

MicroRNA-199b in the heart

Citation for published version (APA):

Alves da Silva, J. (2023). *MicroRNA-199b in the heart: a journey across species*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20231004jd>

Document status and date:

Published: 01/01/2023

DOI:

[10.26481/dis.20231004jd](https://doi.org/10.26481/dis.20231004jd)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

The clinic and economic burden of cardiovascular diseases is undeniable, as this constitutes the leading cause of death worldwide. Taking the lead since 1950 in the United States, large efforts have been in place to develop new and effective therapies to tackle such urgent need. However, although promising results are described for the preclinical phases, these therapies often show disappointing results in human trials, suggesting a deficient understanding of the pathophysiological mechanisms underlying cardiac disease. Moreover, suitability of the animal models used during research play a crucial role on the level of translation to clinics, highlighting the importance of developing and using reliable animal models. The aim of this thesis is to unravel cardiac hypertrophy pathophysiology while studying the therapeutic role of silencing miR-199b in small and large animal models.

From the different cardiac pathologies culminating in heart failure, pressure overload-induced left ventricle hypertrophy is amongst the more common and concerning causes. It is usually a consequence of aortic stenosis or hypertension, two prevalent conditions in which the left ventricle is chronically pressure overloaded. Despite the impressive ability of the heart to maintain function on an initial phase, prolonged LV stress eventually leads to irreversible dysfunction and failure, so innovative solutions are needed to prevent, delay, or stop disease onset and development. To better understand how pathology initiates and progresses, different animal models have been described to mimic a clinical scenario. Although small animal models are easily accessible and standardized, the level of resemblance with the human cardiovascular system is poor, limiting the translational potential of mouse-related findings. On the other hand, large animal hearts, especially from pigs, share considerable similarities with human cardiac system. In **Chapter 2** we describe a new model of pressure overload-induced LV hypertrophy through aortic banding in adult Vietnamese minipigs. Although aortic banding has been previously performed in pigs, these studies commonly use young pigs that have not reached adulthood, due to dimensions and weight constraints for the animal facilities. Thus, although there is an improvement compared to small animals, there are still concerns about whether research on a young system would be translatable to adult ones. We here propose a model where such limitation would be avoided, while using a minimally invasive and accurately controllable technique to induce LV pressure overload. This model is versatile enough to allow the study of initial and later stages of disease, as the period of banding can be easily manipulated according to the research needs.

Besides being a tool to increase disease comprehension, development of reliable animal models provides a platform where new therapeutic strategies can be tested. With the need for a more specific and targeted drug delivery came a fast-growing interest for molecular

medicine, and the recent pandemic of COVID-19 allowed RNA-based technology to become a familiar topic. This strategy, however, has already been approved for the treatment of other conditions before, and is currently a commonly used approach in cardiovascular research. Interestingly, not only the coding RNA has a role in disease, but also the non-coding fraction: non-coding RNAs include microRNAs, long non-coding RNAs and circular RNAs, and they are introduced in **Chapter 3**. Due to their pleiotropy and regulatory importance in homeostasis and disease, these molecules became attractive targets in pharmaceutical research. Therefore, in this chapter we review the latest advances in RNA-based technologies and how new ncRNA-based strategies are showing a promising therapeutic potential for the treatment of cardiac hypertrophy.

Among the candidate targets in pressure overload-induced LV hypertrophy is miR-199b: silencing of this microRNA with a specific antisense oligonucleotide-drug (antagomir) resulted in improved hypertrophic response and cardiac function in stressed mouse hearts, an optimistic finding for cardiovascular drug development. To understand whether these findings would be translatable, we describe, in **Chapter 4**, how the administration of the same antagomir could have a beneficial role in improving LV hypertrophy in aortic banded-adult minipigs, the large animal model described in Chapter 2. Although the presented preliminary pharmacological studies still require optimization, we believe they confer great contribution for further study designs, while suggesting a promising therapeutic outcome.

The ability of ncRNAs to simultaneously regulate different biological mechanisms constitutes an opportunity not only in left, but also in right ventricle failure. In fact, miR-199b is overexpressed in pressure overload-induced hypertrophy for both ventricles, so we studied how the dysregulation of miR-199b levels can affect RV remodeling during pulmonary artery hypertension, a popular cause for RV failure. In **Chapter 5** we show that overexpression of this microRNA exacerbates hypertrophy in diseased mice, while its inhibition improves RV condition. Interestingly, although this is the same microRNA involved in LV pressure overload, the molecular mechanism by which it acts on the RV is different. RNA sequencing experiments allowed a clear distinction between left and right ventricle transcriptomic profiles during hypertrophy, emphasizing they constitute two different substrates with specific research needs.

