



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The role of 14q32 microRNAs in vascular remodelling**

Welten, S.M.J.

### **Citation**

Welten, S. M. J. (2017, March 9). *The role of 14q32 microRNAs in vascular remodelling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/47467>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/47467>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/47467> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Welten, S.M.J.

**Title:** The role of 14q32 microRNAs in vascular remodelling

**Issue Date:** 2017-03-09

## Nederlands Samenvatting

## Introductie

Hart- en vaatziekten is een algemene term voor aandoeningen aan het hart en de bloedvaten. Hieronder vallen ziekten die een vernauwing van de bloedvaten tot gevolg hebben, zoals coronair vaatlijden (bij bloedvaten rondom het hart), cerebrovasculaire ziekten (bij bloedvaten in de hersenen) of perifeer vaatlijden (bij bloedvaten in de benen). De meest voorkomende oorzaak voor hart- en vaatziekten is atherosclerose of aderverkalking. Aderverkalking ontstaat doordat er in de loop van de jaren ophopingen (plaques) van cholesterol en ontstekingscellen verzamelen in de vaatwand. Dit leidt tot vernauwingen en uiteindelijk zelfs tot afsluitingen van de bloedvaten die de hersenen, hart of ledematen van bloed voorzien.

Patiënten met hart- en vaatziekten zijn erbij gebaat dat deze vernauwingen worden behandeld zodat de bloedtoevoer naar achterliggende weefsels weer hersteld wordt. Naast een gezonde levensstijl en de behandeling met medicijnen die de bloeddruk en het cholesterol verlagen, zijn er verschillende mogelijkheden om deze patiënten te behandelen. Dotteren is het oprekken van een bloedvat door middel van een ballonnetje. Hierdoor wordt de plaque weggedrukt en kan er weer bloed door het bloedvat stromen. Om te voorkomen dat het bloedvat na het oprekken weer terugveert, wordt er meestal een stent geplaatst. Een nadeel van deze ingreep is dat het dotteren leidt tot beschadiging van de vaatwand. Hierdoor ontstaat er een ontstekingsreactie waardoor de atherosclerotische plaque weer snel terug kan komen. Dit noemt men restenose. Een andere behandelmogelijkheid is een bypass operatie. Bij deze operatie wordt er door middel van een ander bloedvat een omleiding om de vernauwing geplaatst. Maar ook zo'n omleiding gaat bij sommige patiënten helaas snel weer dicht zitten.

Een alternatieve manier om de bloedstroom in patiënten te herstellen is door de vorming van bloedvaten door het lichaam zelf te stimuleren. Hierdoor ontstaan er 'natuurlijke' bypasses of omleidingen, zonder dat de patiënt geopereerd hoeft te worden. De vorming van nieuwe bloedvaten noemen we neovascularisatie. Er zijn verschillende manieren waarop bloedvaten kunnen ontstaan. Angiogenese en arteriogenese zijn de twee belangrijkste vormen van neovascularisatie. Bij angiogenese ontstaan er nieuwe bloedvaten uit bestaande bloedvaten. Angiogenese vindt plaats in gebieden met weinig zuurstof, zogenaamde ischemische gebieden. Bij arteriogenese ontstaan er geen nieuwe bloedvaten maar groeien bestaande kleine bloedvaten uit tot grote bloedvaten (collateralen). Deze collateralen kunnen meer bloed vervoeren dan de kleine bloedvaten.

Vaatwand remodellering is de algemene term waarmee processen beschreven worden die een verandering in de vaatwand (en vaak ook de bloedstroom) tot gevolg hebben. Hieronder vallen dus arteriogenese en angiogenese, maar ook atherosclerose en restenose.

MicroRNAs zijn kleine, niet-coderende RNA moleculen die de expressie van vele genen kunnen reguleren. Eén enkel microRNA kan de expressie van zijn targetgenen verlagen en op die manier complexe, fysiologische processen aansturen. Zo kunnen microRNAs ook processen van vaatwand remodellering reguleren. In dit proefschrift is de rol van één specifiek cluster van microRNAs, het 14q32 microRNA cluster, in vaatwand remodellering onderzocht.

