

Academiejaar 2012 - 2013

MOGELIJKHEDEN EN BEPERKINGEN VAN MICRORNA THERAPEUTICA

Ruben DE ROUCK

Promotor: Prof. Dr. Frank Speleman

Scriptie voorgedragen in de 2^{de} Master in het kader van de opleiding

MASTER OF MEDICINE IN DE GENEESKUNDE

Deze pagina is niet beschikbaar omdat ze persoonsgegevens bevat.
Universiteitsbibliotheek Gent, 2021.

This page is not available because it contains personal information.
Ghent University, Library, 2021.

1. Voorwoord

Ik zou graag mijn promotor bedanken voor zijn constante bereidheid om te helpen. Daarnaast ook mijn goeie vriend Koen Blot, op wie ik altijd kon rekenen als luisterend oor of voor constructieve feedback.

“If I have seen further it is by standing on the shoulders of Giants.”

— Isaac Newton

2. Inhoudsopgave

1. VOORWOORD	I
2. INHOUDSOPGAVE.....	II
3. ABSTRACT.....	IV
4. INLEIDING.....	1
4.1. MiRNAs zijn regulatoren van bijna alle cellulaire processen	1
4.2. De miRNA biogenese	2
4.3. Hoe vervult miRNA zijn functie in de cel?	2
4.4. Kanker ontstaat door ontregeling van de normale cellulaire processen.	4
4.5. MiRNAs coördineren de celwerking, dus ook de ontregeling bij kanker.	5
4.5.1. Oncomirs.....	6
4.5.2. MiRNA tumor-suppressorgen.....	6
4.5.3. MiRNAs zijn betrokken als regulatoren van invasie en metastasering	7
4.6. MiRNA netwerken: complexer dan alleen de som van zijn delen.....	7
4.7. Neuroblastoma heeft een zeer heterogene kliniek.....	8
4.8. Classificatie en staging van neuroblastoma	8
4.9. Neuroblastoma is een genetisch heterogene aandoening	9
5. METHODOLOGIE	10
6. RESULTATEN	11
6.1. Op miRNA gebaseerde therapie in kanker hebben potentieel	11
6.2. Strategieën voor miRNA therapeutica.....	13
6.2.1. MiRNA antagonisten.	13
6.2.2. MiRNA sponzen	13
6.2.3. miRNA agonisten	14
6.2.4. miRNA maskers.....	15
6.3. Chemische modificaties van oligonucleotiden.....	15
6.3.1. 2'-O methyl modificaties	16
6.3.2. Locked Nucleic Acids.....	16
6.4. Toeleveringsmechanismen in vivo.....	17
6.4.1. Lokale of systemische toediening.....	17
6.4.2. Virale vectoren.....	18
6.4.3. Liposomen	21
6.4.4. Nanopartikels	23
6.5. Targeting van miRNA therapeutica	26

6.5.1. Ligand targetting.....	26
6.5.2. Antilichamen tegen specifieke receptoren.....	26
6.5.3. Aptameren.....	27
6.6. BEPERKINGEN INHERENT AAN HET THERAPEUTISCH GEBRUIK VAN miRNA.....	27
6.6.1. Off target effecten.....	28
6.6.2. Verzadiging van de cellulaire machinerie	28
6.6.3. Anti-RNA immuuneffecten	29
6.7. VOORWAARDEN VOOR DE KEUZE VAN HET miRNA OM OP IN TE GRIJPEN	29
6.8. miRNA THERAPIE ALS POTENTIELE BEHANDELING VOOR NEUROBLASTOMA.....	31
6.8.1 Neuroblastoma ontstaat door afwijkingen in de ontwikkeling van neuroblasten.....	31
6.8.2. MicroRNA-34a, let-7 en de microRNA-17-92 cluster als mogelijke targets	31
6.8.3 Disialoganglioside als mogelijk targettingmechanisme in therapeutica.....	34
7. DISCUSSIE	35
8. REFERENTIES	39
9. BIJLAGEN.....	44

3. Abstract

MicroRNAs zijn een onderzoeksgebied waarvoor de interesse in de laatste jaren geëxplodeerd is. Dankzij de toenemende inzichten in de werking ervan is het therapeutisch gebruik van deze korte RNA strengen niet ver meer van de kliniek verwijderd. MicroRNA therapeutica bezitten de unieke eigenschap om tegelijk netwerken van verschillende genen kunnen beïnvloeden op analoge manieren zoals deze reeds in het lichaam plaatsvinden. In deze scriptie wordt een uiteenzetting gedaan van de huidige stand van zaken van de kennis over de modulatie van microRNAs in kankertherapie. Dit omvat de gebruikte strategieën, de chemische modificaties, de mogelijke toedienings- en toeleveringswijzen, en hun voor en nadelen. Anderzijds worden ook de uitdagingen en vereisten voor het selecteren van doelwit miRNAs besproken. In het tweede luik van deze thesis worden de gevonden resultaten toegepast op neuroblastoma. Neuroblastoma is een pediatrische tumor met een zeer heterogeen klinisch verloop en disproportioneel hoge mortaliteit. Aan de oorsprong hiervan ligt een complex moleculair netwerk van ontregelingen in de genetische pathways verantwoordelijk voor de differentiatie van de foetale neuroblasten. De tumorsuppressor miRNAs miR-34 en let-7 en het oncogene miR-17-92 cluster lijken geschikte kandidaten te zijn om vanuit te vertrekken voor het ontwikkelen van een therapie. Eventueel is ook een combinatietherapie van verschillende miRNAs of andere kleine RNAs mogelijk om de dosisvereiste voor hetzelfde effect te verlagen en resistentievorming te voorkomen. Een combinatie van locked nucleic acids in nanopartikels met minimale anti-diganglioside (GD2) antilichamen als targettingmechanisme lijkt op moment van schrijven de beste toedieningstrategie te zijn. Er is echter nog verder onderzoek nodig naar het bepalen van de formulering en mogelijke nevenwerkingen in humane modellen.

4. Inleiding

De Oostenrijkse monnik Gregor Mendel postuleerde in 1865 de eerste erfelijkheidswetten door experimenten met erwten, en introduceerde zo het concept van erfelijke eenheden, ‘genen’ genaamd. Deze genen spelen doorheen de geschiedenis een steeds belangrijkere rol in allerlei biologische processen en lichaamsfuncties. Hieruit formuleerden George Beadle en Edward Tatum in 1940 de ‘*one gene-one enzyme*’ hypothese, die de link legde tussen een genen en moleculaire producten. Later is deze hypothese omgevormd tot ‘*one gene-one polypeptide*’ zodat deze ook splicing zou omvatten. Dat genen niet enkel dienen voor enzymen te coderen was snel duidelijk door de ontdekkingen van niet-coderende RNAs zoals tRNA en ribosomaal RNA en dergelijk. De echte stroomversnelling begon echter door de ontdekking van RNA interferentie als beïnvloedingsmechanisme voor genexpressie door Andrew Fire en Craig Mello in 1998, waar ze uiteindelijk de Nobelprijs voor Geneeskunde en Fysiologie voor kregen. Uiteindelijk leidde dit mechanisme tot de uitklaring van de werking van miRNAs en grote stappen voorwaarts in het kankeronderzoek.

4.1. MiRNAs zijn regulatoren van bijna alle cellulaire processen

MicroRNAs (miRNAs) zijn molecules die bestaan uit 19-21 nucleotiden ribonucleïnezuren (RNA) en functioneren als regulatoren van genexpressie in de cel. In de laatste jaren is de belangstelling voor miRNAs sterk toegenomen en is intensief onderzoek verricht naar de rol van miRNAs in de regulatie van diverse normale en verstoorde cellulaire processen, waaronder proliferatie, differentiatie, metastasering en apoptose (1). Elk miRNA kan potentieel de expressie van een groot aantal genen reguleren. Computerberekeningen schatten het aantal mogelijke targets doorheen het lichaam op ongeveer 500 per miRNA familie. Daarbovenop wordt geschat dat 60% van de messenger RNAs (mRNAs) één of meer evolutionair bewaarde sequenties heeft waarvan voorspeld wordt dat ze interageren met miRNAs (1,2). Uit diverse studies blijkt dat miRNAs een rol spelen in de regulatie van bijna elk cellulair proces, en dat afwijkende expressieniveaus geobserveerd worden in diverse pathologieën waaronder kanker (1,3).

4.2. De miRNA biogenese

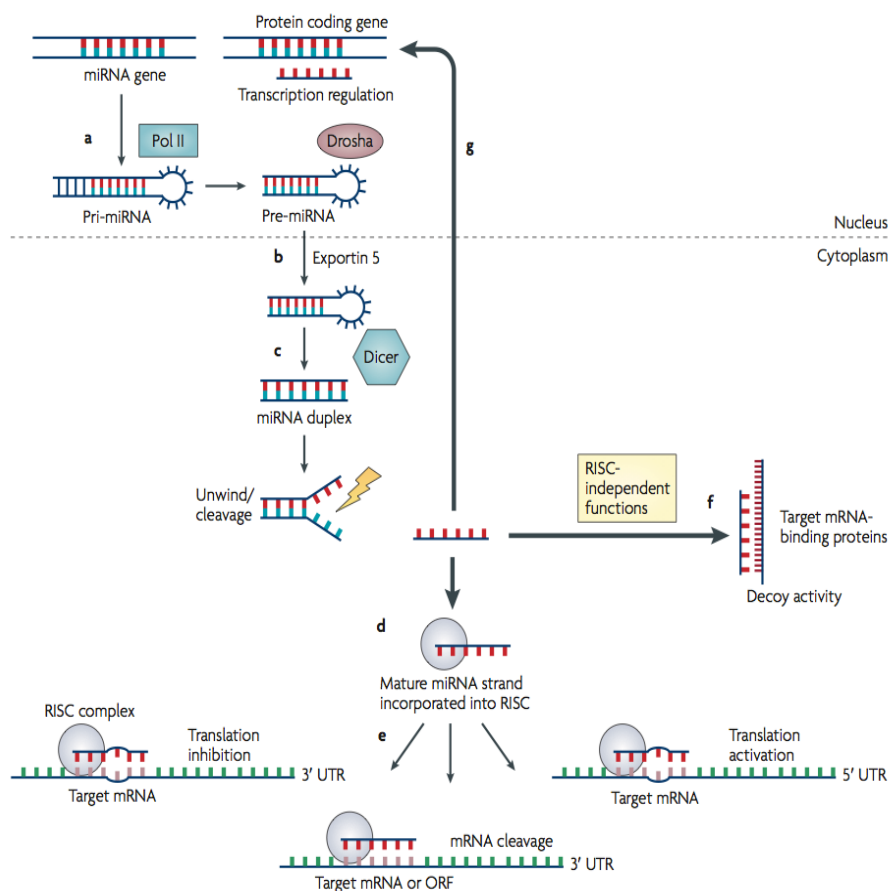
De aanmaak van miRNA start met de transcriptie van het desbetreffende gen. Dit wordt gekatalyseerd door het enzyme RNA polymerase II, waarbij een 50-capped 30-polygeadenyleerd primair miRNA (pri-miRNA) gevormd wordt van meer dan 1000 nucleotiden (2-4). Deze streng vouwt zich spontaan op tot imperfecte dsRNA-achtige haarspeldbochtlussen (hairpin loops), waaruit één of meer miRNAs uitgesneden worden in 2 stappen. Beide stappen worden gekatalyseerd door Drosha en de endonuclease Dicer, beiden enzymen van de RNase III familie (3). Eerst splitst Drosha een hairpin loop af, wat een 60 à 70 nucleotides groot dubbelstrengige hairpinstructuur oplevert, het precursor miRNA (pre-miRNA). Dit pre-miRNA wordt op zijn beurt actief getransporteerd naar het cytoplasma doorheen het exportine-5 eiwitcomplex (4). Daar verwerkt Dicer het pri-miRNA tot een ongeveer 21 nucleotiden lange duplex met 2 uitpuilende nucleotiden ter hoogte van de 3' uiteinden. Over het algemeen wordt de streng met het 5' uiteinde aan de minst thermostabiele kant gekozen om de miRNA functie uit te oefenen. De andere streng wordt meestal gewoon afgebroken. De gekozen streng wordt dan geïncorporeerd in een complex van eiwitten en RNA, een ribonucleoproteïne-complex, om de silencing functie te vervullen. Dit complex wordt het miRNA Induced Silencing Complex genoemd, afgekort als miRISC of RISC. De karakteristieke componenten van het RISC zijn de 4 eiwitten van de Argonaut familie, AGO-1 tot 4. Hun functie bestaat uit het onderdrukken van de eiwitsynthese als ze door de associatie met het miRNA gebonden zijn aan de 3' UTR regio van een mRNA (3).

