

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/19855> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Solingen, Coen van

Title: The role of microRNA-126 in vascular homeostasis

Date: 2012-09-26

Nederlandse samenvatting

Achtergrond

In dit proefschrift zijn studies beschreven waarin de rol van microRNA-126 in de biologie van de vaatwand is onderzocht. Toen dit project startte in november 2006 was het enige dat was gerapporteerd over deze microRNA dat het in grote hoeveelheden voorkwam in de cellen die de vaatwand bedekken (het endotheel). Verder bleek microRNA-126 erg goed geconserveerd te zijn tussen verschillende diersoorten, wat een indicator kan zijn van een relevante rol in de biologie.

Aanvankelijk werd gedacht dat microRNA-126 alleen maar aanwezig was in het endotheel, maar inmiddels is duidelijk geworden dat deze microRNA ook voorkomt in het epitheel van de longen, circulerende hematopoietische (stam)cellen en bloedplaatjes. Heel recentelijk zijn zelfs 'losse' microRNA-126 moleculen gedetecteerd in het bloed. Een exacte rol voor deze vrij circulerende microRNAs is onduidelijk, maar aangezien hun kwantitatieve aanwezigheid is gerelateerd aan verscheidene risicofactoren van hart- en vaatziekten kunnen ze wellicht dienen als nieuwe biomarkers.

Een functionele rol voor microRNA-126 was onbekend totdat duidelijk werd dat microRNA-126 kan binden aan het messenger RNA (mRNA) van vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) en dat deze binding leidt tot een verandering van de functie van dit eiwit *in vitro*. Kort daarop werd aangetoond dat, wanneer de expressie van microRNA-126 werd voorkomen, zowel in muizen als zebrafissen de vasculaire ontwikkeling sterk was verstoord. Mede uit onderzoek beschreven in dit proefschrift bleek dat de functionele remming van microRNA-126 in volwassen muizen ervoor zorgt, dat in deze dieren de angiogene respons op hypoxie volledig is gestoord.

Inmiddels is er een aantal vasculaire pathways bekend waarin microRNA-126 een belangrijke rol speelt. MicroRNA-126 kan, onder andere, binden aan mRNAs die een sleutelrol spelen in angiogenese, vasculogenese en een ontstekingsreactie. In **Hoofdstuk 2** wordt de huidige kennis over de biologie van microRNA-126 in detail besproken.

Het remmen van microRNAs *in vitro* en *in vivo*

In **Hoofdstuk 3** is beschreven dat microRNA-126 voornamelijk voorkomt in de endotheelcellen van de capillairen en arteriolen in de nier. Om de functionele rol van microRNA-126 te bestuderen hebben we gezocht naar een manier om specifiek deze microRNA te remmen. In de literatuur zijn verscheidene manieren beschreven om de functie van microRNAs te remmen. In de experimenten beschreven in dit proefschrift hebben wij voornamelijk gebruik gemaakt van zogenaamde antagomirs. Deze antagomirs hebben een nucleotidevolgorde complementair aan een target-microRNA. Tevens is de affiniteit met de complementaire RNA-structuren en de stabiliteit van de antagomirs *in vivo* verbeterd door toepassing van gemodificeerde nucleotiden. Van groot belang voor de werkzaamheid van antagomirs is de conjugatie van het oligonucleotide met een

cholesterolmolecuul. Dit molecuul zorgt ervoor dat vrijwel alle lichaamscellen de antagomirs gemakkelijk opnemen. Eenmaal in de cel inactieveert de antagomir het complementaire target-microRNA door het vormen van een stabiele hybride.

In **Hoofdstuk 3, 4 en 5** beschrijven we dat antagomir-126 een effectief hulpmiddel is om de functie van microRNA-126 in de endotheelcellen van muizen te achterhalen. De resultaten beschreven in deze hoofdstukken suggereren dat antagomirs wellicht ook voor therapeutische doeleinden zouden kunnen worden gebruikt.

