



UNIVERSITEIT  
GENT

FACULTEIT GENEESKUNDE EN  
GEZONDHEIDSWETENSCHAPPEN

# *Rol van microRNA's in de pathogenese van COPD*

*Yorick Janssens*

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Dr. *Ken Bracke*

Vakgroep *Inwendige ziekten*

**Academiejaar 2014-2015**





# *Rol van microRNA's in de pathogenese van COPD*

*Yorick Janssens*

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Dr. *Ken Bracke*  
Vakgroep *Inwendige ziekten*

**Academiejaar 2014-2015**

*“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.”*

7/05/2015

Yorick Janssens

Dr. Ken Bracke

## Voorwoord

Een thesis is niet het werk van één enkel persoon maar komt tot stand door samenwerking van verschillende personen. Daarom wil ik graag enkele personen in het bijzonder bedanken.

Om te beginnen wil ik mijn promotor Dr. Ken Bracke bedanken om mij de kans te geven mijn thesis in dit labo te kunnen uitvoeren en voor het nalezen van zowel mijn onderzoeksprotocol als thesis. Het was een zeer leerrijke ervaring en heb hier ontdekt wat wetenschappelijk onderzoek precies inhoudt. In het bijzonder wil ik ook mijn begeleidsters Griet Conickx en Elise De Smet bedanken voor de uitstekende begeleiding gedurende de twee jaar die ik hier vertoefd heb. Dankzij jullie heb ik tal van technieken aangeleerd gekregen die mij later zeker nog van pas kunnen komen. Ook alle laboranten kan ik niet genoeg bedanken voor alle hulp tijdens de eindpunten. Zonder al jullie hulp, werk en ervaring zou een eindpunt tot een kot in de nacht duren. Ook voor het ‘roken’ en onderhoud van de muizen zijn jullie dagelijks in de weer, waarvoor dank.

Omdat studeren meer is dan alleen maar naar de les gaan en examens maken wil ik ook graag alle mensen bedanken die zich dag in dag uit inzetten voor de ‘Vlaamse Biomedische Kring’. Jullie hebben mij vele toffe avonden geschonken en ervoor gezorgd dat ik ’s avonds ook nog uit mijn kot kwam. Ik heb hier vrienden voor het leven gemaakt en ervaringen opgedaan die ik nooit meer zal vergeten. Kortom ik heb met jullie de tijd van mijn leven beleefd. Specifiek wil ik ook mijn goede vrienden Joren en Tom bedanken om het samen met mij uitgehouden te hebben op ons appartement. Het was fijn om het laatste jaar van mijn studies geen eenmansgerechten meer te moeten klaarmaken.

Tenslotte wil ik ook mijn ouders bedanken die mij de kans en middelen gegeven hebben om te kunnen studeren aan de universiteit. Zes jaar en vele centen later is de eindmeet bereikt. Bedankt om mij gedurende die hele periode te blijven steunen en niet te veel druk op mijn schouders te leggen.

Aan allen, EEN WELGEMEENDE MERCI!

# Inhoudsopgave

Samenvatting.....	1
Summary .....	2
1. Inleiding .....	3
1.1. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) .....	3
1.1.1. Definitie / epidemiologie.....	3
1.1.2. Klinische kenmerken.....	4
1.1.3. Pathologie.....	6
1.1.4. Pathogenese .....	6
1.2. MicroRNA.....	12
1.2.1. Biogenese .....	13
1.2.2. Functie .....	14
1.2.3. Rol van miRNA in het immuunsysteem .....	15
1.2.4. Link tussen microRNA en COPD .....	18
2. Materiaal en methoden .....	19
2.1. Keuze van het miRNA .....	19
2.2. Rookprotocol.....	19
2.3. LNA inhibitoren .....	20
2.4. Inhibitieprotocol .....	20
2.5. Intranasale instillatie.....	21
2.6. Eindpunt .....	21
2.7. Detectie van miRNA .....	22
2.7.1. RNA extractie.....	22
2.7.2. RT-qPCR.....	22
2.8. Detectie van inflammatie.....	23
2.8.1. Celtelling van broncho-alveolaire lavage (BAL) en cytospin .....	23
2.8.2. Flowcytometrie.....	24
2.9. Statistische analyse.....	25
3. Resultaten .....	26
3.1. Keuze van het miRNA .....	26
3.2. MiR-155 inhibitie experiment .....	28
3.2.1. Expressie van miR-155 en targetgenen na miR-155 inhibitie .....	28
3.2.2. Effect van miR-155 inhibitie op rook-geïnduceerde inflammatie .....	31
4. Bespreking.....	37
5. Conclusie.....	40
Referenties.....	41

## Samenvatting

COPD is een chronische inflammatoire longaandoening die wordt gekarakteriseerd door chronische hoest, dyspneu, piepende ademhaling en een verhoogde mucusproductie. Een van de grootste risicofactoren voor het verkrijgen van COPD is het roken van sigaretten. De prevalentie van COPD is nog steeds aan het toenemen en men verwacht dat het tegen 2020 wereldwijd de derde belangrijkste doodsoorzaak wordt. COPD is gekenmerkt door obstructie van de luchtwegen (chronische bronchiolitis) en destructie van het longparenchym (emfyseem).

In deze thesis werd de rol van microRNA-155 (miR-155) in de pathogenese van COPD onderzocht. Onze resultaten tonen aan dat dit miRNA is opgereguleerd in longen van zowel humane COPD patiënten als van rook-blootgestelde muizen. MicroRNAs zijn kleine, niet coderende RNA moleculen die genexpressie post-transcriptioneel controleren. Om de rol van miR-155 in de pathogenese van COPD te onderzoeken, werd miR-155 geïnhibeerd in muizen doormiddel van intranasale instillatie van Locked Nucleic Acid (LNA) inhibitoren. Inhibitie van miR-155 werd gevalideerd met RTqPCR en door te kijken naar expressie van targetgenen van miR-155 (Bach1, PU.1 en HIF-1 $\alpha$ ). Het effect van inhibitie op inflammatie in de longen werd nagegaan doormiddel van cytopins en flowcytometrie.

Inhibitie van miR-155 in de longen zorgt voor een attenuatie van de sigarettenrook geïnduceerde toename van het aantal neutrofielen, monocytten, dendritische cellen, CD4 T-cellen en CD8 T-cellen in het broncho-alveolaire lavage (BAL) vocht. In het longweefsel ziet men enkel een attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van het aantal dendritische cellen en macrofagen. Bij deze resultaten moet men wel opmerken dat deze attenuaties ook optraden na toediening van een scrambled controle. MiR-155 inhibitie kan dus een gunstige invloed hebben in de pathogenese van COPD. Er blijkt een attenuatie op te treden van tal van sigarettenrook geïnduceerde inflammatoire cellen na inhibitie. Verder onderzoek is nodig om na te gaan waarom deze attenuatie ook optreedt na toediening van de scrambled controle en wat eventuele neveneffecten kunnen zijn van miR-155 inhibitie.

## Summary

**Background:** COPD is a chronic inflammatory pulmonary disease characterized by chronic cough, wheezing, dyspnea and an elevated mucus production. Smoking constitutes the most important risk factor for this disease. COPD is expected to be the third most important cause of death in 2020. MicroRNAs (small, non-coding RNA's) may play a crucial role in the pathogenesis of COPD.

**Methods:** The role of miR-155 in the pathogenesis of COPD will be examined. MiR-155 is inhibited by intranasal administration of LNA inhibitors. Inhibition is confirmed by qPCR. Inflammation in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and lung tissue is detected by cytopins and flow cytometry.

**Results:** In BAL, we see an attenuation of the cigarette smoke induced upregulation of neutrophils, monocytes, dendritic cells, CD4 T-cells and CD8 T-cells after miR-155 inhibition. In lung tissue, we only see an attenuation of dendritic cells and macrophages. Intriguingly, after administration of a scrambled control we see similar results.

**Conclusion:** MiR-155 inhibition can be beneficial in the pathogenesis of COPD. We see an attenuation of different smoke induced inflammatory cells after inhibition. However the reason why we see similar results after administration of a scrambled control should be further investigated.



# 1. Inleiding

## 1.1. Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

### 1.1.1. Definitie / epidemiologie

COPD is een chronisch inflammatoire aandoening die gekenmerkt wordt door een progressieve en irreversibele beperking van luchtstroom. Dit is het gevolg van obstructie van de luchtwegen (chronische bronchiolitis) en destructie van longparenchym (emfyseem). Men spreekt van COPD wanneer de FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in 1 sec)/FVC (forced vital capacity) ratio kleiner is dan 70% (1). COPD is één van de belangrijkste oorzaken van morbiditeit en mortaliteit wereldwijd en de prevalentie is nog steeds aan het toenemen. Er wordt voorspeld dat de ziekte tegen 2020 de derde belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd wordt (2). Globaal gezien lijden meer dan 65 miljoen mensen aan deze aandoening. In 2012 stierven meer dan 3 miljoen mensen aan COPD (3). De belangrijkste risicofactor voor het verkrijgen van COPD is het roken van sigaretten maar er bestaan ook andere risicofactoren zoals genetische factoren ( $\alpha$ 1-antitrypsine deficiëntie) en luchtpollutie (4). Ondanks dat roken de belangrijkste risicofactor is ontwikkeld slechts 15-20% van de rokers COPD. Genetische factoren spelen dus ook een belangrijke rol in het ontstaan van de ziekte (1).

Patiënten kunnen naargelang de ernst van de ziekte ingedeeld worden in verschillende stadia. Dit kan op basis van spirometrische metingen (figuur 1) of op basis van symptomen en het risico op het krijgen van exacerbaties (4, 5).

Classification of Severity of Airflow Limitation in COPD (Based on Post-Bronchodilator FEV <sub>1</sub> )		
In patients with FEV <sub>1</sub> /FVC < 0.70:		
GOLD 1:	Mild	FEV <sub>1</sub> ≥ 80% predicted
GOLD 2:	Moderate	50% ≤ FEV <sub>1</sub> < 80% predicted
GOLD 3:	Severe	30% ≤ FEV <sub>1</sub> < 50% predicted
GOLD 4:	Very Severe	FEV <sub>1</sub> < 30% predicted

**Figuur 1:** GOLD classificatie van COPD op basis van FEV<sub>1</sub> (5).

Op basis van symptomen wordt er een onderscheid gemaakt tussen vier groepen (A,B,C en D). Patiënten in groep A hebben een laag risico op exacerbaties en weinig symptomen,

patiënten in groep B hebben iets meer symptomen. Patiënten in groep C hebben weinig symptomen maar een hoog risico op exacerbaties en patiënten in groep D hebben zowel een hoog risico op exacerbaties en meerdere symptomen (4, 5).

Huidige behandelingsmethoden van stabiele COPD zijn vooral gericht op het verbeteren van symptomen en niet op het aanpakken van de onderliggende mechanismen. Bij voorkeur gebruikt men langwerkende  $\beta_2$ -agonisten (salmeterol), langwerkende anticholinergica (tiotropium) of combinaties van beide. Deze geneesmiddelen veroorzaken bronchodilatatie maar zorgen slechts voor een kleine toename van de FEV<sub>1</sub> (<10%) en hebben tal van bijwerkingen (4). In tegenstelling tot de behandeling van astma zorgen corticosteroïden niet voor een onderdrukking van inflammatie, men moet dus op zoek naar andere targets om inflammatie te onderdrukken. Voorbeelden van geneesmiddelen die andere targets hebben zijn mediator antagonisten, protease inhibitoren en fosfodiësterase 4 (PDE4) inhibitoren (Roflumilast). Deze laatste reduceert inflammatie door de intracellulaire afbraak van cyclisch AMP te inhiberen (4, 6). De meest succesvolle ‘behandeling’ tegen COPD is rookstop. Middelen die kunnen helpen tegen nicotine verslaving zijn nicotine substituten, bupropion en de partiële nicotine agonist ‘varenicline’. Ondanks de beschikbaarheid van deze middelen slaagt jaarlijks slechts 15% van de COPD patiënten erin te stoppen met roken (6).

### 1.1.2. Klinische kenmerken

Gerelateerde symptomen van COPD zijn chronische hoest, inspanningsdyspneu, verhoogde mucusproductie en een piepende ademhaling (1). Ook kunnen er plots exacerbaties optreden. Dit is een acute verslechtering van respiratoire symptomen met een daling van de longfunctie en levenskwaliteit tot gevolg.

Exacerbaties zijn een belangrijke oorzaak van de hoge morbiditeit en mortaliteit die geassocieerd is met COPD (7, 8). Er worden drie types van exacerbaties onderscheiden. Type 1 exacerbaties vertonen een toename in dyspneu, sputumproductie en sputumpurulentie. Type 2 exacerbaties vertonen ofwel een toegenomen sputumproductie of purulentie. Type 3 exacerbaties bevatten één van deze symptomen in combinatie met toegenomen hoest, piepende ademhaling of symptomen van een bovenste luchtweg infectie (8). De gemiddelde frequentie van exacerbaties die een patiënt ondergaat per jaar is 2,5-3. Al is dit waarschijnlijk een onderschatting omdat niet alle exacerbaties lijden tot hospitalisatie en niet worden gerapporteerd. Het risico en de ernst van exacerbaties neemt toe naarmate de ernst van COPD

toeneemt maar men kan ook genetisch vatbaar zijn voor het krijgen van exacerbaties (7, 8). Het verloop van exacerbaties kent twee patronen: een acuut of een gradueel verloop. Acute exacerbaties worden gekenmerkt door een sterke toename van respiratoire symptomen vanaf de eerste dag, met een korte hersteltijd. Herstel van longfunctie duurt ongeveer 7-10 dagen en het herstel van symptomen 11 tot 13 dagen. Een gradueel verloop stelt zich trager in, maar duurt langer. In de minderheid van de gevallen (<10%) ziet men dat herstel onvolledig is, wat zorgt voor een daling van de levenskwaliteit (7). Virale en bacteriële infecties die zorgen voor een verhoogde luchtweg inflammatie zijn de belangrijkste triggers voor exacerbaties. Deze zijn geassocieerd met een toename van neutrofielen en inflammatoire mediators zoals Interleukine-8 (IL-8) en Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in vergelijking met de stabiele status (7, 8). Tussen de 25 en 50% van de COPD patiënten hebben een bacteriële kolonisatie in de lagere luchtwegen en deze is gerelateerd aan de ernst van de ziekte (8). Dit komt doordat alveolaire macrofagen minder in staat zijn de bacteriën te klaren (9). *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* en *Moraxella catarrhalis* zijn de meest voorkomende bacteriële infecties. Patiënten met een hogere exacerbatie frequentie vertonen vaak een toegenomen bacteriële kolonisatie. Rhinovirus infectie is de virale infectie die het meest geassocieerd is met exacerbaties (8). Virale en bacteriële infecties komen vaak ook simultaan voor en kunnen een synergistisch inflammatoir effect uitoefenen (7). Rhinovirus infecties verhogen de bacteriële adherentie aan epitheliale cellen en zorgen voor afbraak van antimicrobiële peptiden waardoor virale infecties vaak gevolgd worden door een secundaire bacteriële infectie (10). Behandeling van exacerbaties gebeurt met orale corticosteroiden, antibiotica, bronchodilatoren en niet-invasieve ventilatie. Deze verbeteren allemaal de symptomen van exacerbaties maar hebben geen invloed op de onderliggende pathologie van COPD. Preventie van exacerbaties is mogelijk via vaccinatie tegen influenza en pneumokokken infecties, gebruik van langwerkende bronchodilatoren (anticholinergica en/of  $\beta_2$ -agonisten) en gebruik van inhalatie corticosteroiden (7, 8).

Naast respiratoire symptomen vertonen patiënten ook vaak extrapulmonaire manifestaties (co-morbiditeiten). De belangrijkste co-morbiditeiten zijn cardiovasculaire aandoeningen, metabole aandoeningen (diabetes en obesitas), osteoporosis, longkanker en skeletale spierzwakte (4, 11). TNF $\alpha$  en een toename van oxidatieve stress spelen mogelijk een centrale rol in deze co-morbiditeiten. TNF $\alpha$  zorgt rechtstreeks voor een verhoogde expressie van c-reactief proteïne (CRP), een eiwit gevormd in de lever. Dit eiwit speelt een belangrijke rol in de pathogenese van cardiovasculaire aandoeningen. Bovendien spelen TNF $\alpha$  en reactive

oxygen species (ROS) een rechtstreekse rol in spierverslies en metabole aandoeningen. Het is echter nog onduidelijk of deze systemische inflammatie een primair of secundair fenomeen is (11).