4.3. Hoe vervult miRNA zijn functie in de cel?

De regulatie die miRNAs op mRNA uitoefenen gebeurt bijna uitsluitend na de transcriptiefase door de stabiliteit in het cytoplasma van het mRNA in kwestie te doen dalen, of door de translatie zelf te beïnvloeden. Daarentegen blijkt uit studies, die aantonen dat miRNAs geïmporteerd kunnen worden in de celkern en zelfs gesecreteerd kunnen worden, dat genregulatie mogelijks niet de enige functie is van miRNA. Zo kunnen miRNAs bijvoorbeeld ingrijpen op de verwerking van precursoren van mRNA (pre-mRNA) in de kern, of een chaperone functie vervullen die de mRNA structuur of mRNA-eiwitinteracties verandert (3).

Het uitlokken van de endonuclease functie vereist geen perfect complementaire basenparing. De strengste vereiste hiervoor is een continue en perfecte basenparing van de 2e tot de 8e

nucleotide, die ook de ‘seed’ regio wordt genoemd. De bindingsplaats hiervoor op de mRNAs bevindt zich, op een paar uitzonderingen na, ter hoogte van het 3’ Untranslated Region (UTR) uiteinde. Deze bindingsplaats is vaak in verschillende kopieën aanwezig, wat een vereiste is voor effectieve onderdrukking van de translatie. Dit mechanisme is ook effectief bij het kunstmatig inbrengen van de bindingsplaatsen ter hoogte van de 5’ UTRs of zelfs ter hoogte van de coderende regio’s (3).



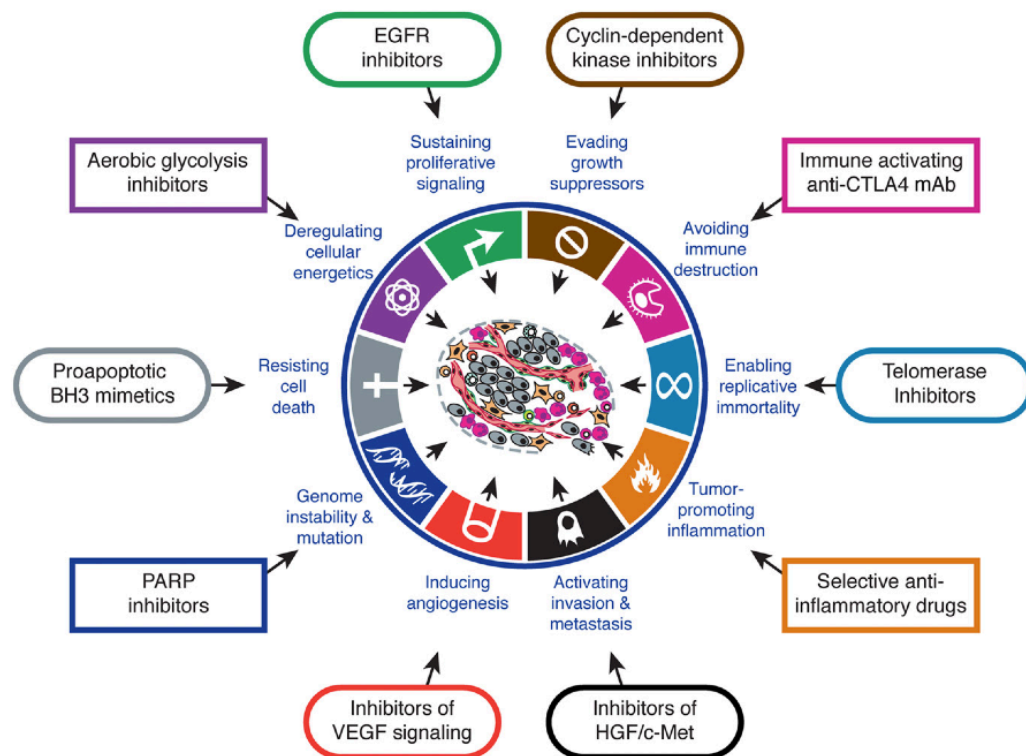
Afbeelding 1: Illustratie bij de biogenese en werking van MiRNA. Het pri-miRNA gen wordt in de kern afgeschreven door RNA polymerase 2 en het overtollige materiaal wordt afgeknipt door Drosha zodat het pre-miRNA ontstaat. Vervolgens wordt het pre-miRNA door exportine 5 naar het cytoplasma geëxporteerd, waar het door Dicer wordt omgezet tot het uiteindelijke functionele miRNA en zijn complementaire streng die gedegrademd wordt (2).

De stabiliteit van een miRNA wordt mede bepaald door het type van AGO proteïne waarmee het zich associeert en de graad van complementariteit met zijn target. Wanneer een miRNA

bindt met een target met een grote complementariteit, leidt dit tot translationele repressie of tot deadenylatie en de daaruit volgende degradatie van het doelwit mRNA. Dit mechanisme ligt aan de basis van inhibitorische miRNA strategieën en het ontdekken van de rol van miRNAs in cellulaire processen (5).

4.4. Kanker ontstaat door ontregeling van de normale cellulaire processen.

Hanahan en Weinberg beschreven in 2000 in een alomtgeprezen review artikel zes essentiële karakteristieken waaraan een kankerproces moet voldoen: zelfvoorzienend in zijn groeisignalen, ongevoeligheid voor signalen tegengesteld aan groeisignalen, ontwijken van apoptose, het potentieel om eindeloos verder te repliceren, zichzelf onderhoudend door angiogenese en tenslotte mogelijkheid tot invadering in weefsels en metastasering (6). Recent werden deze zogenaamde 'hallmarks of cancer' geupdated om rekening te houden met de recentste inzichten. Hierdoor werden er nog vier 'hallmarks' toegevoegd met name herprogrammering van het energiemetabolisme en ontwijken van immuungemedieerde destructie, aanwezigheid van tumorbevorderende inflammatie en tot slot genomische instabiliteit en het verwerven van mutaties (7).



Afbeelding 2: Een illustratie hoe verschillende bestaande therapieën inwerken op de 'hallmarks of cancer'. (7)

4.5. MiRNAs coördineren de celwerking, dus ook de ontregeling bij kanker.

Door de intrinsieke onderdrukkingsfunctie die miRNAs uitoefenen op genexpressie zijn er verschillende manieren hoe ze de ontwikkeling van kanker kunnen beïnvloeden. Overexpressie, amplificatie of verlies van epigenetische silencing van een gen dat codeert voor miRNA dat één of meer genen die tumorvorming onderdrukken (*tumor-suppressor genen*) als doelwit heeft, kan een anti-oncogene signalisatieweg inhiberen. Omgekeerd kan de fysieke deletie, transcriptionele neerregulatie of het epigenetisch silencing van een miRNA dat normaal oncogenen onderdrukt, leiden tot een verhoogde eiwitexpressie of het toenemen van de oncogene capaciteit. Meer subtiele mutaties die de seed sequentie van matuur miRNA aantasten kunnen binding met targets elimineren of drastisch de specificiteit aanpassen, waardoor het subtiele evenwicht van kritische groeiregulatoren verstoord wordt. Sequenties die instaan voor doelwitspecificiteit ter hoogte van de mRNAs kunnen ook muteren, waardoor ze vrij komen van de regulatie afkomstig van een bepaald miRNA, of onderhevig worden aan een ander miRNA (8).

Het uitschakelen van miRNA regulatie kan ook op andere manieren die niet rechtstreeks op de codering van de miRNAs inwerken. Er zijn aanwijzingen dat pseudogenen, die vroeger geacht waren disfunctionele kopieën te zijn, wat gereflecteerd wordt in de term 'junk DNA', een rol kunnen spelen als regulatoren van miRNAs omdat deleties van deze pseudogenen kanker veroorzaken en ze een gelijkaardige 3' UTR hebben (9). Ook bij planten zijn dergelijke miRNA regulatoren, ook wel miRNA sponzen genaamd, aangetroffen (cfr. infra) waarvan verondersteld wordt dat ze een gelijkaardige werking hebben (10).

De ontwikkeling van kanker is een dynamisch proces waarbij in elke deling nieuwe veranderingen plaatsvinden ter hoogte van het genoom van de kankercel. Hierdoor verschilt de expressie van miRNA niet alleen tussen gezond en tumoraal weefsel, maar ook tussen primaire tumoren en metastasen. Deze verschillen zijn in sommige gevallen geassocieerd aan een slechtere of betere prognose (11). Globaal gezien komt bij tumoren voornamelijk verminderde expressie voor ten opzichte van niet-aangetaste weefsels. De mogelijke verklaringen hiervoor zijn de dedifferentiatie van de tumoren of hun hogere proliferatiesnelheid. Een andere verklaring kan zijn dat daling van miRNA expressie bijdraagt tot een voordeel in overleving of proliferatie (8).

4.5.1. Oncomirs

MiRNAs die meer tot expressie komen in kanker kunnen werken als oncogenen (8). Eén van de eerst gekende voorbeelden hiervan is miR-155. Dit miRNA bereikt hoge expressieniveaus in Burkitt lymfoom, de ziekte van Hodgkin, chronische lymfatische leukemie, acute myeloïde leukemie, longkanker, pancreascarcinoom en borstkanker (11). Deze ontdekking gebeurde na de observatie van een gen, dat later bleek te coderen voor het primaire transcript van miR-155, dat een frequente insertieplaats is voor het avian leukosis virus bij lymfomen, zonder aantoonbaar reading frame. De rol van miRNAs als oncogenen werd verder geconsolideerd na het aantonen dat miR-155 transgene muizen acute lymfoblastische leukemie en/of hooggradig lymfoom ontwikkelen. Hoewel miR-155 niet vereist is voor de ontwikkeling van mature B-lymfocyten, veroorzaakt een overmaat eraan toch hematologische maligniteiten. Er zijn nog verschillende andere dergelijke voorbeelden terug te vinden in de literatuur waarvoor oorzakelijke verbanden of correlaties kunnen worden aangetoond tussen een gestegen expressie van één of meer miRNAs en proliferatie en ontwijking van apoptose (8). Deze bevindingen suggereren dat een therapeutische interventie op deze ontregelde miRNAs niet enkel gebruikt kan worden om tumorcellen gevoeliger te maken voor chemotherapeutica, maar ook gebruikt kan worden om hun overleving, proliferatie en invasie te beperken. Dit concept ligt aan de basis van het gebruik van antisense oligonucleotiden om het ontwikkelen van fenotypes geassocieerd met kanker tegen te gaan (11).

4.5.2. MiRNA tumor-suppressorgenen

Verschillende miRNAs zijn geïdentificeerd met een rol als tumor-suppressorgen. Dit volgt uit de observaties van recurrente deleties of verminderde expressie bijvoorbeeld ten gevolge van methylatie in bepaalde types van kankers. Daarnaast zijn er ook functionele studies die aantonen dat een overexpressie van een subgroep van deze miRNAs in kankers de celgroei kan beperken of zelfs apoptose induceren, zowel *in vitro* als *in vivo*. De miR-15a-16-1 cluster die zich bevindt op chromosoom 13q14, is een prototype voorbeeld van een dergelijk miRNA. Deze cluster is verdwenen in de meerderheid van de CLL gevallen en in een deel van de mantelcellymfomen en prostaatkankers. MiR-15a-16-1 werkt als tumor suppressor aangezien het bij hogere expressieniveaus de activiteit van belangrijke oncogenen zal onderdrukken door negatieve posttranscriptionele effecten. Voorbeelden van targetgenen zijn BCL2 in onder andere CLL, en verder ook CCND1 (cycline D1) en WNT3A (8). Afwijkingen

in genen die coderen voor miR-15a-16-1 zijn gelinkt aan familiale vormen van CLL, maar ook aan familiale vormen van borstkanker. Gecombineerd met het induceren een CLL-achtig beeld in muismodellen kan dit gezien worden als een aanwijzing dat verschillende moeilijk genetisch te verklaren vormen van kanker mogelijks een oorsprong hebben in afwijkingen ter hoogte van genen die coderen voor non-coding RNAs (12) .