Chapter 6 tries to concisely disclose and discuss the main findings of our research work, while critically anticipating future perspectives for them to flourish.

Samenvatting

De klinische en economische lasten van cardiovasculaire aandoeningen voor de samenleving worden ontegenzeggelijk duidelijk gemaakt door het feit dat dit de hoofdoorzaak is van sterfgevallen wereldwijd.

Sinds 1950 zijn er met name in de Verenigde Staten, grote inspanningen verricht om nieuwe en meer effectieve therapieën te ontwikkelen om deze medische nood het hoofd te bieden. Alhoewel er hoopgevende resultaten zijn geboekt in verschillende dierenstudies, blijkt de vertaling richting de mens moeilijk getuigende de teleurstellende resultaten in de kliniek. Dit duidt op onvoldoende kennis van de onderliggende pathologische mechanismen van de hart en vaatziekten om deze vertaalslag te kunnen maken.

Er kunnen zeker ook vraagtekens gezet worden bij de geschiktheid van de diermodellen die gebruikt worden tijdens de ontwikkelingen voor vertaling richting de patiënt. De roep om betere en meer betrouwbare diermodellen met een voorspellend vermogen, cruciaal voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën, wordt daardoor steeds luider.

Het doel van dit proefschrift is het ontrafelen van de pathofysiologie achter cardiovasculaire hypertrofie door het bestuderen van de therapeutische effecten die gepaard gaan met de inhibitie van MiR-199b expressie in kleine en grote proefdieren.

Van de verschillende ongewenste pathologische veranderingen die ontstaan uit hartfalen is overdruk gerelateerd linkerventrikel hypertrofie het meest voorkomend en meest ingrijpende voorbeeld. Linkerventrikel hypertrofie wordt voornamelijk veroorzaakt door vernauwing van de aorta en hoge bloeddruk, twee veel voorkomende aandoeningen waarbij de linkerventrikel chronisch een te hoge druk ervaart. Ondanks een indrukwekkend vermogen van het hart om initieel zijn functie te behouden, zal langdurig overdruk resulteren in onomkeerbare schade aan het hart en daarmee gepaard gaand verlies van de hartfunctie. Innovatieve therapieën zullen moeten worden ontwikkeld die dit kunnen voorkomen, vertragen of zelf een halt toe kunnen roepen.

Verscheidende diermodellen zijn beschreven die trachten de klinische relevantie na te bootsen, om een beter begrip te krijgen van hoe deze pathologische veranderingen tot stand komen. Alhoewel kleine proefdieren zoals muizen eenvoudig voor handen zijn, blijkt de klinische relevantie van de verkregen data in deze groep proefdieren beperkt door een significant verschil met het menselijke cardiovasculaire systeem. Harten van grotere proefdieren zoals varkens zijn daarentegen sterk vergelijkbaar met humane harten. In **hoofdstuk 2** wordt er een nieuw model beschreven voor hoge bloeddruk geïnduceerde linkerventrikel hypertrofie in Vietnamese minivarkens. Dit ziektebeeld wordt veroorzaakt door het gedeeltelijk afbinden van de aorta. Het introduceren van druk via deze methode al eerder

is gebruikt in varkens-modellen, echter wordt er meestal gebruik gemaakt van jonge varkens die nog niet volgroeid zijn. Dit vanwege restricties in de ruimte van opvang van deze dieren. Alhoewel dit een beter model is ten opzichte van de kleine proefdieren zijn er toch nog wel twijfels of het induceren van het ziektebeeld bij jonge dieren klinisch relevant en vertaalbaar is naar volwassen dieren.

In dit proefschrift wordt een diermodel beschreven waar via een minimaal invasieve en nauwkeurig controleerbaar techniek de linkerventrikel overdruk wordt geïnduceerd in volwassen minivarkens om zodoende de onzekerheid in het gebruik van jonge dieren te elimineren. Dit model laat vervolgens zien veelzijdig te zijn en kan gebruikt worden om zowel de vroege fase als de late fases van het ziektebeeld na te bootsen via eenvoudige manipulatie van de duur van de aorta restrictie.

Naast het verkrijgen van waardevolle informatie over een ziektebeeld op moleculair niveau, is het ontwikkelen van betrouwbare diermodellen ook zeer interessant als platform voor het testen van nieuwe therapeutische strategieën. In het kielzog van de zoektocht naar meer specifieke en doelgerichte medicatie kwam de groeiende interesse in moleculaire medicijnen waarvan de recente COVID-19 pandemie de RNA-therapie op de kaart heeft gezet. Deze RNA-technologie is al eerder gebruikt voor verschillende aandoeningen, maar wordt nu ook bestudeerd in cardiovasculaire onderzoek.