### 1.1.3. Pathologie

Bij patiënten met COPD treden er pathologische veranderingen op in de centrale luchtwegen, perifere luchtwegen en in het longparenchym. In de centrale luchtwegen ziet men voornamelijk vergrootte bronchiale mucusklieren en een toegenomen aantal goblet cellen. Deze morfologische wijzigingen geven aanleiding tot mucus hypersecretie. Ook ziet men een inflammatoire cellulaire infiltratie. In de perifere luchtwegen treedt de grootste weerstand op die verantwoordelijk is voor de airflow limitatie. Morfologische veranderingen zijn: goblet cel metaplasie, epitheel metaplasie, inflammatoire cellulaire infiltraties en een toegenomen hoeveelheid gladde spieren en fibrose.

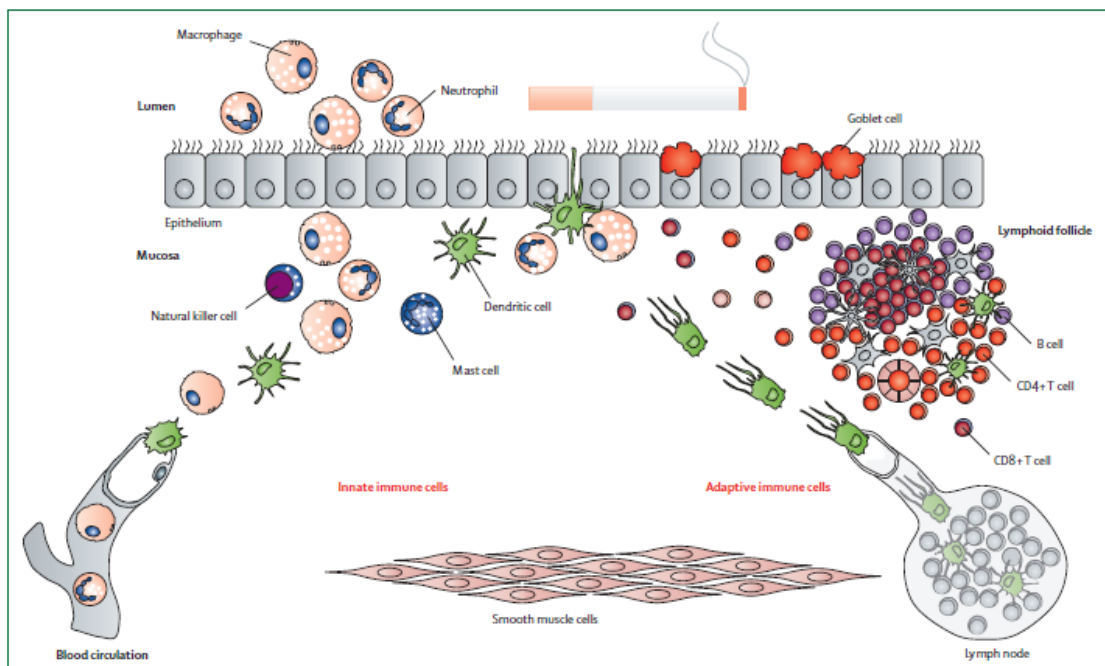
Bij patiënten met emfyseem treedt er in het longparenchym een vergroting van de luchtholten op, dit is ten gevolge van alveolaire destructie. Er bestaan twee voorname types van emfyseem: centriacinair emfyseem en panacinair emfyseem. Bij centriacinair emfyseem treedt alveolaire destructie op in de centrale regio van acinus. Deze laesies worden voornamelijk gevonden in de bovenste lobben van de longen bij rokers. Panacinair emfyseem wordt gekarakteriseerd door een volledige aantasting van de acinus. Dit treedt voornamelijk op in de lager gelegen lobben van personen met een  $\alpha 1$ -antitrypsine deficiëntie (12).

### 1.1.4. Pathogenese

Er zijn verschillende onderliggende pathogene mechanismen verantwoordelijk voor de pathologie van COPD. Door infiltratie van inflammatoire cellen treedt er een chronische obstructieve bronchiolitis op. Oxidatieve stress, protease – antiprotease inbalans en apoptose geven aanleiding tot emfyseem (9, 13).

### 1.1.4.1. Chronische inflammatie

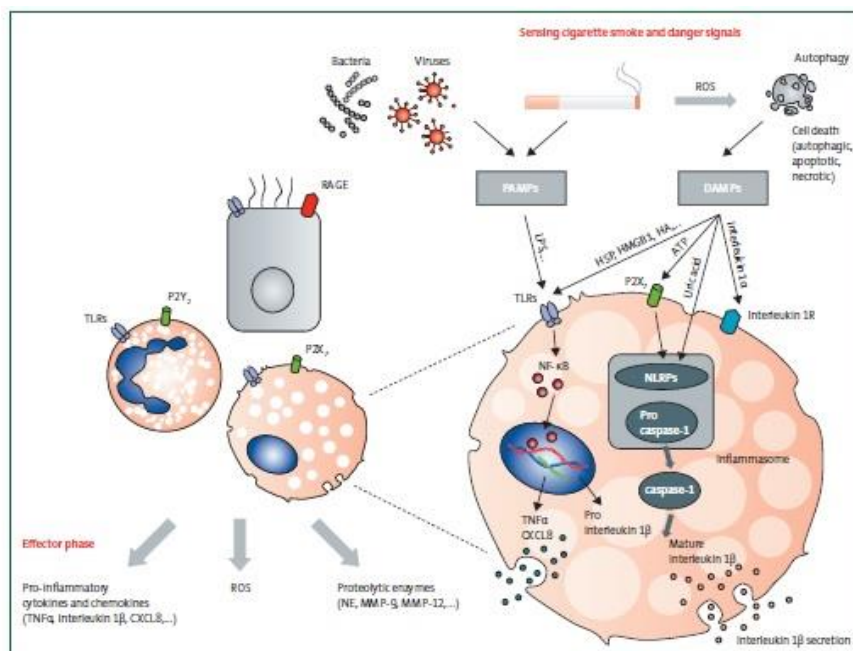
Bij COPD patiënten treedt er chronische inflammatie in de luchtwegen op waarbij zowel het aangeboren als adaptief immuunsysteem betrokken zijn (figuur 2). De belangrijkste betrokken cellen van het aangeboren immuunsysteem zijn macrofagen, dendritische cellen, monocyt, neutrofielen, natural killer cellen (NK cellen) en mast cellen. Inductie van een aangeboren immunerespons kan door de herkenning van verschillende bacteriën doormiddel van identificatie van pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Deze identificatie gebeurt via specifieke receptoren, de pattern recognition receptors (PRRs). Deze komen tot expressie op macrofagen, dendritische cellen en epitheliale cellen. PRRs kunnen ook geactiveerd worden door endogene moleculen die normaal intracellulair voorkomen maar vrijgesteld worden na celschade. Dit zijn de zogenaamde danger-associated molecular patterns (DAMPs). Voorbeelden van DAMPs zijn high-mobility group protein 1 (HMGB1), extracellulair adenosine trifosfaat (ATP) en urinezuur (9).



**Figuur 2:** Cellen van het aangeboren en adaptief immuunsysteem betrokken in de pathogenese van COPD (9).

Inhalatie van sigarettenrook leidt tot activatie van PRRs. Dit kan zowel rechtstreeks gebeuren door individuele componenten in de rook of doormiddel van vrijstelling van DAMPs. Deze activatie zorgt voor een verhoogde expressie van pro-interleukine-1 $\beta$ . Dit wordt vervolgens omgezet in specifieke inflammasomen tot matuur interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (figuur 3) (9). IL-1 $\beta$  is een sterk pro-inflammatoir cytokine en cellen immunoreactief voor IL-1 $\beta$  zijn toegenomen in bronchiale biopsies van COPD patiënten. Er zijn ook aanwijzingen dat er een

inflammasoom onafhankelijke inductie van IL-1 $\beta$  optreedt (2). Blootstelling aan sigarettenrook extract zorgt ook voor een toegenomen autofagie in pulmonaire epitheelcellen. Hierbij speelt het LC3B eiwit een belangrijke rol. In de effector fase van de aangeboren immuunrespons treedt er een verhoogde expressie van TNF $\alpha$  en CXCL8 op in epitheelcellen en alveolaire macrofagen. Dit wijzigt de expressie van adhesiemoleculen op endotheelcellen waardoor er neutrofielen en inflammatoire monocytten gerecruteerd worden naar de longen. Neutrofielen zorgen voor weefselafbraak doormiddel van vrijstelling van neutrofiel elastase. Neutrofiel elastase is tevens ook een stimulator van mucine productie en secretie door middel van TGF $\alpha$ . Dit resulteert in een verhoogde mucusproductie (9). Niet alleen het aantal alveolaire macrofagen is toegenomen bij COPD patiënten, het fenotype van deze macrofagen is ook gewijzigd. Alveolaire macrofagen van COPD patiënten vertonen een afgenomen expressie van CD86 (betrokken in co-stimulatie) in vergelijking met rokers en CD11a (adhesiemolecule) in vergelijking met niet rokers. De expressie van CD11c is toegenomen. De lagere expressie van CD86 en CD11a impliceert een gereduceerde antigeen-presenterende functie van deze macrofagen. Dit kan zorgen voor een verhoogde vatbaarheid op bacteriële infecties (14).



**Figuur 3:** Omzetting pro-interleukine 1 $\beta$  tot matuur interleukine-1 $\beta$  in het inflammasoom. Sigarettenrook zorgt voor vrijstelling van DAMPs wat zorgt voor de omzetting van pro-caspase 1 tot caspase 1. Dit klieft pro-interleukine-1 $\beta$  tot interleukine-1 $\beta$  (9).

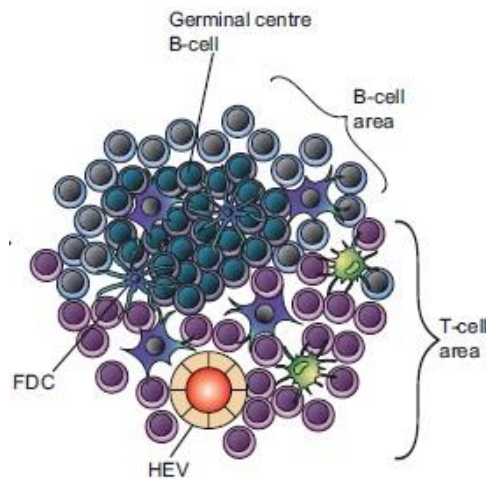
Er treedt ook een stijging van het aantal luminale mast cellen en NK cellen op. NK cellen zijn betrokken in de afbraak van structurele cellen en promotie van dendritische cellen door productie van interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en TNF $\alpha$ . Dendritische cellen vormen de link tussen het

aangeboren en adaptief immuunsysteem. Deze cellen promoten CD4 T helper (Th) cel differentiatie en CD8 cytotoxiciteit. Bij COPD patiënten ziet men een toename van het aantal dendritische cellen in het epitheel van de lager gelegen luchtwegen. In tegenstelling tot de alveolaire macrofagen is er een toename van de expressie van costimulatoire moleculen (9).

De belangrijkste cellen van het adaptief immuunsysteem zijn de CD8 cytotoxische T cellen. De expressie van de chemokinereceptor CXCR3 en zijn ligand CXCL10 is toegenomen in de perifere luchtwegen van COPD patiënten. Dit zorgt voor een verhoogde rekrutering van CD8 T cellen. Deze cellen produceren proteolytische enzymen zoals perforines en granzymes wat aanleiding geeft tot celdood. Ook het aantal CD4 Th cellen is toegenomen bij COPD patiënten. Men ziet verhoogde aantallen Th1 en Th17 cellen. Th1 cellen produceren IFN- $\gamma$  en promoten accumulatie van inflammatoire cellen in de long. Th1 ontwikkeling wordt gepromoot door IL-18 dat geproduceerd wordt door alveolaire macrofagen (9). IL-18 is niet alleen belangrijk in de ontwikkeling van Th1 cellen; het is ook een cofactor voor Th2 ontwikkeling, IgE productie en Th17 differentiatie (2). Th17 cellen produceren IL-17A en IL-17F en spelen een belangrijke rol in de klaring van extracellulaire pathogenen. Deze cytokines induceren expressie van antimicrobiële peptiden, chemokines zoals CXCL1 en CXCL8, G-CSF en GM-CSF in epitheelcellen. Deze laatste twee chemokines promoten neutrofiel accumulatie in de long (9). IL-17A zorgt ook voor inductie van IL-6 in bronchiale epitheelcellen en fibroblasten. Dit zorgt op zijn beurt voor een verhoogde productie van MUC5AC en MUC5B in tracheo-bronchiale epitheelcellen wat aanleiding geeft tot een verhoogde mucusproductie (2). Tenslotte ziet men ook een daling van het aantal regulatoire T cellen (Treg). Deze Treg cellen onderdrukken inflammatie en inhiberen auto-immuniteit. Dit doen ze doormiddel van contact afhankelijke mechanismen of de productie van anti-inflammatoire cytokines zoals IL-10 en TGF $\beta$  (9).

Naast T cellen is ook het aantal B cellen toegenomen bij COPD patiënten. Deze B cellen gaan zich organiseren in lymfoïede follikels (9). Deze follikels zijn zowel aanwezig in de kleinere luchtwegen als in het long parenchym. Lymfoïede follikels bestaan uit een B cel aggregaat dat omringd is door een regio met T cellen en high endothelial venules (HEV) (figuur 4). Naast B –en T cellen zijn er ook dendritische cellen en folliculaire dendritische cellen aanwezig. Dit laat B –en T-cel priming, clonale expansie, antigeen retentie, somatische hypermutatie, affiniteitsmaturing en immunoglobuline klasse switch toe. De B-cellen aanwezig zijn vooral IgM positief en IgD negatief. Het overgrote deel is ook positief voor CD27, een merker voor

geheugen B-cellen. De B cellen zijn oligoclonaal wat wijst op een antigeen-specifieke inductie van de B cell follikels (15).



**Figuur 4:** Structuur van lymfoïede follikel: germinaal centrum met B-cellen omringd door T-cellen en HEV (15).

De ontwikkeling van lymfoïede follikels is een dynamisch proces waarbij een belangrijke rol is weggelegd voor chemokines. Een centrale rol is weggelegd voor  $LT\alpha_1\beta_2$  en zijn receptor  $LT\beta R$ . Binding van het ligand op zijn receptor induceert expressie van tal van adhesiemoleculen en homeostatische lymfoïede chemokines zoals CCL19, CCL21, CXCL12 en CXCL13. Deze chemokines zijn belangrijk voor het rekruteren van cellen en compartimentalisatie van de follikels. CCL19 en CCL21 worden geproduceerd door stromale cellen en reguleren de rekrutering van naïeve T cellen en mature dendritische cellen naar de T cell regio's. CXCL12 en CXCL13 worden geproduceerd door folliculaire dendritische cellen en zorgen voor rekrutering van de B cellen. De antigene stimuli die de vorming van follikels triggert kunnen afkomstig zijn van zowel bacteriën, sigarettenrook componenten of auto-antigenen. Of lymfoïede follikels protectief zijn tegen bacteriële en virale infectie of schadelijk zijn door reactie tegen auto-antigenen is nog onduidelijk (15).

Pulmonaire inflammatie blijft persisteren ondanks rookstop. Verschillende mechanismen zijn hiervoor verantwoordelijk en omvatten een zelf onderhoudende aangeboren immuunrespons, luchtweg remodelling, gedaalde klaring van apoptotische cellen door macrofagen, chronische kolonisatie en infectie van de lagere luchtwegen, oxidatieve stress, weefsel hypoxie, genetische vatbaarheid en epigenetische wijzigingen (9).



#### 1.1.4.2. Protease – antiprotease inbalans

Wanneer de proteolytische activiteit van de proteasen de activiteit van de anti-proteasen overstijgt treedt er destructie van longweefsel op. Deze inbalans is meestal het gevolg van inflammatie maar kan ook van genetische aard zijn (vb.  $\alpha$ 1-antitrypsine deficiëntie) (13). Tijdens inflammatie gaan neutrofielen en alveolaire macrofagen tal van proteasen vrijstellen. Neutrofielen produceren neutrofiel elastase en MMP-9 terwijl macrofagen enkel matrix metalloproteasen (MMP-8, MMP-9 en MMP-12) produceren. Ook CD8 T-cellen en NK cellen zorgen voor destructie van weefsel door de vrijstelling van perforine en granzyme B (9).