Een ander dergelijk voorbeeld is de miR-34 familie die bestaat uit miR-34a, gelegen op chromosoom 1p, en miR-34b en -c die gelegen zijn op chromosoom 11q. Afwijkingen in deze familie zijn geassocieerd met een daling in activiteit van p53 en een afname van gefosforyleerd Rb (retinoblastoma), twee afwijkingen die frequent aangetroffen worden bij de ontwikkeling van menselijke kankers. De transcriptie van deze miRNAs lijkt direct beïnvloed te worden door p53, dat rechtstreeks bindt op enkele geconserveerde sites in de miR-34 promotorregio's (8). Ook zijn BCL2 en MYCN geïdentificeerd als miR-34a targets en zijn mediators voor het tumor-suppressor fenotypisch effect in neuroblastoma (zie ook verder) (11).

4.5.3. MiRNAs zijn betrokken als regulatoren van invasie en metastasering

Naast een rol in het ontstaan van primaire tumoren hebben miRNAs ook een rol in de tumorprogressie van kankers, inclusief metastasering. Om hun ontstaanslocatie te kunnen verlaten en zich op een andere plaats te vestigen hebben cellen verschillende biologische processen nodig zoals adhesie, migratie en invasie. Ook bij de regulatie van deze processen spelen miRNAs een rol, en kunnen veranderingen in de miRNA expressieniveaus het metastasepotentieel beïnvloeden. De belangrijkste voorbeelden hiervan zijn miR10b en miR-373. MiR-10b reguleert het eiwit TWIST1 dat een rol speelt bij het induceren van de transitie van epitheel naar mesenchym (EMT) en metastatische progressie. Zo werkt bvb miR-373 pro-metastatisch, maar is het ook geïdentificeerd als potentieel oncogeen in testiculaire kiemceltumoren (8).

4.6 MiRNA netwerken: complexer dan alleen de som van zijn delen

Uit studies van diverse maligniteiten blijkt dat miRNAs een belangrijke rol spelen in oncogenese als onderdeel van een coöperatief netwerk. MiRNAs functioneren met andere woorden als regulatoren van die processen in complexe netwerken (13). In deze netwerken heerst een grote redundantie in de zin dat meerdere miRNAs één enkele target kunnen hebben

en één enkele miRNA doorgaans tientallen target genen controleert (14). Hoewel deze redundantie in zekere mate het aantonen van functionaliteit voor individuele miRNAs kan bemoeilijken, kon toch voor heel wat miRNAs een directe rol in ontstaan van kanker aangetoond worden. Dergelijke miRNAs vormen mogelijk interessante doelwitten voor het ontwikkelen van een therapie (13).

4.7. Neuroblastoma heeft een zeer heterogene kliniek

Neuroblastoma (*NB*) is een embryonale tumor afkomstig van het sympatische zenuwstelsel. Neuroblastoma ontstaat tijdens de foetale of vroeg postnatale levensfase uit cellen afkomstig van het ectodermale weefsel ter hoogte van de neurale buis. Neuroblastoma wordt gekenmerkt door een zeer heterogene kliniek variërende van spontane regressie zonder therapie tot een zeer kwaadaardig en agressief fenotype, dat moeilijk reageert op intensieve multimodale therapie. Het is de meest frequente vorm van vaste extracraniele tumoren bij kinderen en de meest voorkomende maligne tumor bij zuigelingen. Neuroblastoma is een zeer maligne tumor en heeft een disproportionele hoge mortaliteit ten opzichte van zijn incidentie ten opzichte van andere pediatrische kankers (15). Neuroblastoma wordt geschat verantwoordelijk te zijn voor ongeveer 15% van de totale kankersterfte bij kinderen, hoewel het maar een incidentie heeft van 6 à 10 per miljoen geboortes (16).

4.8 Classificatie en staging van Neuroblastoma

Er zijn 2 stagingsystemen voor neuroblastoma. Enerzijds is er het International Neuroblastoma Staging System (INSS) dat gebaseerd is op heelkundige kenmerken zoals tumor-reseceerbaarheid, beoordeling van lymfeklieren en verhouding tot de middellijn. Desondanks de goede prognostische waarde zijn er toch enkele beperkende factoren zoals de vaardigheid van de chirurg, problemen met lymfekliersampling en niet-geopereerde patiënten. Daarom is er een gereviseerd stagingsstelsel voorgesteld in 2009 op basis van beeldvorming, het INRG. Hierbij worden tumoren ingedeeld op basis van aan- of afwezigheid van 20 gedefinieerde risicofactoren op beeldvorming. Metastatische tumoren worden geklasseerd als stadium M. Het stadium MS correspondeert met de INSS 4S classificatie, en refereert naar tumoren met metastases beperkt tot de huid, lever en het beenmerg. In tegenstelling tot 12 maand bij 4S volgens INSS, ligt bij INRG de cut-off leeftijd voor MS op 18 maanden (15). Deze stadium 4S tumoren zijn een speciale subgroep van tumoren met een bijzondere eigenschap. Hoewel deze gewoonlijk uitgebreid gemetastaseerd zijn, verdwijnen deze zonder

behandeling. Het vertraagd optreden van het celdoodprogramma in de neuronale ontwikkeling is de meest plausibele verklaring hiervoor (17).

4.9. Neuroblastoma is een genetisch heterogene aandoening

Neuroblastoma ontstaat uit multipotente cellen, die afkomstig zijn uit de neuro-ectodermale plooï en die afwijkingen verworven hebben door genetische mutaties en/of epigenetische veranderingen in belangrijke regulerende factoren die bijdragen tot de ontwikkeling van neuro-ectodermale cellen tot sympatische zenuwcellen en de migratie naar de sympatische strengen langsheen de aorta bewerkstelligen. Deze veranderingen geven aanleiding tot tumorigenese door het verlies van controle over de celproliferatie, differentiatie en apoptose (18).

De voornaamste moleculaire kenmerken voor neuroblastoma zijn amplificatie van het *MYCN* proto-oncogen, veranderingen in ploïdie en allelische deleties op de chromosomen 1p en 11q. *MYCN* amplificatie wordt gedefinieerd als meer dan 10 kopieën per cel van het *MYCN* oncogen, en is geassocieerd met gevorderde ziektestadia, snelle tumorprogressie en een slechte overlevingskans. *MYCN* amplificatie komt voor in ongeveer 25% van de primaire neuroblastomas. Ongeveer 40% van de patiënten met agressief neuroblastoom hebben *MYCN* amplificatie ten opzichte van 5 à 10% van de patiënten met een laag ziektestadium. Afwijkingen van de ploïdie zijn afwijkingen van het standaard aantal chromosomen, zijnde 23 paar homologen. De meerderheid (ongeveer 55%) van de primaire neuroblastomas zijn triploïd (drie paar) of 'near triploïd', en bevatten tussen de 58 en 80 chromosomen. De rest zijn ofwel 'near triploïd' of 'near tetraploïd'. Patiënten met near triploïde tumoren hebben een beter klinisch en biologisch vooruitzicht dan patiënten met near diploïde of near tetraploïde tumoren, voornamelijk bij kindjes met de agressieve ziekte. Deleties van chromosoom 1p en 11q suggereren de aanwezigheid van een tumor-suppressorgen op deze locaties. De 1p deleties komen ongeveer in 30% van alle neuroblastomas voor, meestal in associatie met *MYCN* amplificatie, met de kleinste gemeenschappelijke verliesregio zijnde de locus 1p36.

De 1p deleties komen voor bij ongeveer 70% van de hoge stadium neuroblastomas en zijn onafhankelijk van andere factoren geassocieerd met slechtere overleving. Deletie van 11q is aanwezig in ongeveer 40% van de gevallen. Ongebalanceerde deleties (met deels weerhouden of bijkomstig materiaal) van 11 komt meestal voor in tumoren die geen *MYCN* amplificatie

vertonen, maar zijn daarentegen toch sterk gecorreleerd met andere hoog risico kenmerken (15).

Neuroblastoma heeft ook een zeldzame familiale vorm, die voorkomt in 1% van de gevallen. Deze vorm verschilt van de sporadische vorm van neuroblastoma door een jongere leeftijd bij diagnose en is frequent gerelateerd aan andere ontwikkelingsstoornissen van de neurale kam zoals de ziekte van Hirschsprung, type I neurofibromatose en congenitaal centraal hypoventilatiesyndroom (19). Er zijn voorlopig 3 genen geïdentificeerd waarvoor er een verband is met familiaal neuroblastoma. Het PHOX2B gen, een homeobox bevattende transcriptiefactor die een cruciale rol speelt bij de ontwikkeling van noradrenerge cellen en bij differentiatiegraad van neuroblastoma (20). Het gemuteerde PHOX2B gen speelt een prominente rol in de ontwikkeling en dedifferentiatie van NB, en kan rechtstreeks interageren met de promotor van het ALK gen, een tweede gen betrokken bij de familiale vorm van neuroblastoma. Het ALK gen codeert voor een transmembraan receptor tyrosine kinase eiwit dat normaal enkel tot expressie komt bij de ontwikkeling van het centrale en perifere zenuwstelsel. Dit gen is ontregeld in ongeveer 50% van de erfelijke tumoren (19,21). Tenslotte is er het recentere ontdekte LMO1, dat tumorigenese stimuleert in bepaalde cellijnen (22).

4.10. Verduidelijking en schetsing onderzoeksvraag

Het doel van deze thesis is een beschrijving te geven van de huidige stand van zaken betreffende de ontwikkeling van miRNA therapeutica. Hierbij ligt de nadruk vooral op de mogelijkheden en de beperkingen van miRNA therapeutica. Omdat miRNA in quasi alle ziektebeelden wel een rol lijkt te spelen, is gekozen in samenspraak met mijn promotor om dit te beperken tot kanker.

In een tweede luik werd geopteerd om de toepassingsmogelijkheden van nieuwe miRNA therapeutica te evalueren voor de behandeling van neuroblastoma. De motivatie hierachter is dat neuroblastoma een type kanker is met een zeer heterogene klinische presentatie bepaald door een verscheidenheid aan genetische en epigenetische afwijkingen waarbij recentelijk aangetoond werd dat miRNAs een grote rol spelen.

5. Methodologie

Er werd een initieel een literatuurstudie uitgevoerd vertrekkende van de zoektermen met 'miRNA therapeutics', 'miRNA delivery', 'miRNA neuroblastoma' met een beperking van

maximum 5 jaar oud wegens de snelle evolutie van de technologie. Een analoge zoekopdracht werd uitgevoerd op Pubmed met de overeenkomstige MeSH termen. De initiële selectie van artikels die werden weerhouden gebeurde in functie van relevantie van het abstract en de titel. Deze artikels werden onderworpen aan een tweede selectie door middel van het beoordelen van de individuele relevantie. Daarna werd ook in de referenties van de weerhouden publicaties gezocht naar relevante artikels. Hierop werden geen restricties met betrekking tot de datum gebruikt. Deze procedure werd verschillende keren herhaald in de periode september 2011 tot februari 2013.

Omdat de eerste selectie artikels voornamelijk reviews waren, is er een tweede literatuurstudie uitgevoerd, met zoektermen die betrekking hadden op de technieken die gebruikt worden bij het ontwikkelen van miRNA therapeutica. De gebruikte zoektermen zijn combinaties van 'LNA', 'sponge', 'viral vector', 'delivery', 'nanoparticles' en de termen 'miRNA' en '*in vivo*'. Er werd wederom gekozen voor een beperking in de tijd van 5 jaar. Deze artikels werden via titel en abstract naar relevantie geschat en gelezen. De artikels die beschreven welke de voordelen, toepassingen en de beperkingen van deze technieken waren werden weerhouden. Hierbij zaten zowel reviews als publicaties van onderzoeken. Opnieuw werden de referenties van de publicaties doorzocht op relevante artikelen.

Voor het neuroblastoma gedeelte werd een zoekopdracht via PubMed uitgevoerd met de MeSH headers 'microRNA' en 'neuroblastoma'. Alle artikels die handelen over microRNA pathways en mogelijke therapeutische implicaties zoals targets van neuroblastoma werden weerhouden. De resultaten van deze studies werden gecombineerd tot een transcriptioneel netwerk. Vervolgens zijn de bevindingen vanuit het eerste luik op dit transcriptioneel netwerk toegepast.