## Dit proefschrift

Het doel van dit proefschrift was om de rol van één specifiek microRNA cluster, welke in mensen gelegen is op chromosoom 14 (14q32; chromosoom 12F1 in muizen), in vaatwand remodellering te onderzoeken. MicroRNAs spelen een belangrijke rol bij vaatwand remodellering en eerdere studies hebben de rol van microRNAs in de pathofysiologie van deze processen beschreven. In **Hoofdstuk 2**

wordt een overzicht gegeven van de multifactoriële aard van microRNAs in processen van vaatwand remodelling. MicroRNAs kunnen de expressie van vele genen reguleren die belangrijk zijn voor vaatwand remodelling en op die manier veranderingen in de vaatwand stimuleren of remmen. Bij processen van vaatwand remodelling liggen vaak dezelfde onderliggende mechanismen en factoren ten grondslag. Dit is in het verleden aangetoond door de observatie dat interventies bedacht om arteriogenese te stimuleren, ook leidden tot het stimuleren van atherosclerose en andersom. Dit betekent dat meerdere processen van vaatwand remodelling beïnvloed zouden kunnen worden door hetzelfde microRNA. In Hoofdstuk 2 worden de microRNAs besproken die beschreven zijn een rol te spelen in minstens twee van de volgende processen: atherosclerose en/of restenose, angiogenese en/of arteriogenese en aneurysma vorming. De microRNAs die in dit hoofdstuk besproken worden zijn de individuele microRNAs miR-126 en miR-155 en de microRNA clusters 17-92, 23/24/27, 143/145 en 14q32. Het is interessant om op te merken dat enkele microRNAs waarvan beschreven is dat ze neovascularisatie stimuleren na ischemie, ook een remming van plaque formatie lieten zien in modellen voor atherosclerose. Deze eigenschap maakt die specifieke microRNAs een geschikte kandidaat als target voor de behandeling van cardiovasculaire ziekten.

### 14q32 microRNAs in vaatwand remodelling

In **Hoofdstuk 3** wordt de rol van 14q32 microRNAs in neovascularisatie na ischemie onderzocht. Om microRNAs te identificeren die een rol kunnen spelen bij post-ischemische neovascularisatie hebben wij gebruik gemaakt van een 'Reverse Target Prediction' model. Hiertoe zijn wij begonnen met het opstellen van een lijst met genen waarvan al bekend was dat ze een rol spelen in post-ischemische neovascularisatie (zowel arteriogenese als angiogenese). MicroRNAs binden aan specifieke locaties van hun target genen, de zogenaamde 3' untranslated region (3'UTR). Vervolgens hebben we bepaald welke microRNAs een mogelijke bindingsplaats voor deze genen hadden. Voor meerdere microRNAs van het 14q32 microRNA cluster vonden we een verrijking van voorspelde bindingsplaatsen in neovascularisatie-gerelateerde genen. In een *in vivo* muismodel voor neovascularisatie, waarbij ligatie van de arteria femoralis plaatsvindt, hebben wij de expressie van 14q32 microRNAs over de tijd vervolgd. MicroRNAs van het 14q32 cluster volgden drie verschillende expressie patronen tijdens neovascularisatie. De 14q32 microRNAs kunnen onderverdeeld worden in vroege responders, late responders en non-responders. Vroege responders waren binnen 24 uur na ligatie van de arteria femoralis opgereguleerd. Late responders werden pas 72 uur na ligatie opgereguleerd, terwijl non-responders niet gereguleerd werden. Drie microRNAs, onder andere miR-329 (late responder), miR-494 (vroege responder) en miR-495 (non-responder), werden geselecteerd voor verder onderzoek op basis van hun expressie patroon en het aantal voorspelde neovascularisatie targetgenen. Als vierde microRNA werd miR-487b geselecteerd voor verder onderzoek, aangezien wij in een eerdere studie hebben laten zien dat dit microRNA een belangrijke rol speelt tijdens vaatwand remodelling van de aorta vaatwand.

De geselecteerde microRNAs werden vervolgens geremd door middel van zogenaamde Gene Silencing Oligonucleotides (GSOs). GSOs zijn een type microRNA-remmer, bestaande uit twee synthetische DNA strengen die omgekeerd complementair zijn aan het volwassen microRNA van interesse. GSOs werden geïnjecteerd in muizen 24 uur voordat dubbele ligatie van de arteria femoralis (achterpoot ischemie model) plaatsvond. Met behulp van fluorescent gelabelde GSOs hebben wij laten zien dat dit type microRNA-remmer in het spierweefsel van de aangedane achterpoot komt. Eén enkele injectie met GSOs tegen miR-329, miR-487b, miR-494 en miR-495 resulteerde in een beter en versneld herstel van de bloedtoevoer naar de achterpoot in vergelijking met controle dieren. Zowel arteriogenese als angiogenese werden gestimuleerd in de spierweefsels van GSO-behandelde muizen. Daarnaast

hebben wij *in vitro* en *in vivo* de regulatie van meerdere neovascularisatie targetgenen laten zien na microRNA remming. Tenslotte hebben wij *in vitro* bevestigd dat remming van 14q32 microRNAs miR-329, miR-487b, miR-494 en miR-495 leidt tot meer angiogenese en meer proliferatie van vasculaire celtypen.