#### 1.1.4.3. Oxidatieve stress

Oxidatieve stress ontstaat wanneer ROS ( $O_2^-$  en OH) de anti-oxidante defensie mechanismen overstijgt. Deze oxidanten zijn aanwezig in sigarettenrook of worden geproduceerd in neutrofielen, macrofagen en epitheelcellen door middel van het NADPH oxidase. ROS zorgen voor oxidatie van eiwitten, DNA en lipiden wat rechtstreeks zorgt voor longschade of een waaier aan cellulaire responsen veroorzaakt. ROS kunnen remodelling van de extracellulaire matrix (ECM) of bloedvaten veroorzaken, mucusproductie stimuleren, apoptose veroorzaken en/of cel proliferatie reguleren (16). Oxidatieve stress beïnvloedt ook de protease-antiprotease inbalans door het activeren van proteasen en het inactiveren van antiproteasen (13). Oxidatieve stress kan ook inflammatie versterken door het activeren van verschillende stress kinasen (c-Jun geactiveerd kinase) en redox sensitieve transcriptiefactoren zoals NF $\kappa$ B. Activatie van NF $\kappa$ B gebeurt door activatie van de activerende inhibitor van het  $\kappa$ B- $\alpha$  kinase of door een toegenomen rekrutering van co-activatoren. Deze inductie van NF $\kappa$ B zorgt voor een verhoogde expressie van tal van pro-inflammatoire genen (16). Het is ook vanwege deze oxidatieve stress dat corticosteroiden geen anti-inflammatoir effect hebben in de behandeling van COPD. ROS verhinderen de nucleaire translocatie van glucocorticoid receptoren of reduceren de activiteit van het histon deacetylase 2 co-repressor eiwit. Hierdoor kunnen corticoiden hun anti-inflammatoir effect niet meer uitvoeren (9). De oxidatieve balans kan ook verstoord zijn door mutaties in genen die coderen voor anti-oxidante enzymes zoals het aldehyde dehydrogenase en aldo-keto reductase. Deze enzymes zorgen voor decarboxylatie van eiwitten en draaien de post-translationele modificaties, veroorzaakt door reactieve aldehydes, om (17).

#### 1.1.4.4. Apoptose

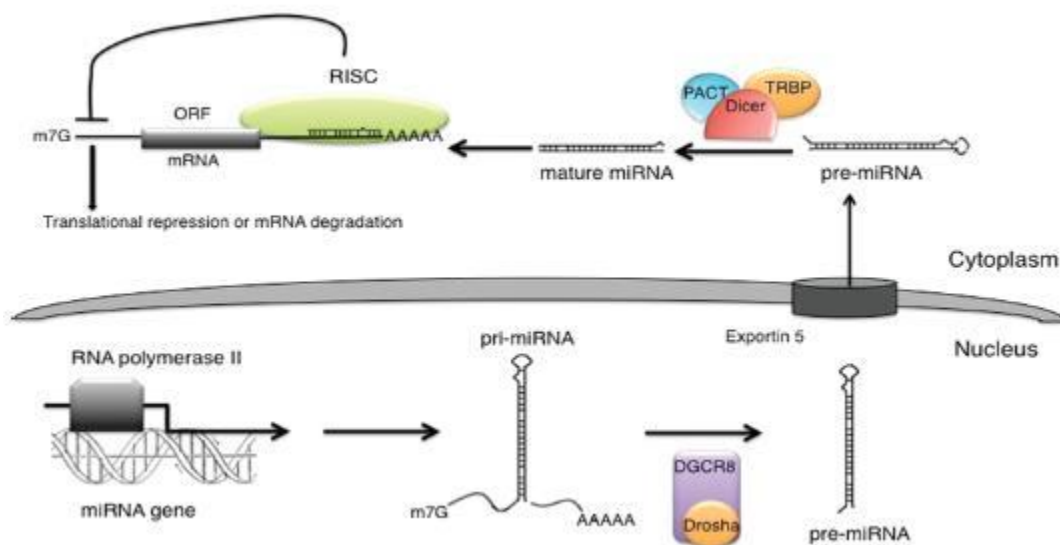
Apoptose is een strikt gereguleerd mechanisme van celdood en is belangrijk voor een normale weefsel homeostase. Apoptose kan verlopen via drie verschillende pathways waarbij verschillende proteasen (caspases) een essentiële rol spelen. Een eerste pathway wordt geactiveerd door extracellulaire signalen (receptor gemedieerde extrinsieke pathway). De tweede pathway wordt geactiveerd als een respons op fysieke en chemische stress signalen (mitochondriale intrinsieke pathway). Een derde pathway wordt geactiveerd als respons op stress signalen zoals hypoxie (endoplasmatisch reticulum pathway). In normale omstandigheden is apoptose steeds in evenwicht met proliferatie en differentiatie van cellen. Bij COPD treedt er een stijging in apoptose op van alveolaire wandcellen en endotheliale cellen. Hierbij is een centrale rol weggelegd voor Vasculaire Endotheliale Groeifactor (VEGF). Deze stijging van apoptose wordt niet evenredig gevolgd door een stijging van proliferatie. Dit heeft destructie van longparenchym tot gevolg. Ook systemische effecten die optreden bij COPD zoals perifere spierzwakte en osteoporose kunnen het gevolg zijn van een toegenomen apoptose. Apoptose interageert ook met de andere pathogene mechanisme wat de complexiteit van de pathogenese vergroot (13).

## **1.2. MicroRNA**

MicroRNAs (miRNAs) zijn kleine, endogene, niet coderende RNA moleculen van ongeveer 22 nucleotiden lang die de genexpressie van target genen post-transcriptioneel gaan reguleren. Expressie van wel 60% van het humane transcriptoom wordt gereguleerd door het miRNA systeem. MiRNAs spelen dan ook een belangrijke rol in tal van biologische processen zoals ontwikkeling, cel differentiatie, immuunrespons en groeiconrole (18). Het eerste miRNA (lin-4) werd ontdekt in 1993 na onderzoek in de *Caenorhabditis elegans* (19). Tegenwoordig zijn er al meer dan 1000 miRNAs gekend (18). MiRNAs spelen niet alleen een belangrijke rol in de ontwikkeling van de long maar ook in de pathogenese van tal van longaandoeningen zoals astma, mucoviscidose, longkanker, longfibrose, acute longschade en COPD (20). MiRNAs zijn dus veelbelovende target kandidaten in de behandeling van ziekten. Moleculen die de functie of abundantie van ziekte-gerelateerde miRNAs kunnen wijzigen vormen een nieuwe strategie in de behandeling van ziekten (21).

### 1.2.1. Biogenese

Synthese van miRNA start door transcriptie van het miRNA DNA door RNA polymerase II. Dit geeft aanleiding tot primary-miRNA (pri-miRNA) van honderden tot duizenden nucleotiden lang. Ongeveer de helft van de gekende miRNAs zijn gelegen in intronen van eiwit coderende genen of in de intronen/exonen van niet-coderende RNAs. MiRNAs gelegen in de intronen van eiwit-coderende genen zijn meestal gelegen in dezelfde oriëntatie als het pre-mRNA van het eiwit. De minderheid van miRNAs zijn gelegen in de untranslated region (UTR) van eiwit-coderende genen. Maturatie van het pri-miRNA gebeurt in twee stappen. Eerst gaat het pri-miRNA in de kern omgezet worden tot precursor-miRNA (pre-miRNA) van ongeveer 70-90 nucleotiden lang. Dit gebeurt onder invloed van het ribonuclease III 'Drosha'. Om accurate en efficiënte maturatie toe te laten vormt Drosha een complex met DGCR8, een eiwit dat bindt op dubbelstrengig RNA. Het pre-miRNA wordt dan geëxporteerd uit de kern naar het cytoplasma door Exportine 5. Vervolgens vindt in het cytoplasma de volgende maturatiestap plaats. Hierbij wordt het pre-miRNA omgezet tot matuur dubbelstrengig miRNA van 22 nucleotiden lang door het Dicer/TRBP (Tar RNA Bindend Proteïne) complex. Deze RNA duplex is slechts partieel complementair en wordt gesplitst door een helicase. Eén streng (wiens 5' uiteinde het minst stabiel is) wordt geïncorporeerd in het RNA Induced Silencing Complex (RISC) ('guide strand'). De andere streng wordt afgebroken ('passenger strand') (22) (figuur 5).

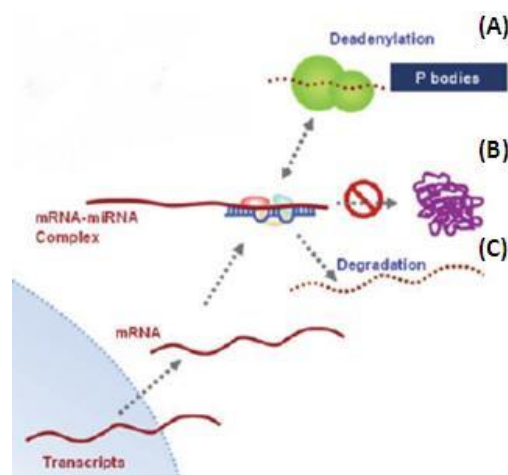


**Figuur 5:** Biogenese van miRNA. Pri-miRNA wordt afgeschreven door RNA polymerase II, daarna wordt het in de kern omgezet door het Drosha/DGCR8 complex waarna het pre-miRNA getransporteerd wordt naar het cytoplasma door Exportine 5. In het cytoplasma wordt pre-miRNA omgezet tot matuur dubbelstrengig miRNA door het Dicer/TRBP complex. Eén van de 2 strengen wordt dan geïncorporeerd in RISC (20).

### 1.2.2. Functie

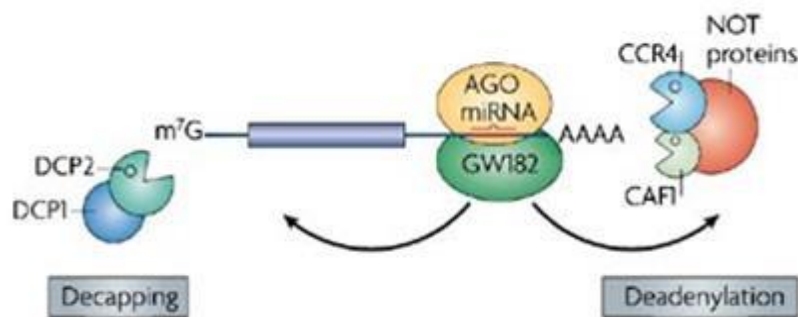
De functie van miRNA wordt uitgevoerd door het RISC. Het miRNA gidst RISC naar het target mRNA waar RISC gaat fungeren als een endonuclease. RISC klieft in de mRNA regio complementair met nucleotide 10 en 11 van het miRNA. De belangrijkste component van RISC is het Argonaute (Ago) eiwit. Dit eiwit bevat een centraal PAZ domein en een carboxyterminaal PIWI domein. Het zijn deze domeinen die verantwoordelijk zijn voor de binding tussen het Ago eiwit en het miRNA. Het PIWI domein bindt op het 5' uiteinde van miRNA terwijl het PAZ domein bindt aan het 3' uiteinde. Het PIWI domein vervult ook de RNase activiteit van RISC (22).

MiRNA reguleert expressie van zijn target genen via twee mechanismen. Het kan zorgen voor een onderdrukking van translatie (Figuur 6B). Dit is het geval wanneer de complementariteit tussen miRNA en zijn target mRNA onvolledig is. Het kan ook zorgen voor rechtstreekse klieving en degradatie van zijn target mRNA. Dit is het geval wanneer er volledige complementariteit optreedt. In de meeste gevallen is de complementariteit tussen miRNA en zijn target mRNA beperkt tot een zestal nucleotiden gelegen in de 5' regio van het miRNA ('seed region') en de 3' regio van het mRNA. Vermits deze seed region relatief klein is, is één miRNA in staat meerdere genen te reguleren. In de meeste gevallen gaat er dus inhibitie van translatie optreden waarna er re-localisatie naar processing bodies (P-bodies) in het cytoplasma kan optreden (Figuur 6A). In de minderheid van de gevallen treedt er volledige complementariteit op waarna het mRNA gekliefd kan worden door de endonucleolytische activiteit van RISC (Figuur 6C) (22).



**Figuur 6:** Processing van mRNA na binding van RISC: re-localisatie naar p-bodies (A), inhibitie van translatie (B) of mRNA degradatie (C) (20).

P-bodies zijn cytoplasmatische foci van 100 tot 300 nm groot waarin accumulatie optreedt van eiwitten betrokken in mRNA degradatie, translationele repressie, mRNA surveillance en RNA-gemedieerde gene silencing. Maar ook van mRNA dat niet vertaald wordt. Ribosomale eiwitten en eiwitten betrokken in initiatie van translatie zijn afwezig. Dit wijst erop dat het specifieke plaatsen zijn waar voornamelijk RNA afbraak plaatsvindt (23). MiRNAs die onvolledig complementair zijn gaan naast onderdrukking van translatie het mRNA ook gidsen naar deze p-bodies. Eénmaal aangekomen in de p-bodies gaat degradatie van het mRNA plaatsvinden. Degradatie vereist verschillende componenten: Ago eiwit, component van het p-body (GW182), deadenylase complex (CAF1-CCR4-NOT), decapping enzyme (DCP2) en decapping activatoren (DCP1, Ge-1, EDC3 en RCK/p54). GW182 interageert rechtstreeks met het Ago eiwit wat zorgt voor rekrutering van het deadenylase –en decapping complex. Eerst treedt er deadenylatie op waardoor het mRNA zijn 3' polyA staart verliest. Dit wordt gevolgd door decapping van het 5' uiteinde. Tenslotte treedt er exonucleolytische digestie van het mRNA op (figuur 7). Hoe onderdrukking van translatie optreedt is nog onduidelijk (23, 24).



**Figuur 7:** Deadenylatie en decapping van mRNA in p-bodies. GW182 interageert met Ago wat zorgt voor rekrutering van het deadenylatie –en decapping complex. Eerst treedt er deadenylatie op gevolgd door decapping (24).

### 1.2.3. Rol van miRNA in het immuunsysteem

Een brede waaier van microRNAs spelen zowel in het aangeboren als het adaptief immuunsysteem een rol (tabel 1). Ze zijn sterk betrokken in de differentiatie van pluripotente hematopoietische stamcellen. De rol van microRNAs in het immuunsysteem werd aangetoond in Dicer KO muizen waarbij geen synthese van miRNA optreedt. In deze muizen zijn sterke wijzigingen in het immuunsysteem zichtbaar (25, 26).

MiR-16 komt sterk tot expressie in de meeste cellen, waaronder ook deze cellen betrokken in inflammatie. MiR-16 zorgt voor degradatie van eiwitten die AU-rijke elementen bevatten in hun 3' UTR. De meeste inflammatoire mediators (vb. TNF $\alpha$ , IL-8, IL-6,...) bevatten zo'n

AU-rijke elementen. MiR-16 is dus in staat de productie van pro-inflammatoire mediators te beperken (26). Er is ook een centrale rol weggelegd voor miR-155 (27).