6. Resultaten

6.1. Op miRNA gebaseerde therapie in kanker hebben potentieel

Het gebruik van miRNAs als therapeutische entiteit heeft de mogelijkheid om op een heel effectieve manier en met hoge specificiteit de expressie van bepaalde genen en genfamilies te reguleren op een zeer selective manier. Hierdoor kan miRNA een significante rol spelen in de behandeling van vele ziektes, waaronder kanker. Uiteraard is het hiervoor uitermate belangrijk om de rol van de veranderingen in de genexpressie doorheen de ontwikkeling van

het kankertype te kennen (23). De grootste kracht van miRNA therapeutica komt uit de mogelijkheid om de expressie van verschillende tumor-suppressorgen en/of oncogenen tegelijk te beïnvloeden. Hierdoor passen miRNAs in het huidige paradigma van kanker als accumulatie van verschillende verstoorde pathways, en waarbij een therapeutische interventie die op meerdere vlakken inwerkt een hogere kans op succes heeft. Het inhibitorisch effect van miRNAs op de expressie van een specifiek doelwitgen kan mild zijn en slechts tot een subtiele afname van proteïne-expressie leiden, maar de simultane neerregulatie van een brede set van doelwitten heeft veel verstrekkendere gevolgen met impact op het cellulaire fenotype (24). Hierdoor zijn miRNA therapeutica theoretisch veelbelovend, zowel op zichzelf als in combinatie met andere therapieën (25). Deze veelbelovende rol die aan miRNA therapeutica wordt toegeschreven, is reeds in andere velden in praktijk gebracht aan het worden. Op moment van schrijven is er een veelbelovend fase-3 trial aan de gang met *miravirsen*, een op LNA (cfr. infra) gebaseerde miR-122 antagonist tegen hepatitis C zonder aantoonbare neveneffecten (27).

Intratumorale genetische heterogeniteit draagt bij tot het risico op ontwikkeling van resistentie tegen therapie aangezien kleine klonen met genetische defecten die dergelijke resistentie bezitten tijdens dergelijke behandeling snel kunnen uitgroeien en zo tot herval kunnen leiden. Een ander probleem is intrinsieke genetische instabiliteit waardoor tumoren snel diverse genetische defecten accumuleren die vervolgens onderhevig kunnen zijn aan Darwiniaanse selectie door de therapie. Bijgevolg kan worden aangenomen dat tumoren op een analoge wijze ook voor miRNA therapeutica resistentie kunnen ontwikkelen (23). Anderzijds wordt echter vermoed dat het optreden van resistentie tegen een tumor-suppressor miRNA dat verschillende oncogene pathways reguleert minder waarschijnlijk is omdat één miRNA verschillende tumorale pathways kan reguleren (26).

Belangrijk is ook te vermelden dat bepaalde gedereguleerde miRNAs of miRNA handtekening ook kunnen fungeren als biomerkers voor diagnose, prognose of monitoring van therapie respons (23). Het gebruik van miRNAs als biomerkers valt echter buiten het doel van deze thesis, doch is het belangrijk deze gevonden biomerkers verder te onderzoeken omdat deze mogelijks naast merkers ook therapeutische doelwitten kunnen zijn voor miRNA therapeutica (26).

6.2. Strategieën voor miRNA therapeutica

Het doel van miRNA therapeutica is om de normale miRNA functie in de cel te herstellen. Concreet betekent dit het aanvullen van verloren miRNAs, of het normaliseren van een te hoge concentratie aan miRNAs (28).

6.2.1. MiRNA antagonisten.

MiRNA antagonisten (antagomiRs of antimiRs) zijn korte antisense oligonucleotiden (ASOs) die kunnen gebruikt worden als modulatoren van miRNAs zelf. Deze kunnen gebruikt worden tegen miRNAs die een 'gain of function' induceren in het ontwikkelingsproces van bepaalde aandoeningen. Deze strategie is conceptueel zeer gelijkend op andere inhibitorische aanpakmechanismen zoals gebruikt bij siRNAs en 'small molecule' inhibitoren. Deze strategie bestaat uit het verhinderen van de endogene functie van het miRNA door middel van enkelstrengige miRNAs met complementaire sequenties. Deze kunnen eventueel voorzien worden van aanpassingen in de riboseruggengraat die de affiniteit verbeteren voor het target miRNA (zie verder) (28). Het werkingsmechanisme van deze moleculen bestaat uit het binden van het endogene miRNA in een zodanige configuratie dat het niet kan verwerkt worden tot een miRISC complex, of op een zodanige manier dat deze binding leidt tot degeneratie van het endogene miRNA (24).

6.2.2. MiRNA sponzen

De miRNA sponzen zijn een andere toepassingsvorm van het principe van miRNA antagonisme, ontdekt door Ebert et al. Sponzen zijn RNA strengen met verschillende bindingsplaatsen complementair aan het doelwit RNA die gebruikt kunnen worden om de activiteit van een miRNA familie met een gemeenschappelijke seed-regio te verminderen tot zelfs volledig uit te schakelen. MiRNA sponzen kunnen stabiel worden geïntegreerd in het gastheergenoom samen met een promotor waarvan de expressie beperkt is tot de gewenste celtypes, weefseltype of stadium in de differentiatie/ontwikkeling (5). Aangezien sponzen gebruik maken van het transcriptiemechanisme van de cel kunnen er speciaal gekozen regulelementen in de promotorsequentie van het gen dat voor de spons codeert worden ingebouwd. Hierdoor kunnen het weefseltype en de differentiatiefasen, waarbij de spons tot expressie wordt gebracht worden beïnvloed. Anderzijds is door de inbouw in de cellen zelf slechts een beperkte toediening nodig, ten opzichte van antagomiRs die herhaaldelijk en periodiek moeten worden toegediend om een langdurig effect te verkrijgen. Sponzen hebben verschillende voordelen over chemische gemodificeerde ASO inhibitoren bij het gebruik in de

biologische experimenten, bvb door verschillende leden van een miRNA familie tegelijkertijd uit te kunnen schakelen en een lagere afhankelijkheid van volledige basenpaar-complementariteit (29).

MiRZips en TuDs (tough decoy RNAs) zijn speciale types miRNA sponzen die worden afgeschreven door RNA polymerase en wiens nuclaire export geoptimaliseerd is om een hoge cytoplasmatische concentratie te bereiken. Deze bieden het voordeel dat er een langer durende inhibitie kan worden bereikt door sponsvectoren die zich niet in het genoom incorporeren. MiRZips gebruiken de RNA polymerase III H1 promotor om een enkelvoudige miRNA hairpin tot expressie te brengen met 1 perfect complementaire arm tegen het target miRNA. Dit leidt tot degradatie van het target. TuD RNAs gebruiken de RNA polymerase III U6 promotor om een RNA tot expressie te brengen met verschillende target bindingsplaatsen tussen stamregio's van 18-basenparen die nuclease gemedieerde degeneratie van het TuD moeten helpen verhinderen. Voor de TuDs is de bindingsplaats perfect complementair met de target miRNAs maar worden er 4 nucleotiden geïnsereerd ter hoogte van de AGO2-site om inactivatie door cleaving van het TuD RNA te verhinderen (5).

6.2.3. miRNA agonisten

In tegenstelling tot miRNA antagonisten is het doel van miRNA agonisten, ook wel miRNA mimics genoemd, het herstellen van miRNA expressie voor miRs die een 'loss of function' ondergaan in ziektebeelden. Deze techniek is ook gekend als miRNA vervangtherapie en biedt een mogelijkheid om endogene tumor-suppressor miRNAs te gebruiken in de therapie, zoals men probeert bij gentherapie. Deze miRNAs hebben een gelijkaardige basenpaarsequentie als het verloren gegane, natuurlijk voorkomende miRNA en reguleren daardoor dezelfde set mRNAs als het aan te vullen miRNA (24). De therapeutische toepassingen leunen dus dicht aan bij siRNA. Ze hebben echter wel een breder potentieel effect dan siRNAs, die maar één specifiek doelwit hebben. Merkwaardig is dat miRNA mimics niet enkel een therapeutisch effect hebben op kankercellen met een gedaalde concentratie van het target miRNA, maar ook op cellen met een schijnbaar normale concentratie van dit miRNA. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de miRNA therapeutica voldoende inwerken op oncogene cellulaire pathways waar deze kankercellen verslaafd aan geworden zijn om met de oncogeniciteit te interfereren (28).

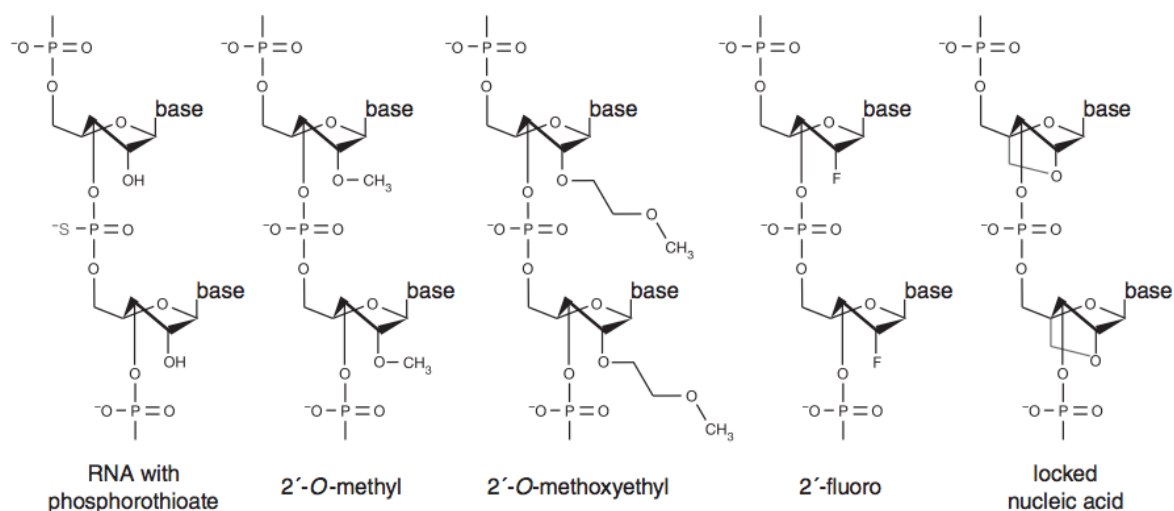
Door de intrinsieke werking van miRNA mimics is er een verdere modificatie nodig van de ‘*passenger strand*’ om de miRNA-duplex tegen nucleases te beschermen en om een eventuele immuunrespons te blokkeren. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van nucleotide-analogen, backbone modificaties en terminale modificaties (zie verder). De ‘*guide strand*’ wordt minder gemodificeerd om targetspecificiteit te behouden en om een maximale activiteit en incorporatie in het miRISC complex bewerkstelligen voor een optimale werking ervan. Het ontwerpen van deze molecules is complex, wat leidt tot een voorlopig gebrek aan in vivo data. In vitro is efficaciteit wel al aangetoond van een gemodificeerd miR-143 mimic op een muismodel door middel van een humaan coloncarcinoom xenograft (4).

6.2.4. miRNA maskers

MicroRNA-masker (miR-masker) oligonucleotiden zijn een therapeutische strategie ontwikkeld door Choi et al (30). MiR-maskers zijn synthetische enkelstrengige 2'-O-methyl gemodificeerde oligonucleotiden die complementair zijn voor de 3' UTR target mRNA dat concurreert met endogeen miRNA voor zijn target. Hierdoor is het miR-mask in staat om de werking van oncogene miRNAs tegen te gaan en translatie van target mRNAs te activeren. Hoewel hierdoor off-target effecten drastisch kunnen worden verminderd, is deze strategie nadelig voor kankertherapieën, waarbij het simultaan targetten van verscheidene pathways gewenst is (2,31).

6.3. Chemische modificaties van oligonucleotiden

Verschillende chemische modificaties zijn ontwikkeld in het veld van de RNA interferentie (RNAi) om de weerstand van RNA modulators tegen endonucleases te laten stijgen en de efficiëntie in de binding op hun target te verhogen. Omdat ze een analoog werkingsmechanisme hebben als miRNAs kunnen deze modificaties is de toepasbaarheid ervan overdraagbaar naar miRNA therapeutica (28).