Deze data bevestigen een rol voor 14q32 microRNAs miR-329, miR-487b, miR-494 en miR-495 in post-ischemische neovascularisatie en bieden mogelijke therapeutische targets om neovascularisatie te stimuleren.

Het is bekend dat het stimuleren van arteriogenese en angiogenese gepaard gaat met een inflammatoire reactie. Inflammatie is ook een belangrijk proces bij atherosclerose. In het verleden is aangetoond dat factoren die post-ischemische neovascularisatie stimuleren, ook de vorming van atherosclerotische plaques stimuleren. Dit ongewenste effect is beter bekend als het 'Janus fenomeen', refererend aan de gelijknamige Romeinse god met twee gezichten. Dit fenomeen is een ongewenst effect voor de ontwikkeling van therapieën die bedoeld zijn om de bloedtoevoer in patiënten met coronair of perifere vaatlijden te herstellen (de andere kant van de medaille). Met behulp van dezelfde 'Reverse Target Prediction' methode zoals beschreven in Hoofdstuk 3, hebben wij in **Hoofdstuk 4** gezocht naar microRNAs die een rol spelen bij het ontstaan van atherosclerose. Wij observeerden wederom een groot aantal voorspelde bindingsplaatsen in atherosclerose-gerelateerde genen voor microRNAs van het 14q32 cluster. Vervolgens hebben wij, zoals beschreven in Hoofdstuk 3, de expressie van een aantal dezelfde 14q32 microRNAs, miR-329, miR-494 en miR-495, gemeten in humane atherosclerotische plaques. De expressie van vooral miR-494 was hoog in de atherosclerotische plaques, voornamelijk in plaques met een onstabiel fenotype. Daarnaast was miR-494 duidelijk aanwezig in verschillende organen van de muis die belangrijk zijn voor atherosclerose. MiR-494 werd daarom geselecteerd voor verder onderzoek in atherosclerose. Om dit te bestuderen werd de vorming van atherosclerotische plaques geïnduceerd in ApoE<sup>-/-</sup> muizen. Remming van miR-494 in deze muizen resulteerde in kleinere atherosclerotische plaques in vergelijking met controle muizen. Nog belangrijker is dat deze atherosclerotische plaques stabielere waren. Dit is gunstig aangezien stabiele plaques een kleinere kans hebben om te scheuren en zo de slagader af te sluiten. Remming van miR-494 zorgde verder voor een verlaging van het cholesterol in de behandelde dieren en leidde tot opregulatie van meerdere voorspelde target genen *in vivo*.

In deze studie laten wij zien dat remming van miR-494, waarvan we in een eerdere studie hebben laten zien dat dit post-ischemische neovascularisatie stimuleert, niet leidt tot een verergering van atherosclerose maar in plaats daarvan leidt tot kleinere en stabielere atherosclerotische plaques.

In **Hoofdstuk 5** hebben we de rol van 14q32 microRNAs miR-329, miR-494 en miR-495 in restenose onderzocht, ook een proces van vaatwand remodelering. Restenose bestaat uit door twee processen: intimale hyperplasie en versnelde atherosclerose. Intimale hyperplasie wordt gekarakteriseerd door veranderingen in de extracellulaire matrix, proliferatie van gladde spiercellen en inflammatie. Daarbovenop wordt versnelde atherosclerose waargenomen, voornamelijk onder hypercholesterolemische condities. Op basis van de studies beschreven in Hoofdstuk 3 en 4 verwachtten wij dat remming van 14q32 microRNAs tot minder restenose zou leiden in experimentele muis modellen. Intimale hyperplasie werd daarom bestudeerd in C57BL/6 muizen behandeld met GSOs tegen miR-329, miR-494 en miR-495. Remming van miR-495 zorgde voor minder intimale hyperplasie, minder influx van macrofagen (ontstekingscellen) en minder proliferatie van gladde spiercellen in de vaatwand vergeleken met controle muizen. Remming van miR-329 zorgde voor een

niet-significante vermindering van intimale hyperplasie, terwijl remming van miR-494 geen effect had op intimale hyperplasie. Vervolgens bestudeerden wij de rol van miR-329 en miR-495 remming op versnelde atherosclerose in ApoE<sup>-/-</sup> muizen. Remming van miR-329 leidde weer tot een niet-significante reductie van de atherosclerotische plaque, terwijl remming van GSO-495 resulteerde in significant kleinere atherosclerotische plaques in vergelijking met controle muizen. Hierbij observeerden wij regulatie van miR-495 target genen in zowel de carotiden als de milt van GSO-495 behandelde dieren. Tot slot zorgde remming van miR-495 voor een verlaging van de cholesterol spiegels in het bloed van behandelde dieren.