Zeer interessant om te benoemen is dat niet allen de coderende RNA een rol speelt in vele ziektebeelden, ook de non-coderende RNAs zoals micro-RNAs, lange niet-coderende RNAs en circulair RNAs blijken van invloed te kunnen zijn, zoals beschreven in **hoofdstuk 3**. Vanwege hun veelzijdigheid en belangrijkheid in homeostase en ziektes vormen deze RNAs zeer interessante groep voor farmaceutische toepassingen.

In dit hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de meest recente ontwikkelingen in de op RNA gebaseerde therapieën wat laat zien dat dit ook een veelbelovend therapeutisch potentieel heeft voor de behandeling van cardiovasculaire hypertropie. Een van de target micro RNAs in hoge druk geïnduceerde linkerventrikel hypertrofie is micro RNA 199b. Het uitschakelen van deze regulerende RNA met behulp van een specifiek antisense oligonucleotide (antagomir) resulteert in verbeterde hypertropie respons en verbeterde hartfunctie in een muishartmodel. Dit lijkt een veelbelovend resultaat voor cardiovasculaire medicijn ontwikkeling.

Om te zien of deze resultaten te vertalen zijn richting de kliniek beschrijven wordt in hoofdstuk 4 beschreven hoe de toediening van bovengenoemde antagomir ook een verbetering van de hartfunctie laat zien in het minivarken model, zoals beschreven in hoofdstuk 2. Alhoewel de farmacologische studies verder geoptimaliseerd dienen te worden, denken wij dat deze een grote bijdragen gaan leveren aan toekomstige ontwerpen van studies en testen van veelbelovende RNA-therapieën.

Het vermogen van niet-coderende RNAs om gelijktijdig verschillende biologische mechanismen te reguleren geeft niet alleen therapeutische mogelijkheden in de linker maar ook in de rechterventrikel. Het is bekend dat micro RNA over-expressie wordt waargenomen in beide ventrikels tijdens overdruk geïnduceerde hypertrofie. Mede hierdoor is er een studie opgezet om te begrijpen hoe de disregulatie van micro RNA 199b niveaus verantwoordelijk is voor de pathologische verandering van de rechterventrikel tijdens pulmonale hypertensie, een veelvoorkomende oorzaak van rechterventrikel falen. In **hoofdstuk 5** laten we zien dat over-expressie van dit 199b de hypertrofie in zieke muizen verergert terwijl inhibitie van 199b juist de gesteldheid van de rechterventrikel verbetert. Interessant is dat alhoewel dit hetzelfde micro RNA is dat een rol speelt in linkerventrikel falen, het moleculaire mechanisme waarmee het effect heeft op de rechterventrikel heel anders. Nieuwe RNA sequencing experimenten geven een duidelijk verschil tussen linker en rechter ventrikel transcriptoom profielen gedurende hypertrofie wat benadrukt dat de twee hartkamers onafhankelijk van elkaar dienen te worden onderzocht.

In **hoofdstuk 6** wordt uiteindelijk een korte samenvatting gegeven van de behaalde resultaten van bovengenoemde onderzoeken en de mogelijkheden voor verder baanbrekend onderzoek.

Sumário

O impacto clínico e social das doenças cardiovasculares é inegável, constituindo a principal causa de morte em todo o mundo. Liderando a lista desde 1950 nos Estados Unidos, a comunidade científica tem-se dedicado ao desenvolvimento de novos tratamentos que possam colmatar esta necessidade urgente. No entanto, ainda que tenham sido descritos resultados promissores para fases pré-clínicas da investigação, estas terapias têm demonstrado resultados desanimadores em estudos em humanos, sugerindo falhas na compreensão da doença cardíaca. Além disso, os modelos animais utilizados são um fator fundamental na reprodutibilidade dos resultados de animais para humanos, enfatizando a importância de desenvolver e utilizar modelos animais fidedignos na investigação. O objetivo desta tese é tentar compreender melhor os mecanismos fisiológicos associados à doença cardíaca, investigando também o potencial terapêutico de silenciar o microRNA-199b em modelos animais de pequeno e grande porte.