**Table 1:** microRNAs betrokken in regulatie van het immuunsysteem (25).

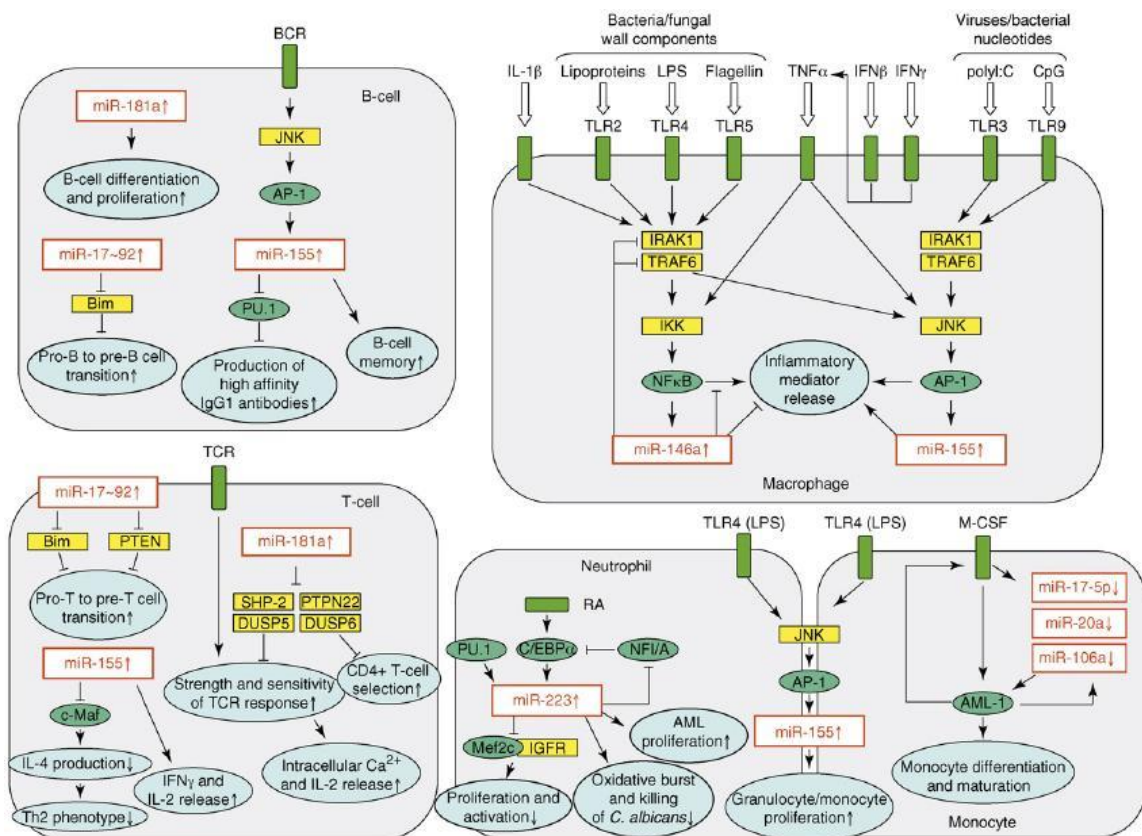
miRNA	Function	Transcriptional regulation	Targets
miR-15a	Decreased expression in chronic lymphocytic leukaemia		Bcl-2
miR-16	Binds to UA rich elements in the 3' UTR and induces TNF $\alpha$ mRNA degradation		TNF $\alpha$
miR-21	Increased expression in B-cell lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia		
miR-17-5p	In combination with miR-20a and miR-106a inhibits monocyte proliferation, differentiation and maturation	AML-1	AML-1
miR-17~92 cluster	Regulates pro- to pre- transition during B- and T-cell development		Bim, PTEN
miR-20a	In combination with miR-17-5p and miR-106a inhibits monocyte proliferation, differentiation and maturation	AML-1	AML-1
miR-24	Inhibits replication of vesicular stomatitis virus		
miR-29a	Down-regulated in B-cell chronic lymphocytic leukemia		Tcl-1
miR-32	Inhibits replication of primate foamy virus type 1		
miR-93	Inhibits replication of vesicular stomatitis virus		
miR-106a	In combination with miR-17-5p and miR-20a inhibits monocyte proliferation, differentiation and maturation	AML-1	AML-1
miR-122	Required for hepatitis C proliferation in liver		
miR-125b	Expression downregulated by LPS and oscillations in expression after exposure to TNF $\alpha$	NF $\kappa$ B	TNF $\alpha$
miR-146a	Expression induced in macrophages and alveolar/bronchial epithelial following activation of TLR-2, -4 and -5 or exposure to TNF $\alpha$ and IL-1 $\beta$ .	NF $\kappa$ B	IRAK1, TRAF6
miR-146b	LPS induced expression induced in macrophages		IRAK1, TRAF6
miR-150	Increased expression leads to suppression of B-cell formation by blocking in pro- to pre-B cell transition. Decreased expression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)		
miR-155	Increased expression in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas and chronic lymphocytic leukaemia (CLL)		
miR-155	Required for normal production of isotype-switched, high-affinity IgG1 antibodies in B-cells, determines Th1 and Th2 differentiation and positive regulator of antigen induced responses in T-cells	AP-1	PU.1, c-Maf
miR-155	Increased expression following activation of the innate immune response. Inhibits inflammatory mediator release and stimulates granulocyte and monocyte proliferation	AP-1	
miR-181a	Positive regulator of B-cell development and CD4 <sup>+</sup> T-cell selection, activation and sensitivity.		SHP-2, PTPN22, DUSP5, DUSP6
miR-196	Induced by IFN $\beta$ and inhibits replication of hepatitis C virus		
miR-223	Negative regulator of neutrophil proliferation and activation	PU.1, C/EBP $\alpha$ , NFI-A,	Mef2c, IGFR
miR-296	Induced by IFN $\beta$ and inhibits replication of hepatitis C virus		
miR-351	Induced by IFN $\beta$ and inhibits replication of hepatitis C virus		
miR-431	Induced by IFN $\beta$ and inhibits replication of hepatitis C virus		
miR-448	Induced by IFN $\beta$ and inhibits replication of hepatitis C virus		

### 1.2.3.1. Aangeboren immuunsysteem

Cellen van het aangeboren immuunsysteem worden geactiveerd via de Toll-like en interleukine-1 receptor pathway (TIR pathway). De miRNAs miR-9, miR-146a en miR-155 reguleren de activatie van myeloïde cellen, waaronder macrofagen, dendritische cellen en neutrofielen. Deze microRNAs zorgen voor downregulatie van eiwitten in de TIR pathway waardoor activatie verstoord is. miR-9 zorgt voor downregulatie van NF $\kappa$ B, miR-146a voor downregulatie van TRAF6 en IRAK1 terwijl miR-155 zorgt voor downregulatie van TAB2, Fas geassocieerd death domain (FADD) en I $\kappa$ B kinase  $\epsilon$  (IKK $\epsilon$ ) (24). Inductie van deze miRNAs gebeurt door blootstelling aan pro-inflammatoire cytokines zoals IFN- $\beta$  en IFN- $\gamma$  (28). miR-155, miR-223 en de miR-17-19 cluster reguleren de proliferatie en differentiatie van myeloïde cellen. Dit gebeurt door downregulatie van tal van transcriptiefactoren. MiR-155 zorgt voor downregulatie van transcriptiefactoren betrokken in de haematopoietische ontwikkeling (vbn. PU.1, HIF1 $\alpha$ , Cebp $\beta$ ,...). Mir-223 komt selectief tot expressie in



neutrofielen en macrofagen en zorgt voor een negatieve regulatie van proliferatie en differentiatie door downregulatie van de transcriptiefactor Mef2c. MiR-223 wordt geïnduceerd door de transcriptiefactor C/EBP- $\alpha$  en geattenuerd door (NF)I-A. Tenslotte zorgt de miR-17-19 cluster voor downregulatie van AML1, de DNA bindende subunit van CBF. Deze transcriptiefactor zorgt in normale omstandigheden voor expressie van genen betrokken in differentiatie (figuur 8) (26).



**Figuur 8:** Overzicht van microRNAs betrokken in de regulatie van de immunerespons. Rode vierkanten = miRNA, groene cirkels = transcriptiefactoren, gele vierkanten = eiwitten en blauwe cirkels = biologische respons (25).

### 1.2.3.2. Adaptief immuunsysteem

MiR-155, miR-181a en de miR-17-92 cluster zijn betrokken in regulatie van de T-cel respons. MiR-155 is noodzakelijk voor differentiatie en proliferatie van CD4 T- cellen. Bovendien hebben miR-155 KO muizen een bias naar het Th2 fenotype. Dit is het gevolg van downregulatie van SOCS1 (26). De miR-17-92 cluster zorgt voor een toegenomen proliferatie en overleving van zowel T-cellen als B-cellen door downregulatie van Bim en PTEN (respectievelijk een pro-apoptotisch eiwit en tumorsupressor) (25). miR-181a zorgt voor selectie van CD4 T-cellen, versterkt de gevoeligheid van TCR gemedieerde activatie en overexpressie is geassocieerd met een reductie van CD8 T-cellen. Dit door downregulatie van verschillende tyrosine fosfatasen zoals SHP-2 en PTP-N22 (25, 26).

Naast de miR-17-92 cluster zijn ook miR-150 en miR-155 betrokken in de regulatie van de B-cel respons. miR-150 stimuleert de transitie van de pro-B-cel naar de pre-B-cel. Dit gebeurt net zoals bij de miR-17-92 cluster door downregulatie van Bim en PTEN (26). MiR-155 zorgt voor downregulatie van de haematopoietische transcriptiefactor PU.1 en van het activation-induced cytidine deaminase (AID). MiR-155 is verantwoordelijk voor class switching naar IgG1 antilichamen, de ontwikkeling van B-cel geheugen en productie van TNF $\alpha$  en LT $\alpha\beta$ . AID katalyseert deaminatie van cytosine residues en introductie van U:G mismatches. Dit is noodzakelijk voor somatische hypermutatie, genconversie en class switching van IgM naar IgG1. MiR-155 wordt geïnduceerd door AP-1 (figuur 8) (26, 27).

#### 1.2.4. Link tussen microRNA en COPD

Zoals reeds gezegd spelen miRNAs een belangrijke rol in zowel de ontwikkeling van de long als in tal van longaandoeningen. Ook in COPD kunnen miRNAs een belangrijke rol spelen in zowel de pathogenese als het persisteren van inflammatie na rookstop. Er is reeds aangetoond dat blootstelling aan sigarettenrook zorgt voor een gewijzigde expressie van verschillende miRNAs. Bovendien is deze differentiële expressie dosis-afhankelijk (20, 29). Blootstelling aan sigarettenrook zorgt voornamelijk voor een daling van miRNA expressie (20). Deze differentiële expressie treedt op in verschillende weefsels en cellen.

In bronchiale epitheelcellen ziet men 28 miRNAs die differentiële tot expressie komen tussen rokers en niet-rokers (30). Ook in alveolaire macrofagen ziet men dat 11 miRNAs zijn opgereguleerd en 43 miRNAs zijn downgereguleerd tussen rokers en niet-rokers. Men ziet een sterke daling van miR-452 wat zorgt voor een verhoogde productie van MMP-12. Dit protease is betrokken in de pathogenese van emfyseem (31).

Ook in geïnduceerd sputum treedt een differentiële expressie van miRNAs op. Tussen rokers en niet-rokers zag men een differentiële expressie van 34 miRNAs waarbij er 27 zijn downgereguleerd in rokers. Tussen COPD patiënten en niet-rokers zijn er 8 gedowngereguleerd. Tussen COPD patiënten en rokers zag men geen verschil. Het belangrijkste miRNA is let-7c dat geassocieerd is met een toegenomen expressie van TNFR-II, een receptor van TNF $\alpha$  (32).



## **2. Materiaal en methoden**

In eerste instantie zullen we nagaan welke miRNAs in aanmerking komen voor inhibitie in het COPD muismodel. Dit zullen we doen door te bepalen welke miRNAs in de longen van zowel humane COPD patiënten als in sigarettenrook blootgestelde muizen zijn opgereguleerd. Vervolgens zullen de geselecteerde miRNAs in het COPD muismodel worden geïnhibeerd doormiddel van specifieke Locked Nucleic Acids (LNA). Detectie van miRNAs gebeurt aan de hand van RT-qPCR. Nagaan van inflammatie in de longen gebeurt door flowcytometrie, cytospin, RT-qPCR en histologisch onderzoek.

### **2.1. Keuze van het miRNA**

Er wordt gekeken naar de 15 miRNAs die opregulatie vertonen in het humaan longweefsel van COPD patiënten (figuur 11). Dit wordt dan vergeleken met de miRNA expressie in muizen die een acuut of chronisch rookprogramma ondergaan hebben. Hierna identificeert men miRNAs die zowel in de COPD patiënten als in deze muizen opregulatie vertonen. Aan de hand van literatuuronderzoek en target predictie sites onderzoekt men welke miRNAs een functie kunnen hebben in de pathogenese van COPD. Deze miRNAs zijn dan interessant om te gaan onderzoeken.

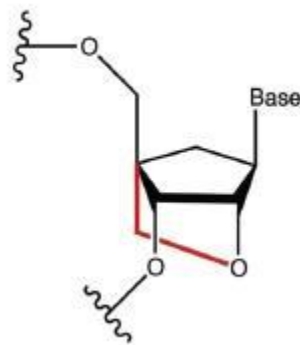
### **2.2. Rookprotocol**

Er wordt gebruik gemaakt van mannelijke C57BL/6 muizen (The Jackson laboratory).

Per rookblootstelling wordt gebruik gemaakt van 5 sigaretten (3R4F Kentucky referentiesigaretten). De muizen zitten met ongeveer 5 à 10 in één rooktoestel en worden blootgesteld aan rook doormiddel van whole body exposure. Perslucht (1.25 L/minuut) wordt aan het rookbakje toegevoegd. Na 7 minuten roken worden de sigarettenpeuken uit het toestel gehaald en krijgen de muizen een tussenpauze van 30 minuten. Dit proces wordt 4x herhaald. Elke groep muizen wordt dus dagelijks 4x gedurende 7 minuten blootgesteld aan rook met tussenpauzes van 30 minuten. In dit project ondergaan de muizen een rookprogramma van 4 weken.

### 2.3. LNA inhibitoren

LNA inhibitoren zijn chemisch gemodificeerde short-interfering RNA moleculen (siRNA). De 2' en 4' positie van de ribose ring zijn verbonden met elkaar doormiddel van een methyleen brug (figuur 9). Dit verhoogt de stabiliteit en opname van het siRNA in de cellen. De halfwaardetijd in serum kan hierdoor toenemen tot 90 uur. Niet gemodificeerde siRNA moleculen hebben in serum een halfleven van slechts 15 minuten. Dit omdat ze onderhevig zijn aan degradatie door exo -en endonucleasen aanwezig in het serum (33, 34). Deze LNA inhibitoren stimuleren geen enzymatische degradatie van hun target miRNA, maar vormen stabiele heteroduplexen met hun target waardoor deze hun functie niet meer kunnen uitvoeren (35).



**Figuur 9:** Voorbeeld van LNA molecule. Rood = methyleen brug (32).

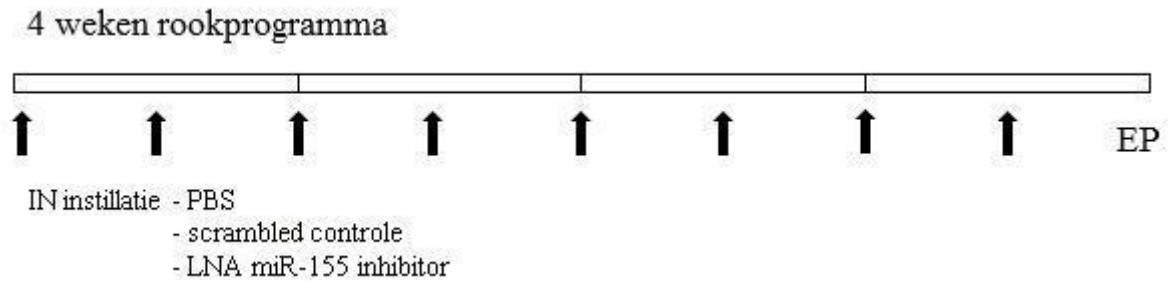
### 2.4. Inhibitieprotocol

De muizen worden onderverdeeld in 6 groepen (tabel 2). Elke groep bestaat uit 8 muizen.

**Tabel 2:** Onderverdeling van de muizen in 6 groepen.

<b>Groep 1</b>	<b>Lucht</b>	<b>PBS</b>
<b>Groep 2</b>	<b>Rook</b>	<b>PBS</b>
<b>Groep 3</b>	<b>Lucht</b>	<b>Scrambled</b>
<b>Groep 4</b>	<b>Rook</b>	<b>Scrambled</b>
<b>Groep 5</b>	<b>Lucht</b>	<b>Inhibitor</b>
<b>Groep 6</b>	<b>Rook</b>	<b>Inhibitor</b>

Tweemaal per week worden de LNA inhibitoren, Scrambled LNA controle of PBS intrasaaal toegediend, dit 30 minuten voor de rookblootstelling (figuur 10). Scrambled LNA controles bevatten dezelfde nucleotiden als de inhibitor maar in een andere sequentie. Deze controle zou dus niet mogen zorgen voor inhibitie van het miRNA. De toegediende dosis is 10mg/kg.



**Figuur 10:** Inhibitieprotocol. Muizen ondergaan 4 weken rookprotocol en krijgen 2x/week PBS, Scrambled controle of inhibitor intranasaal toegediend (pijltjes). EP = eindpunt.

## 2.5. Intranasale instillatie

Voor intranasale instillatie worden de muizen eerst verdoofd met isofluraan. Hierbij wordt de perslucht op 2l/min en isofluraan op 2.5% gezet voor inductie. Eenmaal de muis verdoofd is gebruikt men 2% isofluraan ter onderhoud. Er mag maximaal 50µl intranasaal toegediend worden. Dit is ongeveer het volume dat zorgt voor een volledige bedekking van het totale longoppervlak.

## 2.6. Eindpunt

Bij een eindpunt worden verschillende weefsels van de muis verwerkt.

