn uit het beenmerg, een observatie kloppend met de verhoging in circulerende hematopoietische stam- en progenitorcellen. We hebben aangetoond dat miR-126 CXCR4 expressie verlaagt op deze cellen, welke een stimulus is om in het beenmerg te blijven, waardoor deze cellen dus makkelijker migreren uit het beenmerg. We bevestigden de vasculaire rol van hematopoietische miR-126 in een matrigel assay, waarin overexpressie van miR-126 resulteerde in verhoogde neovascularizatie. Deze bevindingen suggereren dat overexpressie van miR-126 in het hematopoietische compartiment beschermt tegen nier ischemie/reperfusie schade door stimulatie van hematopoietische progenitor cel mobilizatie wat leidt tot een verbetering van de microvasculatuur in de nier.

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we de rol van miRNAs in fibrose met een focus op de formatie van myofibroblasten. Lineage analyse heeft aangetoond dat, tijdens nefrogenese, FoxD1-positieve mesenchymale cellen uitgroeien tot volwassen interstitiele pericyten. Deze FoxD1-afkomstige interstitiele cellen delen tot en differentieren naar smooth muscle actin (α -SMA) positieve myofibroblasten tijdens nierfibrose en nemen daarmee een grote meerderheid van de myofibroblasten voor hun rekening, welke verantwoordelijk zijn voor littekenweefselvorming in fibrotische nierziekten. MiRNAs betrokken bij deze differentiatie zouden als target kunnen dienen om myofibroblast formatie tegen te gaan. Om differentieel tot expressie komende miRNAs te identificeren hebben we nierfibrose geïnduceerd in FoxD1-GC;Z/Red muizen door middel van unilaterale ureter obstructie (UUO), waarna miRNAs geprofiled zijn in FoxD1-afkomstige interstitiele cellen (dsRed positief) die geïsoleerd waren met FACS sorting uit zowel fibrotische als gezonde nieren. MiR-132 was één van de meest opgereguleerde miRNAs in deze cellen in fibrotische nieren. *In vitro* hebben we aangetoond dat miR-132 inhibitie resulteert in reductie van myofibroblast marker α -SMA en verhoging van bekend target Sirt1 en downstream cyclooxygenase-2 (Cox2). *In vivo* miR-132 inhibitie in het UUO nierfibrose model leidde na 10 dagen tot een ~35% verlaging van collageen depositie in vergelijking tot scramble-miR controles, terwijl er nog geen verschil waargenomen werd na 5 dagen. Daarnaast demonstreren

immunohistochemische analyses dat het aantal α -SMA positieve cellen vergelijkbaar afneemt, wat bevestigd wordt door zowel western blot als qRT-PCR analyses. Echter, geen verschil in capillaire dichtheid werd waargenomen en verrassenderwijs was miR-132 inhibitie geassocieerd met verlaagde Sirt1 levels. We hebben echter wel aangetoond dat het remmen van miR-132 anti-proliferatieve effecten heeft wat suggereert dat miR-132 een belangrijke rol speelt in de proliferatie van myofibroblasten.

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we een rol voor miR-132 in water reabsorptie. De collecting duct cellen van onze nieren zijn kritiek in deze reabsorptie en homeostase van waterlevels in het bloed, daar het binden van vasopressine (anti-diuretisch hormoon) aan de V2-receptor en de daaropvolgende translocatie van Aquaporin-2 (AQP2) waterkanaaltjes naar het apicale membraan de waterbalans fine-tunen. Cox2 produceert prostaglandines zoals PGE2, waarvan bekend is dat deze de vasopressine functie in collecting duct cellen tegenwerkt door het induceren van internalizatie en lysosomale degradatie van AQP2. Gebruik makend van miR-reporter constructen hebben we Cox2 geïdentificeerd als directe target van miR-132. Remmen *in vitro* van miR-132 in zowel collecting duct cellen als fibroblasten resulteerde in opregulatie van Cox2. MiR-132 inhibitie *in vivo* in muizen leidde tot een verhoging in PGE2 productie door de nier, zoals aangetoond door verhoogde PGE2 levels in de urine, in combinatie met een onderdrukte AVP respons. Daaruitvolgend was translocatie van AQP2 naar het apicale membraan in collecting duct cellen verstoord. Dit resulteerde uiteindelijk in acute diurese en gewichtsverlies. Deze data demonstreert een essentiële rol voor miR-132 in de waterhuishouding.

Tenslotte geeft **Hoofdstuk 7** een beschouwing van alle studies beschreven in dit proefschrift en plaatst deze in een breder perspectief met betrekking tot de huidige kennis.