Afbeelding 3: Illustratie van enkele van de besproken mogelijke modificaties aan RNA (5).

6.3.1. 2'-O methyl modificaties

De verbeteringen in weerstand tegen degradatie zijn gebaseerd op substitutie van de 2'-OH groep van de ribosering. Deze groep is het aanvallend nucleofiel waarop de werking van het de nucleases is gebaseerd, dus modificaties hierin verhogen de weerstand tegen deze nucleases. Voor antisense miRNA inhibitoren die een 2'-O-Methyl substitutie dragen (specifieker 2'-O-methoxyl of 2'-fluoride) is aangetoond dat ze een verbeterde stabiliteit, bindingsaffiniteit en miRNA inhibitie te hebben in vivo. Het gebruik van fosforothioaat-bindingen, waarbij een zwavelatoom een non-bridging zuurstofatoom vervangt, verbetert de weerstand van miRNA-modulatoren tegen nuclease gemedieerde degeneratie en geeft een betere binding aan serumproteïnes. Hierdoor vermindert de plasmaklaring en wordt de activiteitsduur verlengd, maar verlaagt de bindingsaffiniteit voor het target RNA. Ook wordt de toelevering van deze base- en backbone-gemodificeerde modulatoren bemoeilijkt door lage cellulaire uptake en off-target effecten (4).

6.3.2. Locked Nucleic Acids

Op moment van schrijven zijn Locked Nucleic Acids (LNA) de meest onderzochte miRNA inhibitoren. (4) Bij deze nucleïnezuuranalogen zijn van de aangrenzende riboseringen op de 2'-O en de 4'-O positie met elkaar verankerd. Hierdoor is de ribose beperkt tot een C3'-endoconformatie, analoog als in RNA-RNA of RNA-DNA koppelingen (32). Dit verhindert LNA de C2' endoconformatie aan te nemen die zich veel minder leent tot paring met RNA. Ook verhoogt de smelttemperatuur met 2.4° C per modificatie, wat een hogere specificiteit

voor de target sequentie met zich meebrengt. Daarnaast zijn LNAs ook resistent tegen verschillende endonucleases (5). Het gevolg van al deze eigenschappen is dat voor dezelfde hoeveelheid silencing een veel kleiner dosis nodig ten opzichte van antagomirs (4). De toepassingen van LNAs zijn echter niet beperkt tot miRNA therapeutica. Ook RNA-interferentie en het maken van aptameren zijn mogelijk (zie verder) (33).

Door het feit dat de bindingsspecificiteit dermate toeneemt en het feit dat de targetspecificiteit van miRNA bijna volledig afkomstig is van de seedsquentie is het mogelijk dat de antisense miRNA inhibitor korter is dan het te silenceren miRNA zelf. Dit is aangetoond in vivo, samen met het feit dat LNA gemodificeerde oligonucleotiden specifiek, stabiel en niet toxisch zijn. Deze resultaten hebben er toe geleid dat er nu een fase 2 studie loopt met LNA tegen miR-122 in het kader van een chronische hepatitis C infectie (27). Het combineren van bovenvermelde modificaties heeft een synergistisch effect. Het is in vitro aangetoond dat een combinatie van 2'-O-methyl, LNA en terminale fosforothiothaat modificaties ongeveer 10 keer effectiever zijn dan enkel de 2'-O-methyl of fosforothiothaat modificaties, en twee keer zo effectief als 2'-O-methyl modificatie in combinatie met LNA (5).

6.4. Toeleveringsmechanismen in vivo

Zoals bij conventionele therapieën is de gerichte in vivo toelevering van miRNA therapeutica naar specifieke cellen de grootste hindernis om te overwinnen. Er zijn verschillende methodes geprobeerd, elk met hun eigen mogelijkheden en beperkingen (34).

6.4.1. Lokale of systemische toediening

In vivo toelevering van miRNA therapeutica bij kanker kan ofwel door lokale toediening direct ter hoogte van het targetweefsel, ofwel kunnen de miRNA therapeutica het targetweefsel via de bloedbaan bereiken. Omdat ongemodificeerde naakte RNAs niet stabiel zijn in serum en andere biologische vloeistofcompartimenten is lokale toediening een mogelijke toedieningsweg om de blootstelling van miRNAs aan degeneratie te verhinderen. Anderzijds helpt lokale toediening ook om de blootstelling in niet-gewenste weefsels te beperken desondanks de rudimentaire techniek. Deze aanpak is echter beperkt tot lokale en goed bereikbare tumoren. Dit is uiteraard niet mogelijk voor metastasen en ook efficiëntie voor optimale modulering in alle cellen van de primaire tumor is verre van optimaal (4).

Conceptueel gezien is systemische toelevering de meest aantrekkelijke optie omdat het theoretisch een simpele toedieningsweg van miRNA therapeutica toelaat via de bloedbaan. Desondanks zijn er verschillende barrières, die overwonnen moeten worden bovenop nuclease degeneratie, die leiden tot een lage biobeschikbaarheid. Verder zijn alle partikels kleiner dan 50 kDa onderhevig aan renale filtratie en klaring, wat problemen kan geven voor miRNA molecules omdat deze gemiddeld slechts 7 à 20 kDa groot zijn. Ook is er fagocytose door circulerende macrofagen en monocyten. Eens het miRNA therapeuticum de target cellen bereikt heeft, moet het zich doorheen de capillaire membraan verplaatsen. Dit is echter moeilijk voor partikels groter dan 5 nm. Een voordeel van kankers als target is dat ze vaak fenestraties hebben in het vasculaire endotheel als gevolg van een gebrekkige bloedvatvorming. Deze fenestraties kunnen tot 200 nm groot zijn, waardoor er een betere permeabiliteit en retentie optreedt ter hoogte van de targetcellen ten opzichte van de non-targetcellen (Enhanced Permeability and Retention effect). Ook bestaan de extracellulaire matrix en bindweefsel rondom de targetcellen uit met elkaar gelinkte macromolecules, wat diffusie naar het targetweefsel bemoeilijkt voor grote molecules, zoals miRNA therapeutica. Om tenslotte het cytoplasma van de doelwitcel te kunnen bereiken moeten de miRNA modulatoren worden geëndocyteerd. Kankercellen hebben echter vaak een gebrekkige endocytose. Vervolgens moeten de miRNA modulatoren worden vrijgesteld uit het endosoom, omdat ze andersonderworpen worden aan degradatie door een progressieve pH-daling. Tenslotte is er voor molecules die coderen voor miRNA precursoren of miRNA sponzen ook nog de vereiste dat ze getransporteerd worden naar de celkern doorheen de nucleaire membraan. (4,5).

Door alle bovenstaande factoren is systemische toediening van naakte miRNAs het meest effectief voor lever, longen, jejunum en nieren. Om deze biologische hordes te overwinnen kunnen de miRNA modulatoren aangepast worden door chemische modificaties, conjugatie en encapsulatie met als doel een betere bescherming te bieden tegen biologische degradatie en renale klaring, en hun toelevering ter hoogte van tumorcellen te verbeteren (4).

6.4.2. Virale vectoren

Virale vectoren zijn virussen speciaal aangepaste virussen die niet meer te kunnen repliceren, zodanig dat ze verhinderd worden om een infectie over te dragen. Deze virussen dragen speciale miRNA cassettes, die na binnendringen in de cel en het vrijstellen van hun genetisch

materiaal (*transductie*) door deze virussen tot expressie worden gebracht. Vervolgens worden deze geëxprimeerde precursors door de cellulaire machinerie verwerkt tot functionele miRNAs (34). Er zijn vier types virussen die courant gebruikt worden om RNA gebaseerde therapeutica (waaronder miRNAs) in cellen toe te leveren met elk hun eigen mogelijkheden en beperkingen.

Adenovirale vectoren (Ad) zijn DNA virussen afkomstig van de adenoviridae familie, die verantwoordelijk is voor 5 à 10% van de bovenste luchtweginfecties bij kinderen, en voor verschillende infecties bij volwassenen. Ze repliceren in de celkern maar integreren hun genoom gewoonlijk niet in dat van de gastheer. Ze kunnen zowel delende als niet delende cellen infecteren en kunnen in hoge titers aangemaakt worden. De recentste adenovirale vectoren kunnen ongeveer 37 kilobasenparen aan vreemd materiaal bevatten om te insereren in de gastheercel. De toxiciteit van deze vectoren is laag door de afwezigheid van (virale) genen verantwoordelijk voor immunostimulatie. Hierdoor is een hoge transgene expressie mogelijk met een lage toxiciteit. Een adenovirale vector is echter onpraktisch omdat hij door het activeren van het immuunsysteem van de gastheer slechts één keer kan gebruikt worden, en dat hij slechts kortdurend werkt door het gebrek aan integratie in het genoom. Het grootste nadeel is de krachtige stimulatie van de aangeboren en cellulaire immuunrespons die voor toxiciteit kan zorgen en waardoor de efficiëntie van de toelevering sterk afneemt. Dit is onafhankelijk van de expressie van virale genen, hoewel afwezigheid ervan de intensiteit verlaagt. Adenovirale vectoren zijn ideale manieren om miRNA expressiecassettes in cellen af te leveren in vitro, maar zijn ook al bewezen (kortdurend) te werken in vivo. Belangrijk is wel om te vermelden dat Ad vectoren geen verandering of verzadiging van de miRNA silencing machinerie te weeg brengen. Door de hoge capaciteit zijn deze virussen geschikt om eiwitten te co-exprimeren of meerdere miRNA cassettes af te leveren. Een andere aanpak is het gebruik van oncolytische (= virussen die enkel tumorcellen aanvallen) adenovirussen samen met RNAi cassettes (35). Hoewel er al vele succesvolle klinische studies uitgevoerd zijn met adenovirussen zijn de voornaamste beperkingen van adenovirussen nog altijd immunostimulatie en moeilijke productie op grote schaal (36).

Adenovirus geassocieerde virussvectoren (AAV) zijn virussen zonder enveloppe van de parvoviridae familie met een enkelstrengig DNA-genoom van 4.7 kilobasenparen lang bestaande uit genen voor replicatie, packaging en integratie. AAV is voor zijn replicatie afhankelijk van een helpervirus zoals adenovirus of herpes simplex virus. Zonder dit

helfvirus produceert AAV een integratie in het gastheergenoom op een zeer specifieke plaats, of blijft het latent doch actief aanwezig (*episomale status*) in afwachting van integratie door een helper virus. Door de deletie van het virale *Rep* proteïne dat vereist is voor efficiënte integratie blijft de AAV vector voornamelijk latent actief in het cytoplasma zonder integratie in het gastheer genoom, doch is integratie reeds beschreven. Betreffende insertie heeft AAV een voorkeur voor breuken en breukgevoelige regio's in het DNA, waaronder regio's gevoelig voor endonuclease cleaving, CpG eilanden, sites van actieve transcriptie en palindroomaal DNA. Omtrent de oncogene inductie door insertie is de literatuur tegenstrijdig, en zijn er verdere studies nodig. AAVs kunnen zowel delende als niet-delende cellen infecteren en hebben een gebrekkige immunogeniciteit door hun slecht vermogen om antigen-presenterende cellen te invaderen en hun genetisch materiaal over te dragen (*transducen*). Er zijn verschillende serotypes beschikbaar met elk hun eigen immunogeniciteit en eigen specifieke cellen die ze infecteren, maar er kunnen ook tussenvormen gemaakt worden door virale genen te combineren (*pseudotyperen*). Door hun klein formaat en afwezigheid van pathogeniciteit in mensen zijn AAV vectoren uitermate geschikt voor de toelevering van miRNA-modulatoren. Hiervoor zijn deze dan ook reeds uitgebreid in vivo bestudeerd, waaronder ook op mensen (34) .