De muizen worden verdoofd met ongeveer 50µl Nembutal<sup>®</sup> (ceva NV). Via het bloedvat achter het oog wordt bloed gecollecteerd, hierna gaat men de longen laveren langs een canule in de trachea. Dit gebeurt 3x met 300µl Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) + 1% Bovine Serum Albumin (BSA) en vervolgens 3x met 1ml HBSS+ Ethyleendiaminetetra-azijnzuur (EDTA). Vervolgens wordt de bloedcirculatie van de longen gespoeld met fysiologische oplossing die EDTA bevat. Dit gebeurt via een katheter in de rechterkamer van het hart. Deze spoeling verwijdert alle rode bloedcellen uit de long wat noodzakelijk is voor RNA isolatie en histologische verwerking. Na deze spoeling gaat men de rechterlong verwijderen. Het grootste lobje wordt gebruikt voor digestie en in Tissue Culture Medium (TCM) gebracht, het middelste lobje wordt meteen bevroren door het in N<sub>2</sub> te brengen en het kleinste lobje wordt in RNeasy<sup>®</sup> oplossing (life technologies<sup>™</sup>) bewaard bij -80°C (ter preventie van RNA degradatie). Dit laatste lobje wordt uiteindelijk gebruikt voor RNA extractie. Vervolgens wordt de linkerlong via perfusie met 4% formaldehyde gefixeerd voor histologische verwerking. Dit gebeurt door de canule in de trachea aan te sluiten op een pomp met snelheid 12ml/u. Na 10 minuten is 2ml fixatievloeistof ingebracht. De linkerlong wordt dan overgebracht naar een tube die formaldehyde bevat en wordt er gedurende 2 uur al roterend

verder gefixeerd. Hierna worden de weefsels gespoeld in PBS en worden ze gestockeerd in verse PBS buffer bij 4°C.

## **2.7. Detectie van miRNA**

### **2.7.1. RNA extractie**

RNA extractie wordt uitgevoerd met de miRNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (QIAGEN<sup>®</sup>). Men kan zowel RNA extraheren uit individuele cellen (reeds bewaard in Qiazol Lysis Reagent) als uit totaal longweefsel. Het weefsel wordt in 700µl Qiazol Lysis Reagent gebracht en daarna gehomogeniseerd met de Tissue Ruptor<sup>®</sup>. Hierna wordt de oplossing (longhomogenaat of cellen) overgebracht in 1,5ml epjes en 5min geïncubeerd op kamertemperatuur (KT). Vervolgens voegt men 140µl chloroform toe en gaat men 15s stevig schudden gevolgd door 2-3 min incubatie op KT. Daarna wordt de oplossing 15min gecentrifugeerd aan 12000g bij 4°C. Dan wordt de bovenste waterige fase waarin het RNA zich bevindt getransfereerd (350µl) en voegt men 100% ethanol toe (1,5x het volume van het staal) waarna men gaat resuspenderen. Het staal wordt overgebracht op een miRNeasy Mini spin kolom en men gaat 15s centrifugeren aan 8000g op KT. Hierna gaat men het RNA verschillende malen spoelen met RWT –en RPE buffer waarna men de kolom gaat transfereren naar een nieuwe 1,5 ml buis. Tenslotte voegt men 50µl RNase-vrij H<sub>2</sub>O toe om het zuivere RNA te elueren en centrifugeert men 1 min op 8000g. Vermits RNA sterk water-oplosbaar is bekomt men nu een zuivere RNA oplossing. De RNA concentratie wordt bepaald met de NanoDrop 2000<sup>®</sup> (Thermo Scientific).

### **2.7.2. RT-qPCR**

Voor men RT-qPCR kan uitvoeren moet men eerst cDNA synthetiseren. Men vertrekt van 1000ng RNA. Aan de RNA oplossing voegt men 4µl 5x miScript Hiflex buffer, 2µl miScript Reverse Transcriptase Mix, 2µl Nucleics Mix en een bepaalde hoeveelheid H<sub>2</sub>O toe (QIAGEN<sup>®</sup>). Om zo totaalvolume van 20µl te bekomen. Deze oplossing wordt 60 min verwarmd op 37°C zodat primer annealing en reverse transcriptie kan plaatsvinden, vervolgens gaat men denatureren door de oplossing 5 min op 95°C te incuberen. Het verkregen cDNA wordt bewaard op 4°C.

Eerst wordt een pool gemaakt van elk cDNA staal om de standaardcurve op te stellen. Deze standaardcurve wordt opgesteld door een verdunningsreeks te maken van de cDNA pool. Uit

deze standaardcurve kan men dan de specifieke hoeveelheid RNA van de stalen berekenen door vergelijking van de C<sub>q</sub> waarden. Deze hoeveelheid wordt relatief uitgedrukt tov de controles. Als controle gebruikt men snoRNAs (vb snoRD 95), deze komen stabiel tot expressie in alle cellen. Ook is er de non-template controle, deze bevat geen template DNA en mag dus geen amplificatie vertonen. Het overige cDNA van de stalen wordt verdund tot 5ng/μl. Aan 2μl cDNA in een 96 well plaat gaat men 10μl 2x Quantitect SYBR Green PCR Master mix, 2μl 10x miScript Universal Primer, 2μl 10x miScript Primer en 4μl H<sub>2</sub>O toevoegen. Vervolgens sluit men de 96 well plaat af en voert men PCR uit met de LightCycler<sup>®</sup>96 (Roche). Het gebruikte PCR protocol is een 3-staps amplificatie: 45 cycli van 15s denaturatie (94°C), 30s annealing (55°C) en 30s extensie (70°C). Na dit PCR protocol wordt een smeltcurve opgesteld: 5s 95°C, 60s 62°C en 1s 97°C.

RT-qPCR van mRNA verloopt grotendeels gelijkaardig maar er wordt gebruik gemaakt van een TaqMan<sup>®</sup> hydrolyse probe in plaats van SYBR green en HPRT1 of GAPDH als controle. Als PCR protocol wordt gebruik gemaakt van een 2-staps protocol: 60 cycli van 10s 95°C en 15s 60°C.

## **2.8. Detectie van inflammatie**

### 2.8.1. Celtelling van broncho-alveolaire lavage (BAL) en cytospin

Na lavage van de longen worden de cellen geteld. De BAL stalen worden eerst 5min gecentrifugeerd aan 1800r/min bij 4°C. Het supernatans van de eerste 3 fracties wordt bij elkaar gegoten en gebruikt voor ELISA, het supernatans van de overige 3 fracties wordt afgezogen. De twee pellets worden samengevoegd en vervolgens aangelengd tot 200μl met Facs buffer. 30μl wordt gebruikt voor de telling en cytospin, de rest voor flow cytometrie (zie verder). De cellen worden verdund in Türk-oplossing om rode bloedcellen (RBC) te lyseren. De verdunningsfactor kan variëren: 1/5 of 1/10 voor controles, hogere verdunning bij dieren die het rookprotocol ondergaan hebben (aanwezigheid van een hoger aantal cellen). De cellen worden geteld met de Bürker telkamer. Men telt het aantal cellen in 25 vierkanten waarbij op de rand liggende cellen slechts op 2 zijden worden meegeteld, de telling gebeurt in drievoud. Hiervan neemt men het gemiddelde en door een reeks van berekeningen (gemiddeld aantal cellen x verdunningsfactor x factor specifiek voor de gebruikte Bürker telkamer) verkrijgt men zo het absolute aantal cellen per milliliter.

Voor het maken van cytopins heeft men 50000 cellen/ml nodig, hiervoor gaat men de oplossing gepast verdunnen met HBSS. Men gaat de draagglasjes (STARFROST) 'prewetten' met 100µl 2% BSA in PBS oplossing + 3 min centrifugeren aan 800 toeren/min. Men voegt 150µl a 200µl van het BAL staal toe in de cup en centrifugeert gedurende 5 min aan 800 toeren/min. Na drogen wordt een May-Grünwald-Giemsa kleuring uitgevoerd om een differentiële telling van de bloedcellen te kunnen doen. Deze kleuring bestaat uit een basische (methyleenblauw) en zure (eosine) component. Methyleenblauw bindt op negatief geladen elementen zoals DNA en RNA terwijl eosine bindt op positief geladen eiwitten.

### 2.8.2. Flowcytometrie

Alvorens te kunnen tellen en labelen gaat men het longweefsel zowel mechanisch als enzymatisch verknippen. Men gaat het gedigesteerde longweefsel in TCM (zie eindpunt) 5 min centrifugeren aan 1800 r/min bij 4°C. Hierna gaat men het medium tussen de longstukjes wegzuigen en 3ml digestiemedium (TCM + liberase + DNase) toevoegen en 15 min laten incuberen bij 37°C. Vervolgens wordt het longweefsel fijn gemaakt met de spuit en wordt terug 2ml digestiemedium toegevoegd waarna er nog eens voor 15min geïncubeerd wordt. Na incubatie wordt de oplossing gecentrifugeerd en geresuspendeerd in 1ml 10mM EDTA om digestie te stoppen. Hier wordt 2ml FACS buffer aan toegevoegd en gaat men terug centrifugeren. Vervolgens voegt men aan de celpellet 1ml Ammonium-Chloride-Kalium (ACK) lyse buffer toe om RBC te lyseren en na 3 min een overmaat FACS buffer, dan wordt de oplossing gefilterd. Na digestie wordt het aantal cellen van het longweefsel geteld met de coulter (Beckman Coulter). Hiervoor gaat men de cellen resuspenden in 1ml FACS buffer en 20µl samen met 10ml Isoton in een cuvet brengen.

Zie 'celtelling van BAL en cytopin' voor voorbereiding van de BAL stalen. Men gaat de celoplossing centrifugeren en 500µl ACK aan de pellet toevoegen, na 3 min gaat men een overmaat FACS buffer toevoegen en wordt de oplossing gefilterd. 200µl wordt gebruikt per labeling.

Voor detectie van dendritische cellen en macrofagen in de long/BAL stalen gaat men CD11c en MHC-II labelen, voor detectie van neutrofielen labelt men CD11c, CD11b, Ly6C en Ly6G. Voor detectie van CD8<sup>+</sup> -en CD4<sup>+</sup> T-cellen in het longweefsel labelt men CD3 en respectievelijk CD8 en CD4. CD69 wordt gebruikt als activatiemerker. 7AAD wordt als live/dead kleuring gebruikt. Elke antilichaam mix bevat ook Fc-block om te verhinderen dat

antilichamen met hun Fc gedeelte gaan binden op de cellen. Flowcytometrie wordt uitgevoerd met de FACSCalibur™ (BD) en LSRFortessa™ (BD), analyse van de resultaten gebeurt met Flowjo software.

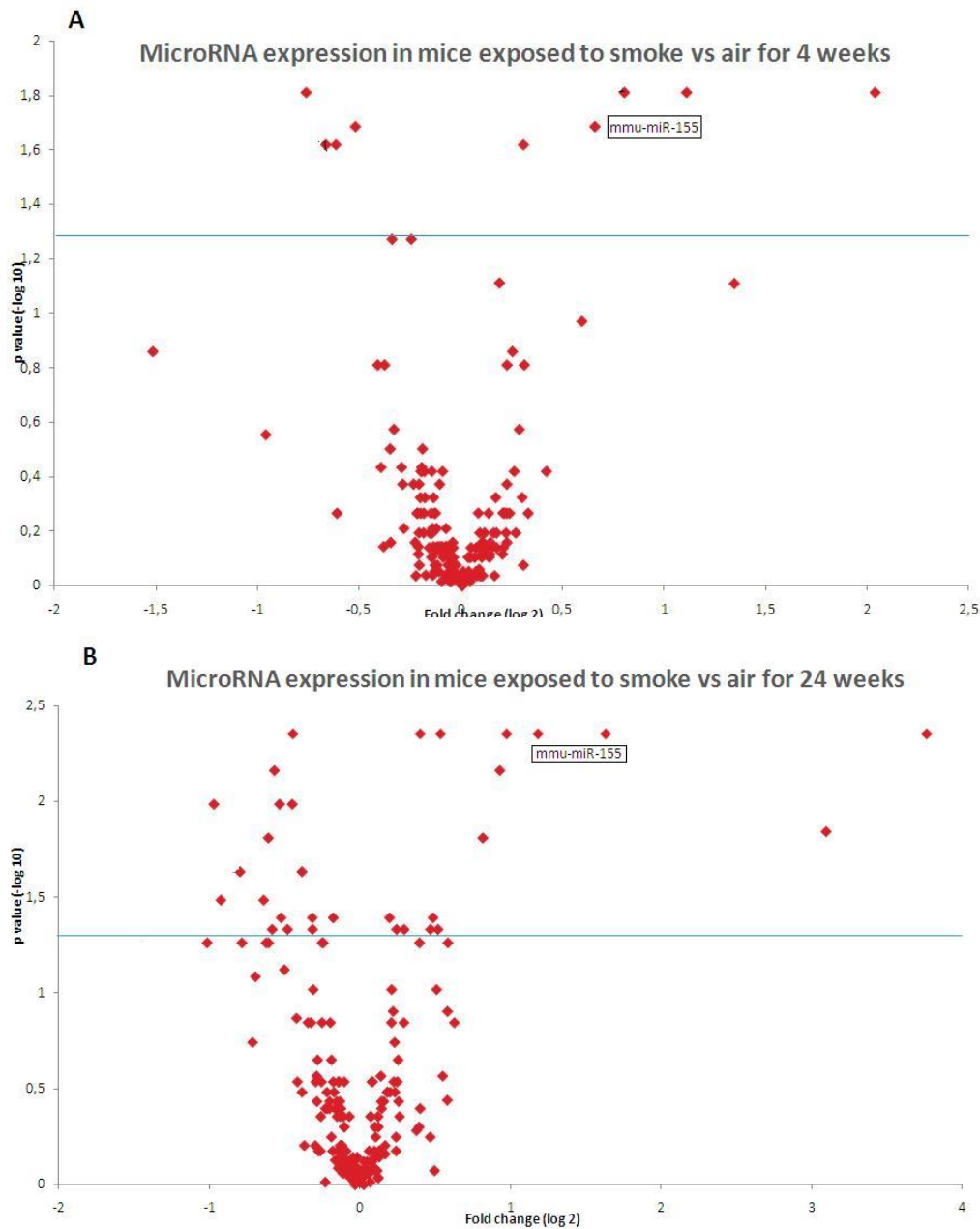
Dendritische cellen zijn CD11c+ en MHC-II+, macrofagen zijn CD11c+ en vertonen autofluorescentie. Neutrofielen zijn CD11c-, CD11b+, Ly6G+ en Ly6C-. Monocyten zijn CD11c-, CD11b+, Ly6G- en Ly6C+. CD4 T-cellen en CD8 T-cellen zijn CD3+, en respectievelijk CD4+ en CD8+.

## **2.9. Statistische analyse**

Vermits het aantal muizen per groep beperkt is tot 8 verwacht men geen standaard normale verdeling. Daarom maakt men gebruik van niet-parametrische testen. Eerst worden verschillen nagegaan met een Kruskal-Wallis test. Wanneer er globale significantie aanwezig was werd significantie tussen twee verschillende groepen nagegaan door middel van een Mann-Whitney U test. Wanneer  $p < 0.05$  werden resultaten als significant aanschouwd. Statistische analyses werden uitgevoerd met SPSS Statistics 21 (IBM). Grafieken werden gemaakt met Graphpad Prism 4.







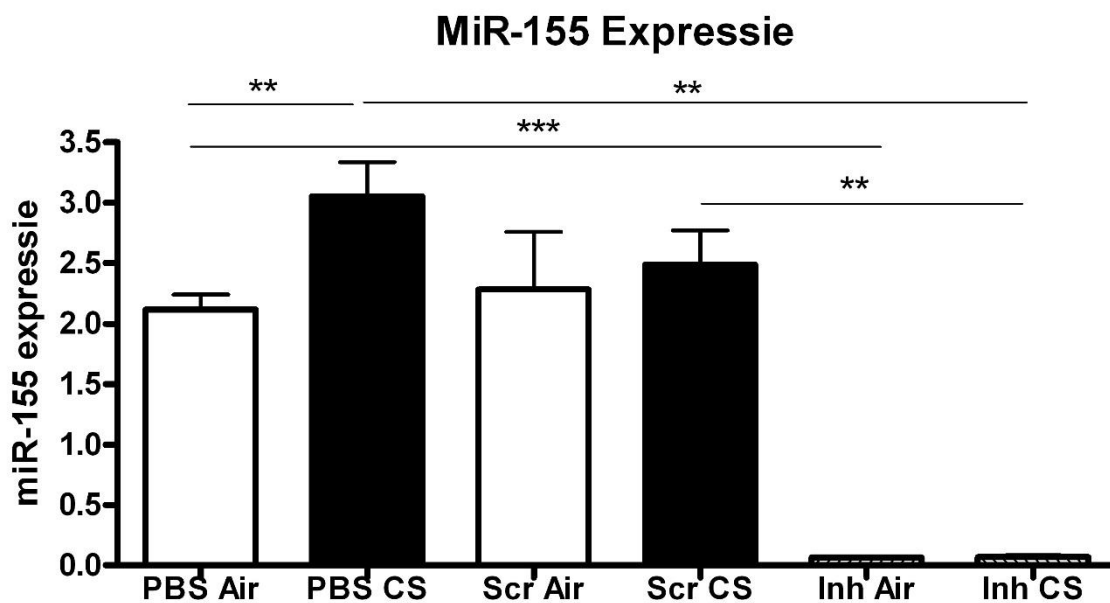
**Figuur 12:** Vulcano plot van differentiële miRNA expressie in muizen die een 4 weken rookprogramma (A) en 24 weken rookprogramma (B) ondergaan hebben. Blauwe lijn = 95% significantieniveau.