Das diferentes patologias cardíacas que resultam em insuficiência, a hipertrofia do ventrículo esquerdo por sobrecarga de pressão está entre as causas mais comuns e alarmantes. Esta condição resulta geralmente de estenose da válvula aórtica e/ou hipertensão, duas condições prevalentes nas quais o ventrículo esquerdo está sob pressão. Ainda que o coração tenha uma impressionante capacidade para manter a função cardíaca numa fase inicial, a sobrecarga prolongada no ventrículo culmina, eventualmente, em disfunção irreversível e insuficiência, sendo necessário o desenvolvimento de soluções que possam prevenir, atrasar, ou parar a doença. Para melhor compreender como esta se desenvolve, vários modelos animais têm sido desenvolvidos para tentar simular um cenário clínico. Ainda que os animais de pequeno porte tenham como vantagem a sua disponibilidade e ampla padronização, os seus sistemas cardiovasculares em pouco se assemelham com o humano, limitando a relevância clínica dos estudos em ratos; por outro lado, os corações de animais de grande porte, especialmente os de porco, são bastante semelhantes aos humanos. No **Capítulo 2** descrevemos o desenvolvimento de um novo modelo de hipertrofia do ventrículo esquerdo, por sobrecarga de pressão, resultado do ligamento da artéria aorta em mini porcos vietnamitas adultos. Ainda que outros modelos de ligamento da aorta tenham já sido descritos em porcos, grande parte destes estudos utilizam porcos não adultos devido às restrições logísticas associadas aos tamanhos e pesos permitidos nos laboratórios animais. Assim, ainda que sejam mais relevantes do que animais de pequeno porte, os resultados obtidos num sistema em desenvolvimento podem ser pouco representativos dos de um sistema adulto. Aqui propomos um modelo onde tal limitação não se impõe, enquanto optamos por um sistema minimamente invasivo e com um controlo preciso da pressão a que

o ventrículo esquerdo é exposto. Este modelo é também versátil o suficiente para permitir o estudo de fases iniciais e avançadas da doença, uma vez que o período de ligamento da aorta pode ser facilmente manipulado de acordo com o objetivo da investigação.

Mais do que uma ferramenta a partir da qual se pode aumentar a compreensão da doença, os modelos animais servem de plataformas onde novas estratégias terapêuticas podem ser testadas. A necessidade de fármacos mais específicos resultou num crescente interesse pela medicina molecular, com a pandemia do COVID-19 a trazer popularidade para tecnologias à base de RNA. Estas estratégias, no entanto, já foram anteriormente aprovadas para o tratamento de outras doenças e síndromes, sendo atualmente uma abordagem comum na investigação cardiovascular. Curiosamente, não só a fração de RNA codificante está associada a patologias, mas também a fração não codificante, RNA não codificante (ncRNA), que inclui os microRNAs (miRNAs), os long non-coding RNAs (lncRNAs) e os circular RNAs (circRNAs), sendo estes introduzidos no **Capítulo 3**. Graças à sua pleiotropia e importância na regulação da homeostase e doença, estas moléculas tornaram-se alvos atrativos na investigação farmacêutica. Assim, neste capítulo revemos os mais recentes avanços em tecnologias à base de RNA, e como as novas estratégias com RNA não codificante estão a demonstrar potencial terapêutico no tratamento da hipertrofia cardíaca.

Entre os alvos candidatos na hipertrofia do ventrículo esquerdo por sobrecarga de pressão está o microRNA-199b: quando este microRNA foi silenciado com um oligonucleótido “antisense” (antagomir), a hipertrofia e a função cardíaca melhoraram em corações de rato, um resultado otimista para o desenvolvimento de novos fármacos em cardiologia. Para compreender se estes resultados seriam reproduzíveis, descrevemos, no **Capítulo 4**, como é que a administração do mesmo antagomir pode ser benéfica para melhorar a hipertrofia do ventrículo esquerdo em mini porcos adultos expostos a sobrecarga de pressão, o modelo animal descrito no Capítulo 2. Ainda que estes estudos farmacológicos preliminares precisem de otimização, acreditamos que conferem uma considerável contribuição no planeamento de estudos futuros, enquanto sugerindo um promissor resultado terapêutico.

A capacidade dos ncRNAs para regular vários processos biológicos em simultâneo constitui uma oportunidade não só para a insuficiência do ventrículo esquerdo, mas também do direito. Na verdade, os níveis do microRNA-199b apresentam-se elevados em situações de sobrecarga de pressão nos dois ventrículos, pelo que estudámos o efeito da manipulação dos níveis deste microRNA no ventrículo direito após hipertensão da artéria pulmonar, uma causa comum para a insuficiência. No **Capítulo 5** mostramos que um aumento da expressão deste microRNA agrava a hipertrofia em ratos com hipertensão da artéria pulmonar, enquanto a sua inibição melhora a condição do ventrículo direito. Surpreendentemente, ainda que seja o mesmo microRNA envolvido na sobrecarga de pressão do ventrículo esquerdo, o mecanismo molecular através do qual este atua no ventrículo direito é diferente. A

sequenciação de RNA permitiu uma clara distinção entre os perfis transcriptômicos de cada ventrículo durante a hipertrofia, realçando o quanto estes constituem dois substratos diferentes que requerem investigação individual e específica.

O **Capítulo 6** sumariza e discute os principais resultados do presente trabalho de investigação, antecipando criticamente quais as perspectivas futuras para que estes prosperem.