Retrovirussen (RV) zijn geënvelopeerde virussen die behoren tot de familie van de retroviridae en bezitten een 10 kilobasenparen groot enkelstrengig RNA in 2 kopieën. Bij het invaderen van een cel wordt hun RNA gekopieerd op DNA via het reverse-transcriptase enzym en geïntegreerd in een van de chromosomen van de gastheer. Dit laat toe om de geïnsereerde genen gedurende lange tijd tot expressie te brengen, doch kan er na verloop van tijd silencing optreden. De insertie in het genoom kan echter alleen plaatsvinden bij delende cellen, omdat het transport van DNA naar de kern toe een incomplete nucleaire membraan vereist, wat enkel in de mitose voorkomt. Omdat proteïnesynthese niet vereist is voor entry en integratie in het genoom kunnen alle virale genen vervangen worden door exogene sequenties. Pseudotyperen is ook mogelijk. Een andere beperking van RV vectoren is de insertie op ongewenste locaties in het genoom. RV insereren bij voorkeur bij plaatsen waar de transcriptie begint, wat het risico op oncologische ontregeling van de gastheercellen sterk verhoogt. Om de veiligheid te verhogen zijn zogenoemde zelf-inactiverende vectoren (SIN) ontwikkeld, met een deletie thv de 3' LTR die de transcriptiebevorderende factoren in de promotor wegneemt, zodat de expressie op hetzelfde niveau blijft. (34) .

Lentivirale vectoren zijn een subgroep van de retrovirussen. Het bekendste en meest bestudeerde lentivirus is HIV type 1 (HIV-1), maar er zijn lentivirale vectoren beschikbaar op basis van andere immunodeficiëntievirussen. LVs integreren zich analoog met RVs ook stabiel in het genoom, en er zijn ook SIN varianten voor beschikbaar. Een verschilpunt is wel dat LVs zich preferentieel insereren ter hoogte van introns van actieve transcriptie-units, waardoor ze minder oncogeen zijn. Net zoals bij RVs is pseudotyperen ook mogelijk om een breder scala doelwitcellen te bekomen. LVs kunnen, in tegenstelling tot RVs echter, ook niet-delende cellen transduceren. Initiële data van verschillende klinische trials toont aan dat er een goeie efficaciteit en veiligheid is van LV, maar verder confirmatie is nodig met meer patiënten en verder follow-up studies (34).

Hoewel virale toelevering een aantrekkelijke manier is door snelle toelevering, lokale toediening en langdurig effect, zijn er toch enkele waarschuwingen betreffende veiligheid. Efficiënte toelevering kan hyperreactiviteit van het immuunsysteem uitlokken in de gastheer, en een effectieve entry in de cel betekent ook dat er een grote hoeveelheid insertie plaatsvindt in het genoom van de gastheer. Dit impliceert een grote kans op onderdrukking van cruciale genen of activatie van proto-oncogenen. Anderzijds kan de toegenomen hoeveelheid miRNA in de cel ook de transportersystemen (bvb Exportin-5) verzadigen, waardoor er een ongewenste deregulatie ontstaat van de genexpressie. Hierdoor lijkt het nuttiger om een induceerbaar expressiesysteem voor het shRNA in de vector te includeren dan het pri-miRNA, zodanig dat enkel de benodigde hoeveelheid RNA aangemaakt wordt gedurende een bepaald tijdsinterval (34).

De voordelen van bovenstaande virale vectoren zijn dus de mogelijkheid om een langdurige en effectieve expressie van de gewenste miRNA-modulatoren te bekomen, en de hoge efficiëntie van transductie van deze virale partikels voor verschillende celtypes. Desondanks kunnen er door integratie van het virale genoom in het DNA ongewenste effect optreden. Hiervoor kunnen problemen met de plaats van insertie aan de basis liggen, maar ook ongewenste immuuneffecten die optreden ten gevolge van de virale vectoren (34).

6.4.3. Liposomen

De eerste nanostructuur met een biologische toepassing was het liposoom (23). Liposomen zijn deeltjes met een fosfolipide dubbellaag met een hydrofiele kern, gestabiliseerd door

elektrostatistische interacties, die de nucleinezuren kunnen bevatten. Hierdoor ontstaan vesikels tussen 50 en 500 nm diameter, groot genoeg om renale filtratie te verhinderen (5). Liposomen worden voornamelijk gebruikt als opslagmiddel voor geneesmiddelen en het transport naar het doelwitweefsel. Er zijn verschillende chemische modificaties van het oppervlak ontwikkeld om de biobeschikbaarheid te vergroten, zoals bv. polyethyleenglycol (PEG). De beperkende factoren als miRNA carriers hebben voornamelijk betrekking op hun stabiliteit in diverse biologische omgevingen en hun vermogen om geneesmiddelen doorheen biologische barrières te vervoeren (23).

Andere beperkingen van liposomen als toeleveringsmethode zijn de lagere ‘drug loading’ capaciteit en de snelle lekkage in vergelijking met andere nanopartikels van dezelfde grootte (37). Liposomen hebben de neiging om te accumuleren in het reticuloendotheliaal systeem, waardoor ze snelle klaring in de lever ondergaan en een kort serum-halfleven hebben. Anderzijds hebben ze op zichzelf geen target-specificiteit. Dit samen leidt tot een slechte penetrantie in andere weefsels (23).

Lipoplexen zijn liposomen die positief geladen (kationische) lipiden bevatten om de negatieve lading van de nucleinezuren binnenin uit te balanceren. Uiteindelijk is de resulterende nettolading van de lipoplexen positief, waardoor de liposomen kunnen binden aan de anionische oppervlaktereceptoren (5). Lipoplexen zijn voornamelijk een frequent gebruikte techniek in vitro. Hierbij worden de negatief geladen nucleinezuren beschermd van de omgeving door interactie met de positief geladen lipiden, waarbij liposomen gevormd worden. Deze liposomen kunnen fuseren met de celmembranen. Hierbij blijven de lipiden achter in de celmembraan, waardoor de nucleinezuren in cel vrijgesteld worden. Desondanks de efficiëntie in vitro zijn lipoplexen in vivo cytotoxisch en sterk immunogeen (34). Zowel liposomen in het algemeen als lipoplexen kunnen zeer sterke type I en II interferonresponses induceren. Ze vertonen dosisafhankelijke toxiciteit en kunnen pulmonaire inflammatie veroorzaken ten gevolge van zogenaamde reactieve zuurstofspecies (ROS) (23).

De stabiliteit, toxiciteit, immunogeniciteit en duurzaamheid van de liposomen en lipoplexen bemoeilijken de klinische toepasbaarheid ervan (34). De recente ontwikkelingen van solide nanopartikels bieden een oplossing voor bovenstaande problemen. Deze nanopartikels, zoals bio-abbrekbare polymeren, induceren minder inflammatie, geven een excellente

biocompatibiliteit met minimale toxiciteit en zijn goedkoper dan conventionele polymere carriers (23).

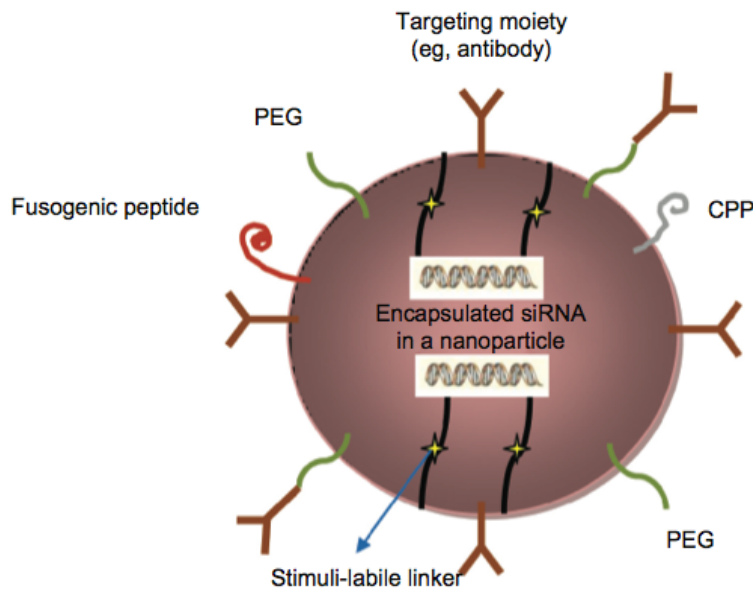
6.4.4. Nanopartikels

Nanopartikels zijn positief geladen deeltjes met een diameter van ongeveer 50–70 nm. Ze induceren een minimale inflammatoire respons, en de negatief geladen miRNAs zijn analoog als bij de liposomen verpakt in de kern van de nanopartikels. Dit verhoogt de stabiliteit en laat toe dat de miRNAs geleidelijk vrijgesteld worden voor continue knock-down. Recente klinische studies die nanopartikels als toeleveringsmechanisme gebruiken voor solide kankers tonen veelbelovende resultaten (34). Partikels met een diameter groter dan 5 nm passeren niet gemakkelijk door het normale capillaire endotheel en blijven daardoor in het lichaam tot ze geklaard worden. Door specifieke vasculaire kenmerken, zoals het geval is bij de milt, lever en sommige types tumor, is het op dergelijke plaatsen mogelijk voor molecules tot 200 nm diameter uit de bloedvaten te treden (23).

Nanopartikels zijn veelbelovende toeleveringsvectoren door hun effectiviteit en stabiliteit met minimale toxiciteit in diermodellen. Ze kunnen aangepast worden om hoge doelwitspecificiteit te verkrijgen door ze bvb het koppelen van met antilichamen tegen bepaalde celtypes. Hierdoor kunnen de oligonucleotiden binnenin voornamelijk worden afgeleverd in de gepaste weefsels, met een minimum aan interactie met de omgeving. Nanopartikels kunnen in het algemeen gebruikt worden om de stabiliteit en transportefficiëntie van therapeutica te verbeteren, gericht toe te leveren in een specifieke celtypes of weefsels en toxiciteit van de inhoud ter hoogte van normale cellen te vermijden. Hierdoor worden de effecten van de therapeutica beperkt wordt tot het beoogde weefsel. ook kunnen ze helpen een efficiënte doorgang doorheen endotheliale of epitheliale barrières te bewerkstelligen en meerder therapeutica tegelijk toe te leveren (23).

De samenstelling van deze partikels kan worden aangepast met het oog op het faciliteren van diffusie doorheen de celmembraan, endosomale membraan of nucleaire membraan, en om de endosomale release aan te moedigen eenmaal het deeltje zich in de cel bevindt (5). Nanopartikels worden voornamelijk in de cel opgenomen door endocytose tot endosomen die de miRNA modulatoren bevatten. Deze miRNAs moeten in de late endosomale fase ontsnappen uit het lysosoom, hetwelke anders de miRNAs degradeert. Fusogene lipiden en

peptiden, fotogevoelige molecules, pH-gevoelige lipoplexen en –polyplexen zijn enkele mogelijke mechanismen die gebruikt kunnen worden om endosomale ontsnapping te verbeteren (23). Desalniettemin is het exacte mechanisme waarop nanopartikels hun lading vrijstellen nog altijd niet opgehelderd (37) .



Afbeelding 4: Schematische voorstelling van een nanopartikel toeleveringssysteem voor siRNA therapeutica (23).

Love et al hebben kunnen aantonen dat deze techniek veilig en effectief is voor in vivo applicatie, en dit aan een dosis die tot 100 keer lager ligt ten opzichte van de conventionele liposomen. Hierdoor ontstaat ook de mogelijkheid om verschillende miRNA modulators tegen hetzelfde mRNA samen in hetzelfde liposoom aan te bieden zonder de toxiciteit te verhogen, wat efficiëntie en effectiviteit te goede komen. Om deze redenen wordt er geanticiepeerd dat deze techniek handig zal blijken voor het toeleveren van anti-miRNA in specifieke weefsels en organen bij mensen (38).

Incorporatie van siRNAs in gouden nanopartikels is als eerste verwezenlijkt. Desondanks hun klein formaat en een groot contactoppervlak is chemische modificatie van zowel het partikeloppervlak als oligonucleotide inhoud nog steeds vereist. Nanopartikels bestaande uit poreus silicium zijn ontworpen als respons hierop. Multistage toeleveringssystemen zijn een strategie die toelaat dat er specifiek getargette nanopartikels gegenereerd worden (bvb met aptameren, antilichamen, kleine peptiden) die hun oligonucleotiden op een trage, gerichte en onderhoudende manier vrijstellen. Een recent ontwikkelde aanpakingswijze is een multistage

toeleveringssysteem bestaande uit twee bio-afbreekbare en bio-compatibele carriers. De primaire zijn bioafbreekbare siliciumpartikels die de vrijstelling van de secundaire carriers met oligonucleotiden bewerkstelligen. Deze techniek heeft aantoonbare effecten tot 3 weken na toediening, zonder observeerbare toxiciteit (23).