Er zijn verschillende miRNAs die zowel zijn opgereguleerd in COPD patiënten als in muizen die een rookprogramma ondergaan hebben. In de literatuur vinden we verschillende voorbeelden van een voordelig effect van miR-155 onderdrukking in inflammatoire aandoeningen. Voorbeelden zijn inflammatoire darmaandoening (37), multiple sclerosis (38), reumatoïde arthritis (39) en astma (40). Bovendien is reeds aangetoond dat miR-155 een belangrijke rol speelt in het immuunsysteem (26). Het is dus mogelijk dat onderdrukking van miR-155 ook een gunstig effect heeft op de ontwikkeling van COPD.

## 3.2. MiR-155 inhibitie experiment

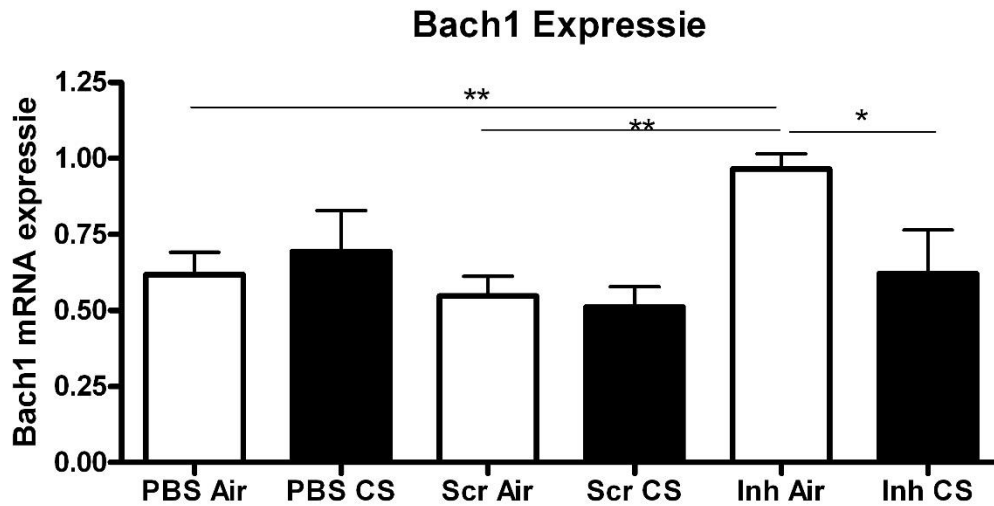
Muizen ondergingen een 4 weken rookprotocol waarbij tweemaal per week miR-155 inhibitor, Scrambled controle of PBS intranasaal werd toegediend. Elke groep bestond uit 8 muizen. Expressie van miR-155 en zijn targetgenen wordt nagegaan doormiddel van RT-qPCR. Het effect van miR-155 inhibitie op rookgeïnduceerde inflammatie wordt onderzocht door celtelling, cytopins van broncho-alveolair lavagevocht (BAL) en flowcytometrie op BAL en longweefsel.

### 3.2.1. Expressie van miR-155 en targetgenen na miR-155 inhibitie



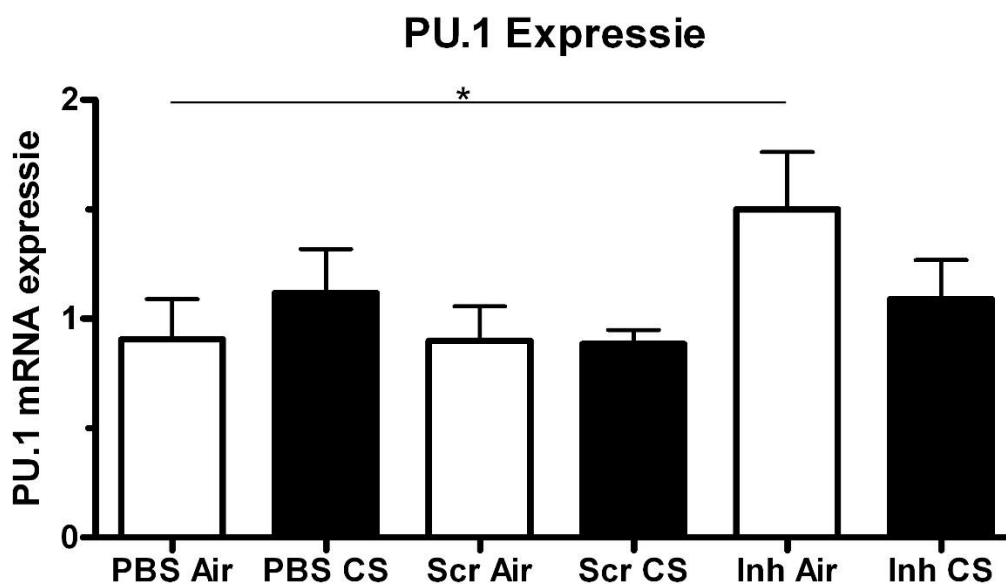
**Figuur 13:** RT-qPCR resultaat van miR-155 expressie. Expressie is relatief tov SNORD95. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ . Scr = Scrambled, CS = Cigarette Smoke, Inh = inhibitor.

Om na te gaan of we miR-155 succesvol konden inhiberen kijken we naar miR-155 expressie in het longweefsel doormiddel van RT-qPCR. In de PBS controlegroep zien we een significante stijging van miR-155 expressie na rookblootstelling. Dit resultaat komt overeen met de profilering. Ook in de scrambled controlegroep zien we een lichte maar niet significante stijging van expressie na rookblootstelling. In de inhibitorgroep zien we een zeer sterke en significante daling van miR-155 expressie. Inhibitie van het miRNA is dus succesvol verlopen (figuur 13).



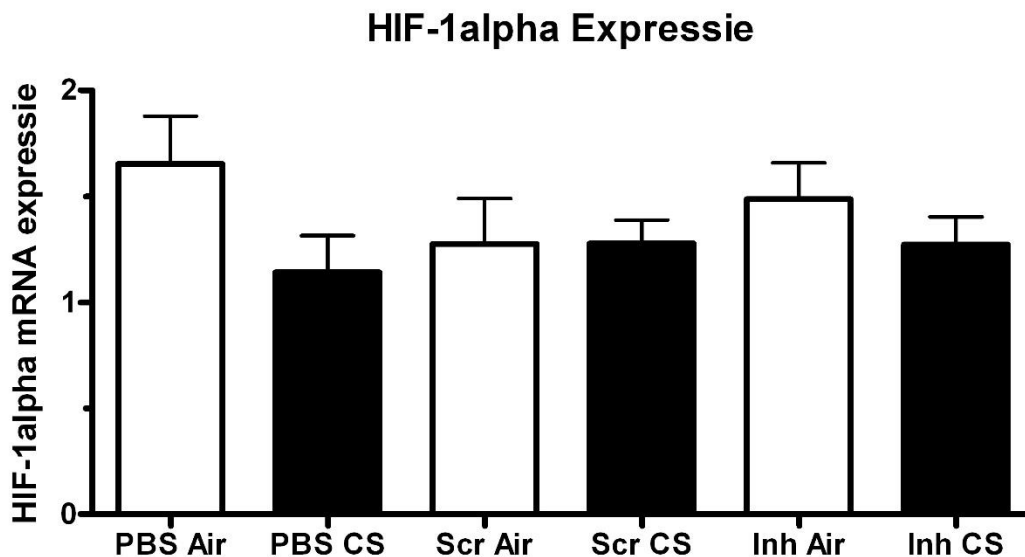
**Figuur 14:** RT-qPCR resultaat van Bach1. Expressie is relatief tov HPRT1. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ . Scr = Scrambled, CS = Cigarette Smoke, Inh = inhibitor.

Om miR-155 inhibitie te valideren kijken we naar expressie van miR-155 targetgenen. Bach1 is een transcriptiefactor betrokken in de oxidant/anti-oxidant balans en een targetgen van miR-155. Bij downregulatie van miR-155 verwacht men een stijging in de expressie van targetgenen. In de PBS groep verwacht men een daling van expressie na rookblootstelling doordat miR-155 is opgereguleerd. Dit is echter niet het geval. Er treedt wel een significante stijging van expressie op in de Air-inhibitor groep. In de CS-inhibitorgroep is er geen gewijzigde expressie (figuur 14).



**Figuur 15:** RT-qPCR resultaat van PU.1. Expressie is relatief tov GAPDH. \* =  $p < 0.05$ . Scr = Scrambled, CS = Cigarette Smoke, Inh = inhibitor.

PU.1 is een transcriptiefactor betrokken in de hematopoietische ontwikkeling. Het is een target van miR-155 en verhindert de productie van hoog affiene IgG1 antilichamen (26). Ook hier verwacht men in de PBS groep een daling van expressie na rookblootstelling. Dit ten gevolge van een gestegen miR-155 expressie. Bij miR-155 inhibitie verwacht men een stijging van PU.1 expressie. Men ziet enkel een significante opregulatie tussen de Air-PBS groep en de Air-inhibitor groep. In de CS-inhibitor groep ziet men geen significante wijziging. Deze resultaten komen overeen met Bach1 expressie (figuur 15).

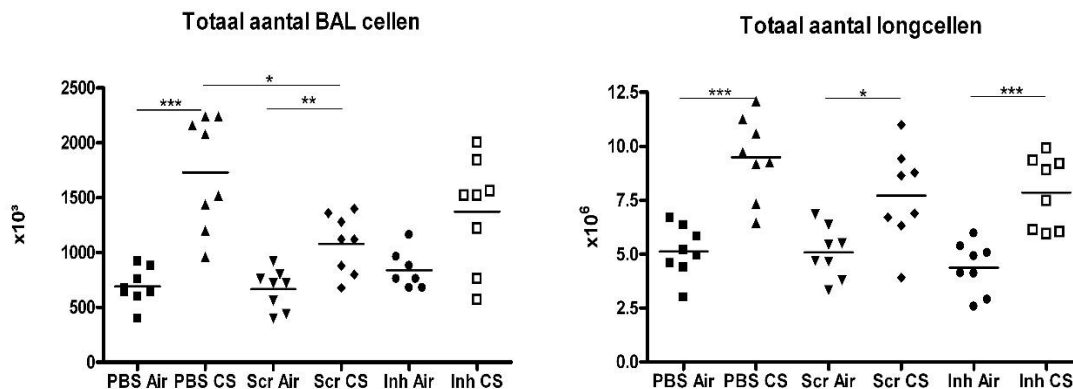


**Figuur 16:** RT-qPCR resultaat van HIF-1 $\alpha$ . Expressie is relatief tov GAPDH. Scr = Scrambled, CS = Cigarette Smoke, Inh = inhibitor.

HIF-1 $\alpha$  is een transcriptiefactor betrokken in de hematopoietische celontwikkeling en een target van miR-155. Er treden geen significante wijzigingen op in genexpressie na inhibitie van miR-155. In de rook-blootgestelde muizen zien we wel steeds een lichte maar niet significante daling van expressie. Dit kan een gevolg zijn van de gestegen miR-155 expressie na rookblootstelling (figuur 16).

### 3.2.2. Effect van miR-155 inhibitie op rook-geïnduceerde inflammatie

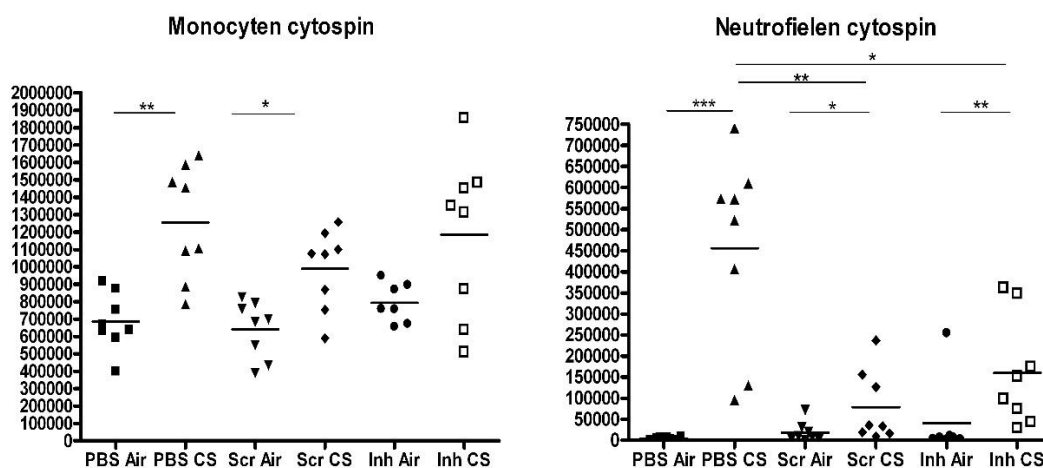
#### 3.2.2.1. Totaal celaantal



**Figuur 17:** Celtelling van BAL cellen via Bürker telkamer en celtelling van longcellen via Coulter teller. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

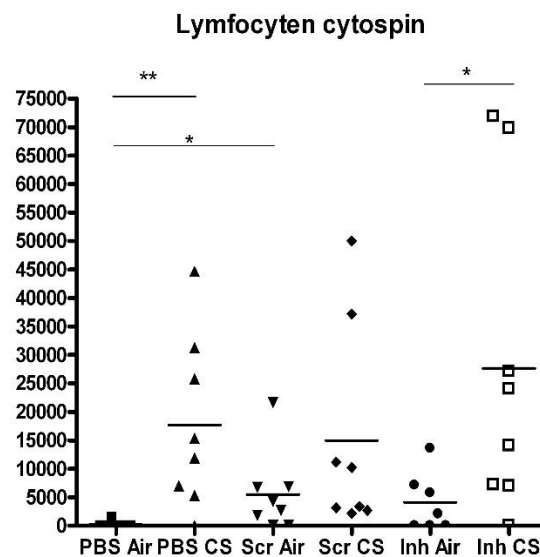
Er is een duidelijk rookeffect waarneembaar in het totale aantal BAL cellen. Zowel in de PBS groep als de scrambled en inhibitor groep zien we een stijging van het totale aantal BAL cellen na rookblootstelling. Bij het totale aantal longcellen ziet men gelijkaardige resultaten. De rookblootstelling is dus goed verlopen. In BAL ziet men een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van het totaal aantal cellen in de scrambled rookgroep in vergelijking met de PBS groep. In de inhibitor-rookgroep is deze attenuatie iets minder uitgesproken en niet significant. Bij de longcellen ziet men ook een lichte maar niet significante attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van totaal aantal cellen na toediening van zowel scrambled controle als inhibitor (figuur 17).

#### 3.2.2.2. Cytospin data in BAL



**Figuur 18:** Totale aantal monocyten en neutrofielen in de cytopsins van BAL. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

Bij monocyten is er in de PBS en scrambled groep een significante stijging van het aantal cellen na rookblootstelling. In de inhibitorgroep ziet men ook een stijging maar deze is niet significant. Bij de neutrofielen ziet men in alle groepen een significante stijging van het aantal cellen na rookblootstelling. Er is geen significante attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging van monocyten in BAL na behandeling met scrambled of inhibitor. Men ziet wel een attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van het aantal neutrofielen op het 99% significantieniveau na toediening van de scrambled controle en een attenuatie op het 95% significantieniveau na toediening van de inhibitor (figuur 18).