MiRNA-126 en angiogenese

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we dat microRNA-126 een rol speelt in de angiogene respons bij hypoxie. Muizen die behandeld werden met antagomir-126 en waarvan vervolgens de dijbeenslagader operatief was verwijderd, reageerden met een verminderde ingroei van capillairen naar het hypoxische gebied in de kuitspier. Verder was er minder endotheliale uitgroei te zien bij aorta's van de dieren, die *ex vivo* waren gegroeid in een petrischaaltje. Rond hetzelfde moment dat wij dit onderzoek ter publicatie aanboden, kwamen er twee publicaties uit die de rol van microRNA-126 in angiogenese beschreven en onze hypothesen aangaande de betrokken mechanismen bevestigden.

Spred-1 en PI3KR2 spelen een negatieve sleutelrol in groeifactorgeïnduceerde angiogenese. De synthese van deze eiwitten blijkt door microRNA-126 te worden geremd. Bij remming van microRNA-126, door het gebruik van antagomir-126, worden deze twee eiwitten in hoge mate tot expressie gebracht. Hierdoor is de vascular endothelial growth factor (VEGF) gemedieerde signaaltransductie geremd en blijft de angiogene respons van het endotheel achterwege. Uit deze studies blijkt dat microRNA-126 een facilitaire rol speelt bij angiogenese, mede door het in bedwang houden van de expressie van deze twee remmende eiwitten.

De angiogene rol van microRNA-126 wordt verder uit de doeken gedaan in **Hoofdstuk 7**, hier beschrijven we dat deze functie verder reikt dan alleen in endotheelcellen. In deze studie hebben we microRNA-126 tot overexpressie gebracht in beenmergcellen en vervolgens gebruikt voor een beenmergtransplantatie in subletaal bestraalde muizen. Het was mogelijk deze getransduceerde cellen te gebruiken om het beenmerg van deze bestraalde muizen te reconstitueren. Om vervolgens de bijdrage te bestuderen van het hematopoietische systeem aan neovascularisatie, hebben we bij deze dieren een angiogene matrigelplug onder de huid ingebracht. In de pluggen van muizen die beenmergcellen hadden ontvangen die microRNA-126 tot overexpressie brachten zagen we meer capillaire ingroei dan in de pluggen van muizen die beenmergcellen zonder extra microRNA-126 ingespoten hadden gekregen. Op het moment van schrijven hebben we nog geen exact mechanisme vastgesteld dat zorgt voor deze bijdrage, wel ontdekten we dat in de circulatie van de 'microRNA-126

overexpressie-dieren' veel meer witte bloedcellen waren terug te vinden. Aangezien microRNA-126 werkt op de pathways die te maken hebben met de mobilisatie van cellen vanuit het beenmerg, is het mogelijk dat de overexpressie van microRNA-126 ten grondslag ligt aan de vermeerdering van deze cellen in het bloed. Gezien de vele publicaties over de rol van witte bloedcellen bij neovascularisatie, is het tevens aannemelijk dat de verbeterde neovascularisatie van de plug is toe te schrijven aan de kwantitatieve bijdrage van de witte bloedcellen.

In de herfst van 2011 is er nog een tweede beenmergtransplantatieonderzoek in combinatie met een ischemie/reperfusie schademodel in de nieren gestart. Hopelijk kan deze studie nieuw inzicht verschaffen in de rol van microRNA-126 bij stamcelmobilisatie, neovascularisatie en schadeherstel.

MicroRNA-126 en vasculogenese

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 3 en 7** is er een duidelijke rol voor microRNA-126 in angiogenese. Zowel in het endotheel als in beenmergcellen draagt de expressie van microRNA-126 bij aan de integriteit van het vasculaire systeem. In **Hoofdstuk 4** benadrukken we een andere rol van microRNA-126 in de vasculaire biologie. Hier laten we zien dat microRNA-126 ook een rol speelt bij de ischemie/reperfusie geassocieerde mobilisatie van stam- en progenitorcellen. Deze verhoging van stamcellen in het bloed ging gepaard met een verhoging van stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) in het bloed, alsmede met een verhoging van SDF-1-expressie in de ischemische kuitspier. De rol van microRNA-126 bij de mobilisatie van stamcellen is ook onderzocht in een humane *in vitro* setting. Ook hier konden we aantonen dat er een link bestaat tussen het uitschakelen van microRNA-126 en de verhoogde expressie van SDF-1 in het endotheel.