Sommige tumorale kenmerken kunnen worden uitgebuit voor de toelevering van deze nanopartikels, zoals de verbeterde permeabiliteit en de verhoogde retentie ten gevolge van de abnormale neovascularisatie, dat ook teruggevonden wordt in de peritumorale inflammatie. Deze bloedvaten zijn vaak verstoord of niet volledig gevormd, waardoor molecules vanaf een bepaalde grootte veel meer weerhouden worden dan in het normale weefsel. Anderzijds zijn er ook beperkingen die optreden door de tumorale micro-omgeving die interfereren met het bereiken van therapeutische concentraties voor deze molecules, bvb de hogere interstitiele druk in soliede tumorweefsel en de extracellulaire matrix tgv groei van peritumoraal bindweefsel kunnen diffusie verhinderen (23).

Nanopartikels hebben nog altijd een paar beperkingen. Ten eerste moeten alle partikels de cellen bereiken en opgenomen worden in de cellen. De voornaamste biologische barrières die ze moeten overwinnen zijn de mucosa en de cellulaire en humorale immuniteit. Deze molecules hebben de neiging om gesequestreerd te worden door negatief geladen serumproteïnes in de bloedbaan, maar kunnen ook door immuuncellen opgenomen worden na herkenning door specifiek bindende eiwitten. Er zijn modificaties mogelijk qua grootte, oppervlakte-functionaliserings- en structurele eenheden om deze barrières te overkomen. Zo kan bvb het toevoegen van PEG of andere hydrofiele conjugaties op het oppervlak van de vesikels de eiwitsequestratie verminderen, helpen het immuunsysteem te ontwijken, sterische stabilisatie geven en beschermen tegen de effecten van de micro-omgeving. Deze partikels worden wel zeer snel geklaard. Het reticulo-endotheliaal systeem in de lever, milt, long en beenmerg kan partikels groter dan 100 nm diameter filteren, zodat ze vervolgens afgebroken worden door geactiveerde monocyt en macrofagen. Anderzijds ondergaan partikels kleiner dan 4 nm meestal snel renale klaring. De optimale diameter is dus 5-100 nm. Nanopartikels hebben vaak systemische toxiciteit, voornamelijk ter hoogte van de lever. Hemolyse, thrombogeniciteit en complementactivatie kunnen ook voorkomen als gevolg van bepaalde fysische of chemische eigenschappen van nanopartikels zoals lading en grootte. Deze kunnen aanleiding geven tot een verandering in biodistributie en mogelijke toxiciteit. Anderzijds zijn

de huidige toepassingen gebaseerd op frequente injecties, die door gedaalde bereidwilligheid de patient voor injecties hun klinische toepassing kan tegenwerken (23).

Het is ook mogelijk om verschillende miRNAs en/of siRNAs in nanopartikels te combineren in één toediening, zoals aangetoond door Chen et al. (39). Dit leidt tot minder nevenwerkingen (cfr supra) en een breder toepassingsvlak van de toepassingen van miRNA therapeutica, en is een zeer groot voordeel ten opzichte van de huidige therapeutische mogelijkheden (34).

6.5. Targetting van miRNA therapeutica

Het specifiek targetten van tumorcellen kan zowel neveneffecten doen verminderen, alsook de benodigde hoeveelheid oligonucleotiden die moeten worden toegediend om het zelfde effect te verkrijgen.

6.5.1. Ligand targetting

Conjugatie van ligand molecules verhoogt de stabiliteit en de opname in de cel door de binding op serum albumine te verbeteren, waardoor er een betere biodistributie ontstaat in sommige weefsels. Zo zorgt bijvoorbeeld cholesterolconjugatie voor een verhoogde opname in de lever door middel van interactie met de LDL en HDL lipoproteïnes. Hoewel deze toeleveringsweg effectief is, gaat hij gepaard met een verhoogde toxiciteit en verstoring van de biologische activiteit. Analooch is het gebruik van receptoren voor foliumzuur en transferrine om opname in de cel te bewerkstelligen. Beide types receptoren worden vaak tot expressie gebracht in verschillende tumortypes, en zijn aantrekkelijk door hun lage toxiciteit, eenvoudige chemische conjugatie en gebrek aan immuunrespons (23).

6.5.2. Antilichamen tegen specifieke receptoren

Antilichamen hebben naast mogelijke therapeutische effecten ook de mogelijkheid om te dienen als targetting molecules. Deze kunnen zowel vastgemaakt worden aan de miRNA-modulatoren zelf, als aan de carriermechanismen van deze modulatoren (23). Voor carriers met op antilichamen gebaseerde targettingsmechanismen is aangetoond dat ze effectief zijn zowel voor systemische of celspecifieke toelevering. De beperkingen van deze techniek zijn hoofdzakelijk het potentieel tot induceren van immuniteit en de voorlopig hoge kostprijs (40).

Een specifiek voorbeeld ervan zijn single chain variable fragment (scFv) antilichamen gemaakt tegen receptoren op het celoppervlak. Deze antilichamen zijn speciaal samengesteld om een zo klein mogelijk functioneel variabel domein te genereren. Ze bestaan uit de Very-Heavy (VH) en Very-Light (VL) ketens, verbonden met een korte linkerpeptide van 10-25 aminozuren (4). ScFv heeft verschillende voordelen over conventionele monoclonale antilichamen of small molecules als targettingstrategie, zoals sterke affiniteit, lage toxiciteit en lage inductie van een ongewilde immuunrespons (39).

Voor een combinatie van een scFv-antilichamen en protamines is een significante daling van tumorvolume aangetoond met weinig toxiciteit en immunogeniteit (4). Gelijkaardige resultaten qua efficaciteit en toxiciteit werden ook behaald door Tivnan et al. die met dezelfde scFv techniek werkten. De invloed door de werking van het scFv fragment is hierbij uitgesloten doormiddel van een negatieve controle (37).

6.5.3. Aptameren

Een andere techniek die nog verder moet worden uitgewerkt zijn RNA-ligands (aptameren). Dit zijn peptiden of (gemodificeerde) oligonucleotiden initieel ontwikkeld om specifieke receptoren op het celoppervlak te targetten door zichzelf op te vouwen in een specifieke driedimensionale confirmatie, maar deze kunnen ook gebruikt worden als targettingstrategie voor oligonucleotiden (4). Aptameren kunnen direct worden vastgemaakt aan het miRNA, of niet-covalent worden gekoppeld. Aptameren hebben een zeer hoge affiniteit en specificiteit voor targets, vergelijkbaar met antilichamen, maar zijn tot factor 10 kleiner. Hoewel dit een veelbelovend targettingmechanisme is door zijn specificiteit en lager risico op immuniteit, zijn de beperkingen die aptameren voorlopig tegenhouden voornamelijk de slechte farmacokinetiek en biodistributie (40).

6.6. Beperkingen inherent aan het therapeutisch gebruik van miRNA

Er zijn ook beperkingen die onlosmakelijk verbonden met het werkingsmechanisme van miRNA, waarop miRNA therapeutica inwerken.

6.6.1. Off target effecten

Off target effecten zijn effecten die plaatsvinden naast het gewenste effect. Er is een inherent risico hiervoor door het werkingsmechanisme van miRNA zelf, zijnde dat 1 miRNA familie verschillende genexpressies aantast door in te werken op een grote variatie aan mRNA afkomstig van andere genen. Anderzijds kan 1 mRNA ook worden getarget door verschillende miRNAs. Het gebruiken van verschillende miRNAs die eenzelfde mRNA als target hebben kan de concentratie die nodig is voor hetzelfde effect doen dalen en tegelijk de specificiteit van de silencing verbeteren (34).

6.6.2. Verzadiging van de cellulaire machinerie

Omdat de stappen in het proces vanaf de verwerking van miRNA tot het effectief silencen van genen enzymatisch gekatalyseerd worden, bestaat er voor die stappen ook een verzadigingspunt. Het inbrengen van exogene RNAs in hoge concentratie kan deze processen verstoren op een dosisafhankelijke manier, leidende tot een daling of zelfs uitval van het regulatiemechanisme, afhankelijk van de plaats in het proces waar de verstoring optreedt. Naar analogie met de uitval van Dicer kan dit niet alleen de tumorigenese versterken, maar ook de overleving van de cel in gevaar brengen (23). Dit is voornamelijk een probleem bij virale RNAi vectoren met een sterke promotor, en lijkt voor miRNA exprimerende vectoren een beperktere rol te spelen in de veiligheid (35).

Aspecifieke off-target effecten zijn minder waarschijnlijk bij miRNA mimics omdat deze door hun identieke basenpaarsequentie verwacht worden zich te gedragen zoals hun natuurlijk voorkomende evenbeelden, waarvoor de miRNA-mRNA interacties over miljoenen jaren zijn geëvolueerd (24).

Deze toxiciteit kan het gevolg zijn van het overladen van RISC met exogeen miRNA, waardoor er competitie ontstaat met de endogene miRNAs die instaan voor de normale cellulaire werking, en/of hyperactivatie van cellulaire processen die de levensvatbaarheid van normale cellen verminderen. Voor een dergelijke toxiciteit bij miRNA mimics is echter nog altijd geen in vivo evidentie gevonden. Muisstudies suggereren zelfs dat miRNA mimics van tumor-suppressor toelevering in gezonde weefsels goed getolereerd wordt. Voor deze bevinding zijn er verschillende hypothesen. Deze variëren van het reeds geactiveerd zijn van de pathway die de mimics terug proberen te activeren; het bewerkstelligen van een niet-

significante verhoging van de miRNA functie ten opzichte van de baseline; dat niet-oncogene cellen niet afhankelijk zijn van de oncogene pathways zodanig dat ze geen tragisch effect ondervinden van tumor-suppressie en dat normale cellen de miRNA-mimic functie kunnen reguleren (24).

6.6.3. Anti-RNA immuuneffecten

Dubbelstrengig RNA kan een activatie van het aangeboren immuunsysteem uitlokken. De sterkte van deze activatie wordt bepaald door de hoeveelheid RNA en door de lengte en de samenstelling van de sequenties RNA. Voor strengen met een lengte kleiner dan 30 basenparen is er slechts minimale activatie geobserveerd, maar grote hoeveelheid uracil of guanyl-rijke sequenties zijn gerapporteerd een significante immuunrespons te genereren (34). Deze immuunrespons vindt plaats door middel van type I interferon en pro-inflammatoire cytokines, al dan niet met tussenkomst van de Toll Like Receptoren (TLRs). Wanneer nucleinezuren de endosomale en lysosomale compartimenten binnenkomen worden TLR-3, TLR-7 en TLR-8 geprimed en migreren ze naar de kern om de *nuclear factor κ -light chain enhancer of activated B-cells* (NF- κ B) te activeren die aanleiding geeft tot een respons gemedieerd door interferon- α en inflammatoire cytokines. De aangeboren immuunrespons die niet gemedieerd is via TLR wordt hoofdzakelijk uitgelokt door cytoplasmatische RNA sensoren waaronder *dsRNA-dependant proteïne kinase R* en *retinoic acid inducible gene-I*. Deze respons geeft aanleiding tot de activatie van de interferon- β pathway en andere inflammatoire mediators (23). Bij de ontwikkeling van kleine RNA-gebaseerde therapieën moet dus voorzichtig omgesprongen worden met het ontwikkelen van de samenstelling. Anderzijds kan het gebruik van aangepaste nucleotiden, zoals LNA, de benodigde hoeveelheid doen dalen, en dus ook de kans op aangeboren immuunactivatie (34).