Samenvattend laat deze studie zien dat remming van miR-495 leidt tot minder restenose in experimentele muismodellen. Door twee verschillende muismodellen te gebruiken, konden wij de rol van miR-495 in zowel intimale hyperplasie als versnelde atherosclerose bestuderen. Hoewel de effecten beschreven in deze studie bescheiden zijn, laat deze studie juist zien dat de opsomming van al deze kleine veranderingen in gen expressie, maar ook gladde spiercel proliferatie, macrofaag influx en cholesterol levels, uiteindelijk een groot effect teweeg kan brengen.

### **(Post-)transcriptionele regulatie van 14q32 microRNA expressie**

Een recente studie heeft laten zien dat expressie van enkele 14q32 microRNAs gereguleerd wordt door de transcriptiefactor Mef2a. In **Hoofdstuk 6** hebben wij de rol van Mef2a in post-ischemische neovascularisatie onderzocht en daarbij de transcriptionele regulatie van meerdere 14q32 microRNAs bestudeerd. Onze hypothese was dat remming van Mef2a zou leiden tot remming van 14q32 microRNAs en dus een positief effect zou hebben op post-ischemische neovascularisatie. Na remming van Mef2a met GSOs observeerden wij inderdaad een verbeterd herstel van de bloettoevoer na dubbele ligatie van de arteria femoralis. Arteriogenese en angiogenese waren beide gestimuleerd in de spierweefsels van GSO-Mef2a behandelde dieren. Echter, alleen expressie van miR-329 en miR-494 bleek geremd na remming van Mef2a, terwijl miR-487b, miR-410 en miR-495 geen verschil in expressie vertoonden na Mef2a remming. Om te bepalen of Mef2a inderdaad de transcriptie van 14q32 microRNAs beïnvloedt, hebben wij de expressie levels van microRNA voorlopers bepaald. Daarvoor hebben wij de expressie van primaire microRNAs (pri-microRNAs) en precursor microRNAs (pre-microRNAs) gemeten. Er werden geen verschillen geobserveerd in de pri-microRNA en pre-microRNA levels van miR-329, miR-487b, miR-494 en miR-495 tussen GSO-Mef2a en controle behandelde dieren. Aangezien de pri-microRNA levels gelijk waren tussen GSO-Mef2a en GSO-controle behandelde dieren, vermoedden wij dat de effecten op miR-329 en miR-494 levels kwamen door andere mechanismen dan via regulatie van transcriptie. Preliminair experimenten wekken de suggestie dat Mef2a betrokken is bij post-transcriptionele regulatie van 14q32 microRNAs. Met behulp van RNA-binding protein (RBP) immunoprecipitation (RIP) assays, observeerden wij binding van Mef2a aan pri-microRNA transcripten van miR-494. Binding van Mef2a zagen wij niet aan pri- of pre-microRNAs van miR-487b, één van de microRNAs die geen verschil liet zien in expressie levels na Mef2a remming.

In Hoofdstuk 6 laten wij zien dat remming van Mef2a het herstel van bloettoevoer in muizen na inductie van ischemie bevordert. De expressie levels van miR-329 en miR-494 gaan omlaag na Mef2a remming. Het lijkt erop dat deze remming wordt bewerkstelligd door post-transcriptionele regulatie van deze microRNAs door Mef2a. Wij laten hier voor de eerste keer zien dat Mef2a kan functioneren als RNA-binding protein bij de post-transcriptionele regulatie van 14q32 microRNAs.

In **Hoofdstuk 7** gaan wij verder in op de mechanismen die expressie van 14q32 microRNAs kunnen reguleren. Er zijn enkele aanwijzingen dat 14q32 microRNAs gereguleerd worden op post-

transcriptioneel niveau. Zoals beschreven in Hoofdstuk 3, worden 14q32 microRNAs gereguleerd volgens drie verschillende expressie patronen tijdens vaatwand remodellering. Deze expressie patronen zijn onafhankelijk van de locatie van de microRNA genen op het chromosoom, aangezien de genen die coderen voor vroege, late en non-responders op dit genomische gebied allemaal door elkaar liggen. Daarnaast zijn er ook grote verschillen in de basale expressie levels van 14q32 microRNAs.