De *in vivo* remming van microRNA-126 leidt tot een verminderde angiogene capaciteit aan de ene kant, maar tot een verhoogde stamcelmobilisatie aan de andere kant. Deze conclusie ondersteunt het belang van microRNA-126 in de vasculaire homeostase. Onze huidige werkhypothese stelt dat, in de aanwezigheid van microRNA-126, re-endothelialisatie plaats kan vinden middels de proliferatie van lokale mature endotheelcellen in een proces dat lijkt op angiogenese. Echter, bij endotheelcel-dysfunctie of verlaging van microRNA-126 zal vaatwandherstel van een VEGF-afhankelijk angiogeen proces overgaan naar een SDF-1-afhankelijk vasculogeen proces; de mobilisatie van circulerende myeloïde of vasculaire progenitorcellen.

MicroRNA-126 en ontsteking

Een lokale ontstekingsreactie leidt tot activatie van het endotheel en vervolgens tot de expressie van adhesieve eiwitten die het mogelijk maakt dat ontstekingscellen kunnen hechten. Deze cellen kunnen dan via het endotheel migreren in de richting van de bron van de ontsteking. Een van de belangrijkste

endotheliale adhesiereceptoren is vascular endothelial adhesion molecule-1 (VCAM-1), een gevalideerde target van microRNA-126. In **Hoofdstuk 5** beschrijven we dat, in de nier, VCAM-1 niet in alle microvasculaire vaatbedden in dezelfde mate tot expressie komt. Na de experimentele inductie van een inflammatoire respons met behulp van tumor necrosis factor- α (TNF α) zagen we dat VCAM-1 wel tot expressie kwam in het arterielaire endotheel van de nier, maar niet in de glomerulaire capillairen. Door met behulp van laser-capture-microdissectie endotheelcellen te isoleren van zowel de glomeruli als de arteriolen, bleken beide celsoorten, na TNF α -behandeling, vergelijkbare hoeveelheden VCAM-1-mRNA tot expressie te brengen. Posttranscriptionele regulatie van VCAM-1 door microRNA-126 was een reële verklaring voor de heterogene inflammatoire respons van het renale vaatbed. In **Hoofdstuk 5** hebben we deze hypothese bevestigd door wederom met antagomir-126 de functie van microRNA-126 te remmen en vervolgens bij deze muizen een ontstekingsreactie te starten met TNF α . Het bleek dat in dit geval VCAM-1 wel tot expressie kwam in de endotheelcellen van zowel de glomeruli als de arteriolen.

Uit deze studie blijkt dat microRNAs, zoals microRNA-126, een belangrijke rol kunnen spelen bij de vaatbedspecificatie van het nier-endotheel.

Toekomstperspectief

In dit proefschrift zijn enkele 'vasculaire' functies van microRNA-126 beschreven. MicroRNA-126 speelt een belangrijke rol in endotheelcellen waar het de expressie reguleert van eiwitten die van belang zijn in angiogenese, vasculogenese en ontsteking. Verder is beschreven dat microRNA-126 tot expressie komt in beenmergcellen en bloedplaatjes. Een overexpressie van deze microRNA leidt in beenmergcellen tot een verbeterde angiogenese en de aanwezigheid van microRNA-126 in plaatjes en in de circulatie kan wellicht als biomarker dienen voor de diagnose van de impact van cardiovasculaire risicofactoren op de vaatwand.

Tot op heden is het echter nog onduidelijk welke processen vooraf gaan aan de expressie van microRNA-126. Een aantal studies heeft aangetoond dat de binding van de transcriptiefactoren Ets-1 en Ets-2 en de stroming van het bloed kunnen leiden tot een verhoogde expressie van microRNA-126 in het endotheel. Het is echter onbekend of extra- en intracellulaire factoren, die leiden tot de activatie van het endotheel, vervolgens ook kunnen leiden tot een verhoogde (of verlaagde) expressie van microRNA-126. Om de rol van microRNA-126 in de vasculaire biologie in zijn totaliteit te kunnen begrijpen is het van belang dat er onderzoek wordt gedaan naar de moleculaire mechanismen die de expressie van microRNA-126 moduleren. Wanneer dit bekend is, kan het onderzoek zich verbreden door deze moleculaire mechanismen (proberen) te koppelen aan risicofactoren. In de toekomst is het dan wellicht mogelijk om therapeutische mogelijkheden te ontwikkelen die via microRNA-mechanismen kunnen bijdra-

gen aan het gezond houden van het endotheel.