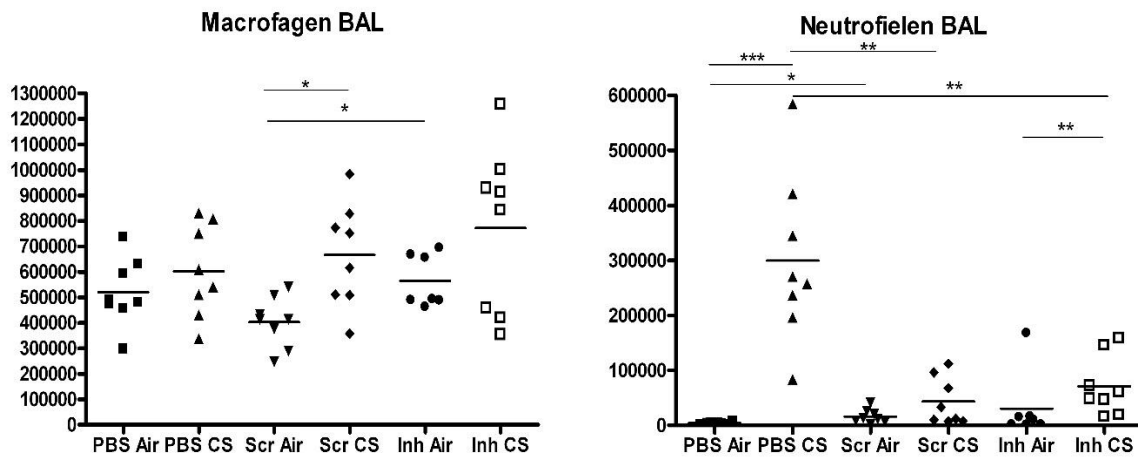


**Figuur 19:** Totale aantal lymfocyten in de cytopsin van BAL. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

Ook bij de lymfocyten ziet men een uitgesproken rookeffect. De stijging van lymfocyten na rookblootstelling is significant in de PBS en inhibitor groep. In de scrambled controle is er een lichte maar niet significante stijging. Bij de lucht blootgestelde muizen ziet men een significante stijging na toediening van de scrambled controle en een niet significante stijging na toediening van de inhibitor. Dit kan wijzen op lichte inflammatie veroorzaakt door toediening van siRNA moleculen. Toediening van inhibitor heeft geen effect op het aantal lymfocyten (figuur 19).

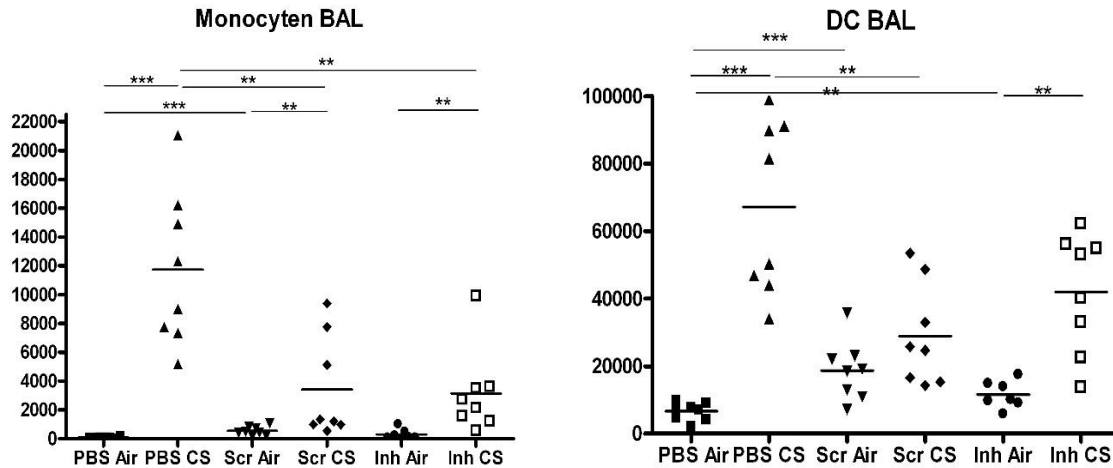
### 3.2.2.3. Flowcytometrie

#### 3.2.2.3.1. BAL resultaten



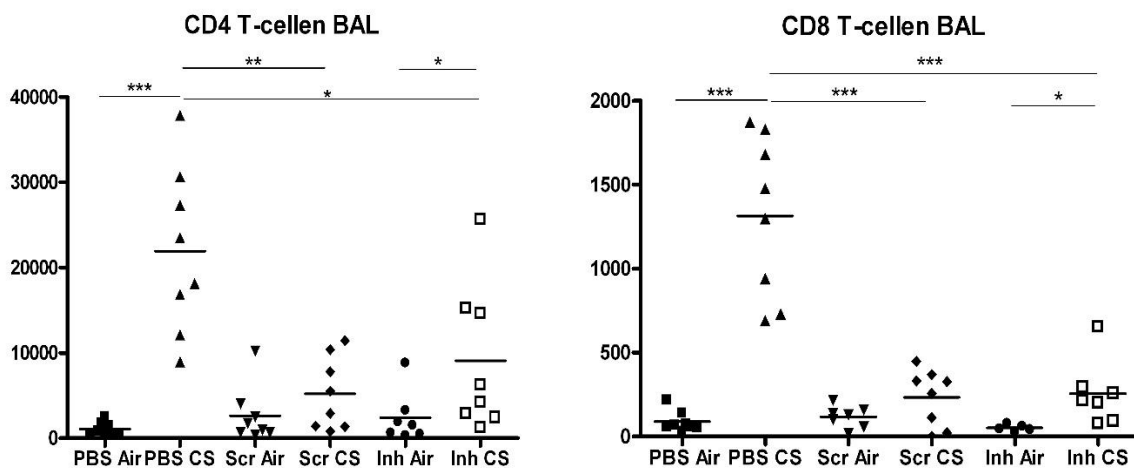
**Figuur 20:** Totale aantal macrofagen en neutrofielen uit broncho-alveolaire lavage. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$

Men ziet een lichte stijging van het aantal macrofagen na rookblootstelling. Enkel in de scrambled groep is deze stijging significant. Toediening van scrambled of inhibitor zorgt niet voor significante attenuaties van de rook-geïnduceerde toename van het aantal macrofagen. Het aantal neutrofielen wordt wel sterk beïnvloedt na toediening van scrambled of inhibitor. Rookblootstelling zorgt voor een significante toename van het aantal neutrofielen in BAL. Men ziet een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging in het aantal neutrofielen bij scrambled/inhibitor rookgroepen in vergelijking met de PBS rookgroep. Deze resultaten zijn gelijkaardig met de cytospin resultaten. Toediening van de scrambled controle en inhibitor in de Air-groepen zorgt voor een lichte stijging van het aantal neutrofielen in vergelijking met de PBS luchtgroep. In de Air-groepen zorgt toediening van vreemde siRNA moleculen dus voor een lichte neutrofiele inflammatie, in de rookgroepen zorgt het voor een attenuatie van sigarettenrook geïnduceerde inflammatie (figuur 20).



**Figuur 21:** Totale aantal monocyten en dendritische cellen uit BAL. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$

Er is ook een significante stijging van het aantal monocyten en dendritische cellen na rookblootstelling. Toediening van zowel scrambled als inhibitor zorgt voor een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van het aantal monocyten. Bij de dendritische cellen ziet men enkel een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde toename na toediening van de scrambled controle. In de inhibitorgroep is deze attenuatie niet significant. Net zoals bij de neutrofielen ziet men in de Air-groepen een lichte stijging van monocyten en dendritische cellen na toediening van zowel scrambled controle als inhibitor (figuur 21).

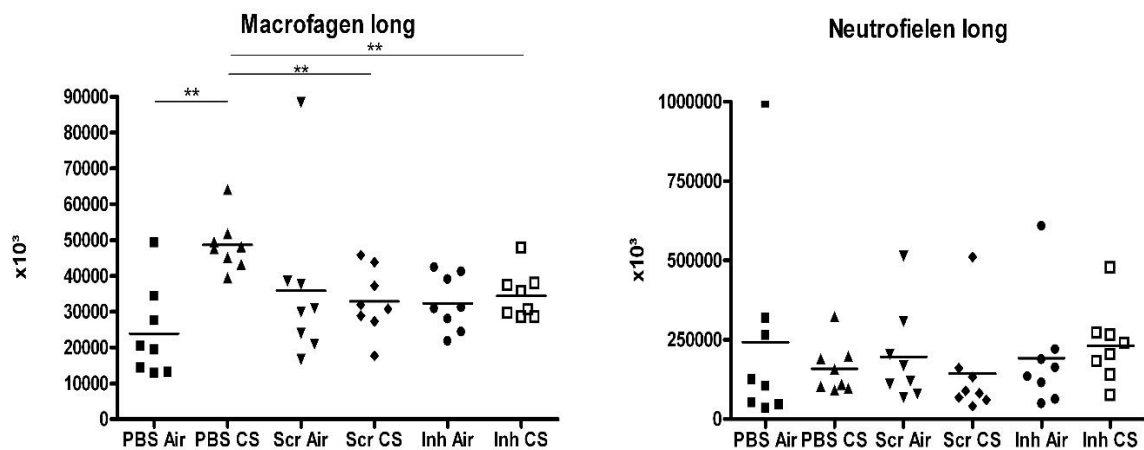


**Figuur 22:** Totale aantal CD4 T-cellen en CD8 T-cellen in BAL. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$

Men ziet een significante stijging van het aantal CD4 T-cellen en CD8 T-cellen na rookblootstelling. Toediening van de scrambled controles en de inhibitor zorgt voor significante attenuaties van de rook-geïnduceerde stijging van zowel de CD4 T-cellen als CD8 T-cellen in BAL (figuur 22).

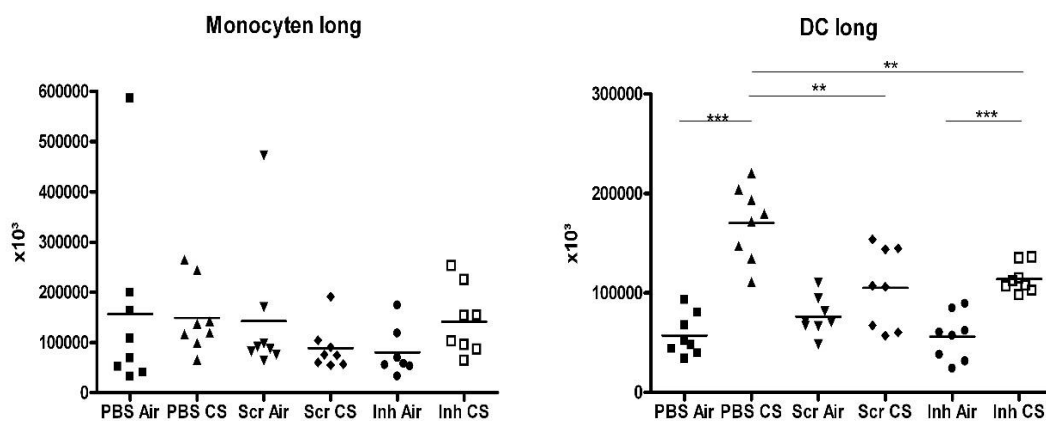


### 3.2.2.3.2. Longresultaten



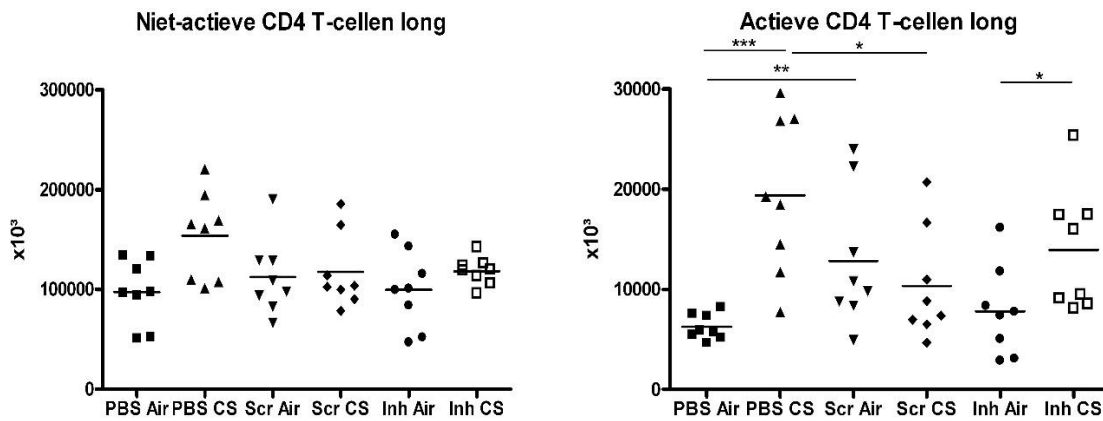
**Figuur 23:** Totale aantal macrofagen en neutrofielen uit het longweefsel. \*\* =  $p < 0.01$ .

Enkel in de PBS groep ziet men een stijging van het aantal macrofagen na rookblootstelling. In de scrambled en inhibitorgroep treedt er geen significante wijziging van macrofagen op na rookblootstelling. Toediening van zowel de scrambled controle als de inhibitor zorgt voor een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging van het aantal macrofagen. Zowel rookblootstelling als behandelingswijze hebben geen invloed op het aantal neutrofielen in het longweefsel. Dit komt doordat neutrofielen voornamelijk migreren naar het lumen (figuur 23). MiR-155 inhibitie heeft wel een sterk effect op het aantal neutrofielen bekomen uit het lavagevocht (figuur 20).



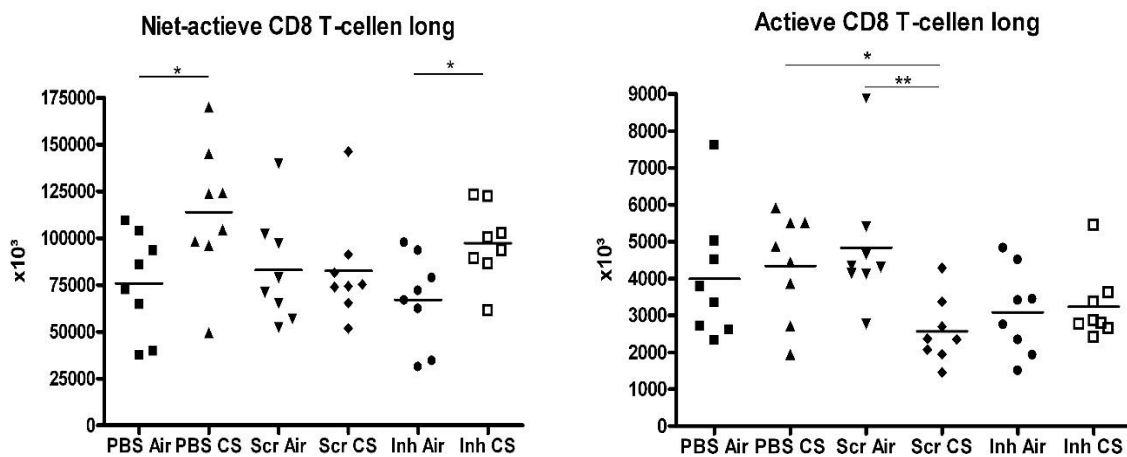
**Figuur 24:** Totale aantal monocyten en dendritische cellen in het longweefsel. \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$

Men ziet geen effect van rookblootstelling of behandeling op het aantal monocyten in het longweefsel. Rookblootstelling zorgt wel voor een significante stijging van het aantal dendritische cellen. Bovendien zorgt toediening van de scrambled controle of inhibitor voor een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde toename van het aantal dendritische cellen (figuur 24).



**Figuur 25:** Totale aantal niet-actieve en actieve CD4 T-cellen in het longweefsel. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$

Rookblootstelling en behandeling hebben geen invloed op het aantal niet-actieve CD4 T-cellen in het longweefsel. Wel ziet men een stijging van het aantal actieve CD4 T-cellen na rookblootstelling. Ook toediening van de scrambled controle zorgt voor een significante stijging in de Air-groepen, maar voor een significante attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging van het aantal actieve CD4 T-cellen. Deze attenuatie is licht, maar niet significant na toediening van de inhibitor (figuur 25).



**Figuur 26:** Totale aantal niet-actieve CD8 T-cellen en actieve CD8 T-cellen in longweefsel. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

Men ziet een lichte stijging van het aantal niet-actieve CD8 T-cellen na rookblootstelling in de PBS en inhibitor groep. Toediening van zowel scrambled controle als inhibitor hebben geen invloed op het aantal niet actieve CD8 T-cellen in de long. Er treedt wel een significante attenuatie op van de rook-geïnduceerde toename van het aantal actieve CD8 T-cellen na toediening van de scrambled controle. Deze attenuatie is licht, maar niet significant na toediening van de inhibitor (figuur 26).

## 4. Bespreking

COPD is een inflammatoire aandoening van de longen die ongeveer 20% van de rokers treft. Men verwacht dat tegen 2020 COPD de derde belangrijkste doodsoorzaak wereldwijd wordt. Voorlopig zijn er nog geen effectieve behandelingsmethoden beschikbaar (2). Daarom is onderzoek naar de onderliggende pathogene mechanismen van COPD zeer belangrijk. In deze thesis werd de rol van miRNA-155 in de pathogenese van COPD onderzocht. Dit werd gedaan doormiddel van inhibitie van miR-155 bij rook blootgestelde muizen door intranasale toediening van LNA inhibitoren.