RNA-binding proteins (RBPs) zijn eiwitten die een rol kunnen spelen bij de vorming van microRNAs. MicroRNAs worden afgeschreven van microRNA genen en vormen zo eerst primaire microRNAs (pri-microRNAs). Deze pri-microRNAs worden geknipt tot precursor microRNAs (pre-microRNAs). In een volgende stap wordt dit pre-microRNA geknipt tot een (volwassen) microRNA. RBPs kunnen de knip-stappen van pri-microRNA tot pre-microRNA en pre-microRNA tot microRNA beïnvloeden. In dit hoofdstuk laten wij zien dat expressie van 14q32 microRNAs waarschijnlijk voornamelijk gereguleerd wordt in de pre-microRNA naar volwassen microRNA stap. Met daaropvolgende experimenten demonstreerden wij dat twee RBPs, genaamd CIRBP en HADHB, binden aan pre-microRNA-329. Met behulp van immunohistochemische kleuring konden wij de aanwezigheid van deze eiwitten in spierweefsel van muizen bevestigen. Daarnaast observeerden wij een verhoogde expressie van CIRBP en HADHB in ischemisch spierweefsel, 72 uur na inductie van ischemie door middel van dubbele ligatie van de arteria femoralis. Met behulp van RIP-experimenten demonstreerden wij tot slot dat CIRBP specifiek bindt aan het pre-microRNA van miR-329 maar niet aan het pri-microRNA. Deze data demonstreren een rol voor CIRBP in de post-transcriptionele regulatie van het 14q32 microRNA miR-329.

Deze studie laat zien dat 14q32 microRNAs gereguleerd worden op post-transcriptioneel niveau door twee RBPs, CIRBP en HADHB. Hiermee biedt deze studie nieuwe inzichten in de regulatie van expressie van 14q32 microRNAs na ischemie.

### **14q32 microRNA expressie in subcutaan vetweefsel**

Biomarkers zijn (makkelijk) meetbare stoffen die een indicatie geven over de aanwezigheid of ernst/stadium van een bepaalde ziekte. Dergelijke markers kunnen gebruikt worden om ziekten in een vroeg stadium op te sporen maar ook om de ziekteprogressie en uitkomst te voorspellen.

Perifeer vaatlijden zal zich in een deel van de patiënten verder ontwikkelen tot kritieke ischemie. Bij kritieke ischemie zijn er pijnklachten in de voet of been bij rust en is er sprake van slechte wondgenezing. Een deel van deze patiënten ondergaat binnen enkele jaren amputatie van het onderbeen. Voor deze groep patiënten is het aantal behandelingsopties beperkt. Daarnaast is er vooralsnog geen betrouwbare biomarker om het ontstaan en het verloop van perifeer vaatlijden te voorspellen. In **Hoofdstuk 8** hebben wij expressie van microRNAs in zowel subcutaan als perivasculair vetweefsel bepaald van patiënten die een onderbeenamputatie ondergingen als gevolg van kritieke ischemie. MicroRNA expressie in deze weefsels werd vergeleken met de expressie in subcutaan vetweefsel van gezonde controle patiënten die electieve orthopedische chirurgie ondergingen. Expressie van microRNAs was voornamelijk verlaagd in vetweefsel van kritieke ischemie patiënten in vergelijking met gezonde controles. Echter, een aantal microRNAs liet juist een verhoogde expressie zien in vetweefsels van patiënten met kritieke ischemie in vergelijking met gezonde controles. Deze microRNAs waren miR-127, miR-134, miR-370, miR-376c, miR-411, miR-539, miR-886-3p en miR-146b. Opvallend was dat zes van de acht microRNAs die verhoogd waren behoren tot het 14q32 microRNA cluster. Tevens konden wij significante verhoging van deze 14q32 microRNAs miR-127, miR-134, miR-370, miR-376c, miR-411 en miR-539 bevestigen in zowel subcutaan als perivasculair vetweefsel in twee onafhankelijke studie populaties.



Met deze studie laten we zien dat de lokale expressie van microRNAs in vetweefsel gebruikt kan worden als biomarker om patiënten met kritieke ischemie te identificeren. Vervolgstudies moeten uitwijzen of deze microRNAs gebruikt kunnen worden om onderscheid te maken tussen patiënten met kritieke ischemie die het risico lopen om amputatie te ondergaan en patiënten met kritieke ischemie die nog verder behandeld kunnen worden.

### **Conclusie**

In dit proefschrift laat ik de rol van 14q32 microRNAs in verschillende processen van vaatwand remodellering zien. De experimentele data leveren nieuwe inzichten en kennis in de regulatie van 14q32 microRNAs en demonstreren de mogelijkheid om 14q32 microRNAs te gebruiken als potentiële therapeutische targets voor de behandeling en preventie van atherosclerose, restenose en perifeer vaatlijden.