Om te bepalen welk miRNA een goed target kan zijn in een inhibitie-experiment, vergelijken we differentiële expressie van miRNAs tussen humane COPD patiënten en niet-rokers met differentiële expressie van miRNA tussen rook-blootgestelde muizen en muizen die niet aan rook werden blootgesteld. In figuur 11 zien we dat in humane COPD patiënten 15 miRNAs zijn opgereguleerd en 44 miRNAs zijn downgereguleerd. Ook bij rook-blootgestelde muizen ziet men dat verschillende miRNAs differentieel tot expressie komen (figuur 12). MiRNAs die zowel opregulatie vertonen in humane COPD patiënten als in rook-blootgestelde muizen kunnen een uitstekende target zijn voor een inhibitie-experiment. Uit een literatuuronderzoek hebben we ontdekt dat knockout/inhibitie van miR-155 een voordelig effect heeft in verschillende inflammatoire aandoeningen. Voorbeelden hiervan zijn inflammatoire darmaandoening, multiple sclerose, rheumatoïde arthritis en astma (37-40). Blüml *et al* toonden aan dat miR-155 een essentiële rol speelt in zowel aangeboren als adaptieve immuunreacties die aanleiding geven tot arthritis. MiR-155 KO muizen vertoonden geen collageen geïnduceerde arthritis. Dit door de vorming van auto-reactieve T en B cellen te verhinderen. Bovendien zag men een reductie van het aantal osteoclasten (39). In colitis is miR-155 KO protectief door een reductie van het aantal Th1 –en Th17 cellen (37). Ook in astma kan KO van miR-155 beschermend werken door een reductie van het aantal Th2 cellen en mucus hypersecretie. Ook ziet men een daling van eotaxine-2/CCL24 expressie wat zorgt voor een verminderde allergeen-geïnduceerde eosinofiele inflammatie in de long (40). In al deze studies werd gebruik gemaakt van miR-155 KO muizen. Deze muizen vertonen helemaal geen expressie van miR-155. Enkel in de studie van Zhang *et al* werd gebruik gemaakt van miR-155 mimics en 2'OMe gemodificeerde inhibitoren. Inhibitie van miR-155 resulteerde in een reductie van het aantal Th1 –en Th17 cellen wat zorgt voor mildere tekenen van experimenteel auto-immuun encephalitis. Overexpressie zorgde voor een toegenomen aantal

Th1 –en Th17 cellen en een ernstiger ziektebeeld (38). In dit onderzoek wil men nagaan of inhibitie van miR-155 ook een gunstig effect heeft tegen de ontwikkeling van COPD.

Alvorens te kijken naar de effecten van miR-155 inhibitie op rook-geïnduceerde inflammatie in de long, gingen we na of de inhibitie correct verlopen is. Dit gebeurde door middel van RT-qPCR op longweefsel. In figuur 13 zien we dat miR-155 expressie in longweefsel duidelijk geïnhibeerd is in de groepen waar inhibitor is toegevoegd. De inhibitie is dus goed verlopen. Om deze resultaten te bevestigen hebben we expressie van verschillende targetgenen van miR-155 nagegaan (Bach1, PU.1 en HIF-1 $\alpha$ ). Bij downregulatie van miR-155 verwachten we dat deze targetgenen opgereguleerd zijn. In figuur 14 zien we dat Bach1 expressie enkel is toegenomen in de lucht blootgestelde inhibitorgroep. In de rook-blootgestelde inhibitorgroep ziet men geen toename van expressie. Bach1 is een transcriptiefactor betrokken in haem-oxygenase-1 (HO-1) expressie in alveolaire macrofagen. HO-1 is een belangrijk anti-oxidant en biedt een beschermende rol tegen oxidatieve stress. Expressie van Bach1 is toegenomen na rookblootstelling en onderdrukt expressie van HO-1. Bach1 zorgt dus voor een toename van oxidatieve stress (41). Vermits inhibitie van miR-155 zorgt voor een verhoogde expressie van Bach1 is dit dus een nadelig effect van miR-155 inhibitie in de pathogenese van COPD. Dit is het gevolg van het feit dat miRNAs expressie van verschillende genen reguleren. Inhibitie van één specifiek miRNA zorgt dus voor een brede waaier van effecten die zowel positief als negatief kunnen zijn in de pathogenese van COPD. Belangrijk te vermelden is dat deze resultaten bekomen zijn via *in vitro* experimenten en niet via *in vivo* experimenten zoals bij ons het geval is. PU.1 is een transcriptiefactor betrokken in de hematopoïetische cel-ontwikkeling en een negatieve regulator van cytokineproductie door Th2 cellen. Malmh al *et al* heeft aangetoond dat knockout van miR-155 een positieve invloed kan hebben op allergen-geïnduceerde eosinofiele inflammatie door opregulatie van PU.1 (40). Bij PU.1 ziet men een gelijkaardig effect als bij Bach1, men ziet een significante opregulatie in de inhibitor luchtgroep maar niet in de rook-blootgestelde groep (figuur 15). Een verklaring hiervoor kan zijn dat sigarettenrook zorgt voor opregulatie van andere microRNA's die Bach1 of PU.1 ook als target hebben. Het effect van miR-155 inhibitie op genexpressie van deze genen is dus minder uitgesproken doordat andere opgereguleerde miRNAs zorgen voor vermindering van expressie. Onderzoek in de miRDB databank toont aan dat PU.1 en Bach1 nog gereguleerd worden door respectievelijk 22 en 80 andere miRNAs. De kans is dus reëel dat hier miRNAs bijzitten die opgereguleerd worden na rookblootstelling. HIF-1 $\alpha$  is bijvoorbeeld een target van miR-155 maar ook van miR-199a-5p, een miRNA dat ook is opgereguleerd in longweefsel

van COPD patiënten (42). HIF-1 $\alpha$  is een positieve regulator van VEGF en downregulatie van dit gen speelt een belangrijke rol in het ontstaan van emfyseem (43). Een genomwijde expressieprofieling heeft aangetoond dat VEGF één van de meest downgereguleerde genen is in COPD patiënten (44). Bij HIF-1 $\alpha$  ziet men geen significante wijzigingen tussen de verschillende groepen (figuur 16). Mogelijks heeft miR-155 geen invloed op het mRNA niveau maar meer op het eiwitniveau. Een andere mogelijkheid is dat men miR-155 inhibitie overschat en dat de inhibitie niet zo goed is verlopen zoals men zou verwachten uit figuur 13 waardoor er geen uitgesproken opregulatie van targetgenen optreedt. Mogelijks bindt de inhibitor met de primers waardoor de qPCR resultaten een vertekend beeld geven. De reden waarom inhibitie niet goed zou verlopen zijn kan liggen aan de dosis of het aantal doseringen van de inhibitor. Een herhalingsexperiment met een hogere dosis of een hoger aantal doseringen van de inhibitor kan hier uitsluitel bieden. Interessant kan zijn om een gelijkaardig experiment uit te voeren met miR-155 KO muizen. Deze muizen hebben inherent geen expressie van miR-155. Hierdoor kunnen onnauwkeurigheden ten gevolge van inhibitie vermeden worden.

Uit de celtelling van het totale aantal BAL en longcellen zien we dat er een duidelijk rookeffect heeft plaatsgevonden. Het totale aantal cellen is zowel in het BAL vocht als de totale long toegenomen. Uit de resultaten van de cytospin kunnen we concluderen dat rookblootstelling zorgt voor een stijging van het aantal monocyt, neutrofielen en lymfocyt in het BAL vocht. Toediening van zowel de scrambled controle als de miR-155 inhibitor zorgt wel voor een significante attenuatie van de sigarettenrook-geïnduceerde stijging van het aantal neutrofielen (figuur 18). MiR-155 inhibitie kan dus een protectief effect hebben op neutrofiel-gemedieerde inflammatie in de long. Uit de flowcytometrische resultaten van het BAL vocht zien we gelijkaardige resultaten. Naast een attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging van neutrofielen ziet men ook een attenuatie van het aantal rook-geïnduceerde monocyt, dendritische cellen, CD4 T-cellen en CD8 T-cellen na toediening van zowel de scrambled controle als de inhibitor. Het aantal macrofagen in het BAL vocht wijzigt niet. In het longweefsel ziet men enkel een lichte attenuatie van de rook-geïnduceerde stijging van het aantal dendritische cellen en macrofagen. Neutrofielen, monocyt, CD4 T-cellen en CD8 T-cellen vertonen geen wijzigingen na toediening van inhibitor. Waarom er ook een attenuatie optreedt na toediening van de scrambled controle is onduidelijk. Mogelijks is inflammatie in de PBS groep na rookblootstelling te sterk uitgesproken waardoor de resultaten een vertekend beeld geven. Een andere oorzaak kan zijn

dat de scrambled controle toch enige binding vertoont met miR-155 waardoor het zijn functie niet meer kan uitvoeren. Wanneer dit laatste het geval is kan miR-155 een uitstekende target zijn in de behandeling van COPD.

## **5. Conclusie**

Inhibitie van microRNA in rook-blootgestelde muizen kan een positief effect hebben op rook geïnduceerde inflammatie in de long. Inhibitie van miR-155 in de long zorgt voor een attenuatie van rook-geïnduceerde inflammatoire cellen. In het BAL vocht van muizen die miR-155 inhibitie ondergaan hebben treedt er een attenuatie op van de rook-geïnduceerde stijging van het aantal neutrofielen, monocytten, dendritische cellen, CD4 T-cellen en CD8 T-cellen. In het totale longweefsel treedt er enkel een attenuatie op van de rook-geïnduceerde toename van dendritische cellen en macrofagen. Waarom er gelijkaardige resultaten bekomen worden na toediening van een scrambled controle moet verder onderzocht worden. Deze resultaten wijzen erop dat miR-155 inhibitie mogelijks een positieve invloed heeft op rook geïnduceerde inflammatie in de long. Dit miRNA kan dus een interessante target zijn in de behandeling van COPD. Verder onderzoek naar systemische effecten en bijwerkingen van miR-155 inhibitie is vereist. Ook is er verder onderzoek nodig naar de rol van andere microRNA's in de pathogenese van COPD. Simultane inhibitie of mimicing van verschillende microRNA's kan een synergistisch effect uitoefenen.

## Referenties

1. Mannino DM. COPD: epidemiology, prevalence, morbidity and mortality, and disease heterogeneity. *Chest*. 2002;121(5 Suppl):121s-6s.
2. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:397-412.
3. WHO. Prevalence of COPD 2012.
4. Vijayan VK. Chronic obstructive pulmonary disease. *Indian J Med Res*. 2013;137(2):251-69.
5. (GOLD). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease 2014.
6. Barnes PJ. ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Future treatments. *Bmj*. 2006;333(7561):246-8.
7. Aaron SD. Management and prevention of exacerbations of COPD. *Bmj*. 2014;349:g5237.
8. Wedzicha JA, Donaldson GC. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Care*. 2003;48(12):1204-13; discussion 13-5.
9. Brusselle GG, Joos GF, Bracke KR. New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378(9795):1015-26.
10. Mallia P, Footitt J, Sotero R, Jepson A, Contoli M, Trujillo-Torralbo MB, et al. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(11):1117-24.
11. Sevenoaks MJ, Stockley RA. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype? *Respiratory research*. 2006;7:70.
12. Nagai A. Pathology and pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Intern Med*. 2002;41(4):265-9.
13. Demedts IK, Demoor T, Bracke KR, Joos GF, Brusselle GG. Role of apoptosis in the pathogenesis of COPD and pulmonary emphysema. *Respiratory research*. 2006;7:53.
14. Lofdahl JM, Wahlstrom J, Skold CM. Different inflammatory cell pattern and macrophage phenotype in chronic obstructive pulmonary disease patients, smokers and non-smokers. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(3):428-37.
15. Brusselle GG, Demoor T, Bracke KR, Brandsma CA, Timens W. Lymphoid follicles in (very) severe COPD: beneficial or harmful? *The European respiratory journal*. 2009;34(1):219-30.
16. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *The European respiratory journal*. 2006;28(1):219-42.
17. Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2011;254(2):72-85.
18. Eulalio A, Schulte L, Vogel J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. *RNA Biol*. 2012;9(6):742-50.
19. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75(5):843-54.
20. Sessa R, Hata A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm Circ*. 2013;3(2):315-28.
21. Gambari R, Fabbri E, Borgatti M, Lampronti I, Finotti A, Brognara E, et al. Targeting microRNAs involved in human diseases: a novel approach for modification of gene expression and drug development. *Biochem Pharmacol*. 2011;82(10):1416-29.

22. Du T, Zamore PD. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*. 2005;132(21):4645-52.
23. Eulalio A, Behm-Ansmant I, Izaurralde E. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(1):9-22.
24. Eulalio A, Huntzinger E, Nishihara T, Rehwinkel J, Fauser M, Izaurralde E. Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation. *Rna*. 2009;15(1):21-32.
25. Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Trends Immunol*. 2008;29(7):343-51.
26. Tsitsiou E, Lindsay MA. microRNAs and the immune response. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(4):514-20.
27. Rodriguez A, Vigorito E, Clare S, Warren MV, Couttet P, Soond DR, et al. Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*. 2007;316(5824):608-11.
28. Ma X, Becker Buscaglia LE, Barker JR, Li Y. MicroRNAs in NF-kappaB signaling. *J Mol Cell Biol*. 2011;3(3):159-66.
29. Izzotti A, Larghero P, Longobardi M, Cartiglia C, Camoirano A, Steele VE, et al. Dose-responsiveness and persistence of microRNA expression alterations induced by cigarette smoke in mouse lung. *Mutat Res*. 2011;717(1-2):9-16.
30. Schembri F, Sridhar S, Perdomo C, Gustafson AM, Zhang X, Ergun A, et al. MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(7):2319-24.
31. Graff JW, Powers LS, Dickson AM, Kim J, Reisetter AC, Hassan IH, et al. Cigarette smoking decreases global microRNA expression in human alveolar macrophages. *PLoS One*. 2012;7(8):e44066.
32. Van Pottelberge GR, Mestdagh P, Bracke KR, Thas O, van Durme YM, Joos GF, et al. MicroRNA expression in induced sputum of smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(7):898-906.
33. Gavrilov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012;85(2):187-200.
34. Nikitenko NA, Prassolov VS. Non-Viral Delivery and Therapeutic Application of Small Interfering RNAs. *Acta Naturae*. 2013;5(3):35-53.
35. Elmen J, Lindow M, Silahatoglu A, Bak M, Christensen M, Lind-Thomsen A, et al. Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(4):1153-62.
36. Mestdagh P, Feys T, Bernard N, Guenther S, Chen C, Speleman F, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(21):e143.
37. Singh UP, Murphy AE, Enos RT, Shamran HA, Singh NP, Guan H, et al. miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses. *Immunology*. 2014;143(3):478-89.
38. Zhang J, Cheng Y, Cui W, Li M, Li B, Guo L. MicroRNA-155 modulates Th1 and Th17 cell differentiation and is associated with multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2014;266(1-2):56-63.
39. Bluml S, Bonelli M, Niederreiter B, Puchner A, Mayr G, Hayer S, et al. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum*. 2011;63(5):1281-8.



40. Malmhall C, Alawieh S, Lu Y, Sjostrand M, Bossios A, Eldh M, et al. MicroRNA-155 is essential for T(H)2-mediated allergen-induced eosinophilic inflammation in the lung. *J Allergy Clin Immunol*. 2014;133(5):1429-38, 38.e1-7.
41. Goven D, Boutten A, Lecon-Malas V, Boczkowski J, Bonay M. Prolonged cigarette smoke exposure decreases heme oxygenase-1 and alters Nrf2 and Bach1 expression in human macrophages: roles of the MAP kinases ERK(1/2) and JNK. *FEBS Lett*. 2009;583(21):3508-18.
42. Yasuo M, Mizuno S, Kraskauskas D, Bogaard HJ, Natarajan R, Cool CD, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha in human emphysema lung tissue. *The European respiratory journal*. 2011;37(4):775-83.
43. Tang K, Rossiter HB, Wagner PD, Breen EC. Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 2004;97(4):1559-66; discussion 49.
44. Brandsma CA, van den Berge M, Postma DS, Jonker MR, Brouwer S, Pare PD, et al. A large lung gene expression study identifying fibulin-5 as a novel player in tissue repair in COPD. *Thorax*. 2015;70(1):21-32.