6.7. Voorwaarden voor de keuze van het miRNA om op in te grijpen

MiRNA modulators hebben een unieke mogelijkheid om verschillende gentranscripten tegelijk te reguleren, in contrast tot RNA interferentie. Bader et al zijn van mening dat de uitgangspositie voor de keuze van het te beïnvloeden miRNA de status in het zieke weefsel is, in tegenstelling tot de genen die erdoor gereguleerd worden. De filosofie hiervoor is dat de mimic dezelfde sequentie draagt en dus dezelfde genen zal reguleren. Desalniettemin is het nuttig om de onderliggende regulatiepathways en genen van het target miRNA te kennen, voor verder onderzoek en het monitoren van de werking. Een voorbeeld hiervan is dat in een

borstkankermodel let-7 suppletie veel effectiever is dan repressie KRAS, een proto-oncogenisch target ervan. Dit suggereert dat repressie van andere target-genen nodig is in samenwerking met KRAS om het volledige potentieel te benutten van miRNA therapeutica. De werking is echter niet beperkt tot aanvullen van lage miRNA niveaus, maar kan ook de gewenste respons uitlokken in aangetaste cellen met normale miRNA niveaus. Dit is voorlopig enkel in vitro aangetoond voor miR-34a en nog niet in vivo, maar de achterliggende hypothese is dat de cellen zodanig verslaafd zijn geworden aan oncogene pathways, waar miR-34a op inwerkt. Dit effect is echter nog niet aangetoond in vivo (28).

Jackson en Levin beschrijven drie hordes die overwonnen moeten worden bij de keuze van een miRNA-target die Bader lijken tegen te spreken. Ten eerste is er nood aan identificatie van de sleutelmiRNAs van pathways en netwerken. MiRNAs kunnen honderden targets reguleren, maar niet al deze targets spelen een rol in het te reguleren fenotype. Hierdoor is het moeilijk om het achterliggende mechanisme van één miRNA exact te definiëren, en moeilijk om een miRNA modulator therapeutisch te optimaliseren. Ten tweede moet er rekening gehouden worden met de biologische context. Niet alle cellen brengen dezelfde target mRNAs tot expressie. Hierdoor kan één microRNA verschillende pathways targetten, afhankelijk van het type en ziektestatus van het weefsel waarin het tot expressie komt. Tenslotte zijn er nog de soortspecifieke effecten. Hoewel de miRNAs zeer sterk geconserveerd zijn tussen verschillende diersoorten, bvb tussen muizen en de mens, is dit niet altijd het geval voor hun mRNA targets. Hierdoor ontstaan 2 verschillende pools van targets met een grote overlap. Hiermee moet rekening gehouden worden bij de selectie van targets en modellen van geneesmiddelen. Een voorbeeld hiervan is het let-7 gen dat voor eerst bij *C. elegans* geïdentificeerd werd als een essentieel voor de ontwikkelingscoördinatie. Nu blijkt let-7 een waaier van functies te reguleren in andere soorten, zoals bvb neuromusculaire ontwikkeling, lidmaatontwikkeling en regulatie van stamceldifferentiatie en cellulaire proliferatie. Ook zijn er enkele lange niet-coderende RNAs (lncRNAs) geïdentificeerd met miRNA bindingsplaatsen. Er is een hypothese die stelt dat gelijkaardige coderende en niet-coderende RNAs met elkaar in competitie gaan voor miRNA binding, en zo elkaars regulatie beïnvloeden. (41)

6.8. MiRNA therapie als potentiële behandeling voor neuroblastoma

6.8.1 Neuroblastoma ontstaat door afwijkingen in de ontwikkeling van neuroblasten.

De pathofysiologie van neuroblastoma lijkt te liggen in verstoring ter hoogte van de ontwikkeling van foetale adrenerge sympatische neuroblasten (42). Dit volgt uit de bevinding dat vele van de ontregelde genen in ongedifferentieerde neuroblastomacellen ook kunnen geïdentificeerd worden in belangrijke pathways van de normale ontwikkeling en differentiatie van foetale neuroblasten, zoals bvb de LINB-28-let-7-MYC-as (43) en aanverwante genen van MYC (44). Het resultaat van het corrigeren van dergelijke afwijkingen in pathways die verantwoordelijk zijn voor de inductie van apoptose of differentiatie kan mogelijks een analoog effect geven als de spontane regressie die voorkomt in het 4S stadium van neuroblastoma, waarvoor het vertraagd optreden van neuronale celdoodmechanismen naar voren wordt geschoven als vertraging (17).

6.8.2. MicroRNA-34a, let-7 en de microRNA-17-92 cluster als mogelijke targets

In theorie zijn alle systematisch ontregelde miRNAs mogelijke targets. In de literatuur werden veel ontregelde miRNAs gevonden, waarvan sommige aantoonbaar een rol spelen in de oncogenese (zie tabel 1 en figuur 5 en 6 in bijlage). Van al deze weerhouden miRNAs springen er drie uit in de literatuur omdat ze verschillende oncogene pathways tegelijk beïnvloeden, omdat er verschillende targets gekend zijn die een rol spelen in de oncogenese en dat er bij het corrigeren een duidelijke anti-oncogene invloed aantoonbaar is in vivo. Deze zijn het tumor-suppressor miRNAs let-7 en miR-34a en de oncogene miR-17-92 cluster (45).

Anderzijds zijn ook nog enkele andere mogelijke therapeutische targets gevonden zoals miR-9, een oncomir waarvan de transcriptie gereguleerd wordt door MYCN. Laneve et al. hebben aangetoond dat het samen met miR-125a en 125b op een synergistische manier de proliferatie van neuroblastoma in de hand werkt via trkC (46).

Toediening van 13-cis retinoïnezuur geeft in bepaalde neuroblastoma cellijnen aanleiding tot differentiatie of in bepaalde gevallen zelfs tot apoptose. Dit verschijnsel wordt uitgebuit in de behandeling van vergevorderde neuroblastomatumoren, maar ook in de behandeling van andere types kanker (47). De wijzigingen verantwoordelijk voor deze differentiatie zijn zeer complex. Epigenetische regulatie van miRNAs lijkt hier een rol in te spelen. Das et al hebben aangetoond dat miR-152 een rol speelt in de DNA demethylatie die het gevolg is van te

retinoïnezuurtoediening (48). Ook de aan elkaar verwante miR-10a en miR-10b spelen hier een rol in (49). Anderzijds is miR-340 ook opwaarts gereguleerd na toediening van het gelijkaardige ATRA (14). Hiervoor is nog verder onderzoek vereist.

MicroRNA-34a. MiR-34a is een microRNA gelegen op de korte arm van chromosoom 1, ter hoogte van 1p36. Deze locus is aangetast in ongeveer 30% van de hoogstadium neuroblastoma tumoren (50). Activatie van p53 incudeert de transcriptie van de miR-34 familie door middel van directe binding (16). Er zijn verschillende targets gekend voor miR-34a met elk een ruime geschiedenis in het veld van de kankerbiologie. De belangrijkste zijn MYCN en BCL2, maar ook is er een bindingsplaats aangetoond op andere gekende oncogenen SIRT1, SFRP1, CAMTA1, NOTCH1, JAG1, CCND1, CDK6 en E2F3 (37). Welch et al. toonden aan dat miR-34a niet enkel een downregulatie vertoont in primaire neuroblastoma tumoren met een 1p36 deletie maar ook dat een herintroductie leidt tot gedaalde proliferatie en een downregulatie van E2F3, en dat bij ectopische overexpressie er apoptose door inductie van de caspase 3/7 pathway plaatsvindt (50). Hoewel neuroblastoma tumoren zelden rechtstreeks mutaties in het p53 systeem bevatten kan het verlies van 1p36 een belangrijke rol spelen in de pathogenese (45). Er moet ook rekening gehouden worden met het pro-apoptotische effect dat miR-34a therapeutica kunnen hebben op niet-maligne cellijnen, wat mogelijks risico inhoudt voor off-target effecten ter hoogte van gezonde weefsels. Er is dus nood aan gerichte toelevering (37).

MicroRNA-17-92.

MicroRNA-17-92 is een cluster van miRNAs waarvan sommige gekend zijn voor oncogene werking in andere tumoren. Het is een polycistronische cluster, een DNA-streng die in één keer wordt afgeschreven maar meerdere genen bevat. In neuroblastoma wordt de miR-17-92 expressie geactiveerd door directe binding van MYCN/c-MYC op de promotor, waardoor hij geassocieerd is met MYCN amplificatie (MNA). De miR-17-92 cluster is gelokaliseerd op chromosoom 13, en heeft paraloge sequenties onder de vorm van de miR-106b-25 cluster op chromosoom 7 en de miR-106a-363 cluster op het X-chromosoom. De miR-17-92 cluster is echter de meest geactiveerde cluster in kankers. Deze cluster bevat de volgende miRNAs: miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-20a en miR-92 (51). Voor miR-17-5p is er aangetoond dat het de proliferatiesnelheid verhoogt in neuroblastoma en andere tumoren, zowel in vitro als in vivo. Fontana et al. hebben door middel van antagomiRs aangetoond dat de tumor-suppressorgenen p21 en BIM, beiden targets zijn van miR-17-5. Ook voor miR-20a is een

gelijkaardige werking aangetoond, maar met een kleiner effect dan miR-17-5p. Het p21 gen is een tumor-suppressorgen wiens expressie in normale omstandigheden voornamelijk transcriptioneel gereguleerd is door p53. Het tumor-suppressorgen p53 is het meest frequent gemuteerde gen bij menselijke kankers, maar in MNA neuroblastoma cellijnen is echter geen duidelijk verband met p53 ontregeling of mutaties aantoonbaar. Er wordt verondersteld dat MYCN en miR-17-92 samen verantwoordelijk zijn voor het uitschakelen van deze pathway. Het tumor-suppressor gen BIM (BCL-2 Interacting Mediator of cell-death) is een van de meest krachtige pro-apoptotische genen (52). Voor miR-18a en miR-19a wordt door Loven et al bij uitschakelen een celcyclusarrest beschreven (53). Haug et al. hebben aangetoond dat miR-92 in neuroblastoma Dickkopf-3 (DKK3) reguleert. Dit is een tumor-suppressorgen inwerkt op de WNT pathway (54).

Peter Mestdagh et al hebben kunnen aantonen dat er zich multiple targets van deze cluster bevinden in de Transforming Growth Factor beta (TGF- β) signaaltransductiepathway. Deze pathway wordt ook geactiveerd bij toediening van retinoïnezuur. De multiple targets bevinden zich zowel upstream als downstream van TGF- β . Hierdoor wordt deze pathway door verschillende miRNAs van deze cluster op een convergente manier getarget (51).

Vermoedelijk speelt deze cluster daarnaast ook nog een rol in het afstellen van de MYC pathway omdat ook E2F1, een eiwit dat door MYC opgereguleerd wordt, een target is van miR-17-5p (45). Analooq is er voor in silico voorspelde targets van miR-18a en -19a een grote overlapping vertonen met targets uit het MYC netwerk. (53)

Dit alles wijst er opdat de cluster een duidelijk anti-apoptotisch effect heeft (45,47). MiR-17-92 speelt dus een belangrijke rol in het verwerven van verschillende ‘hallmarks of cancer’ waaronder celadhesie en proliferatie (51). Een tegenargument tegen de miR-17-92 cluster als therapeutisch doelwit is dat er verschillen in miRNA expressie voor de genen op dezelfde cluster geobserveerd is binnen gelijkaardige tumorlijnen (47).

MicroRNA-let-7

De let-7 miRNA familie is een cluster bestaande uit 12 gelijkaardige miRNAs verdeeld over 8 genomische locaties, en is vaak neerwaarts gereguleerd in kankers. De let-7 miRNAs functioneren als tumor suppressors door het silencen van gekende sleuteloncogenen zoals RAS, MYC en CDK6. Daarnaast is een gedaalde let-7 expressie geassocieerd met een slechte

prognose qua overleving in verschillende types kanker (43). LIN28B is een RNA bindend eiwit dat samen met NANOG, OCT4 en SOX2 verantwoordelijk is voor het behouden van een ongedifferentieerde cellulaire status. Recent is aangetoond dat LIN28B de maturatie van let-7 miRNAs verhindert tijdens de biogenese door het blokkeren van de let-7 verwerking. LIN28B recruteert een terminal uridylyl transferase (TUTase) proteïne, die een GGAG tetranucleotidemotief aan het pre-let7 breidt. Deze oligouridinstaat zorgt ervoor dat het Dicer geblokkeerd wordt, en het transcript door een voorlopig ongeïdentificeerd nuclease afgebroken wordt. Eenmaal de cel begint met differentiëren stijgt in de let-7 concentratie in normaal weefsel en wordt LIN28B neerwaarts gereguleerd omdat het een direct target is ervan. (16). Jan Molenaar et al toonden ook aan dat let-7 in hooggradige maligne neuroblastoma tumoren door mutaties in het LIN28B gen neerwaarts gereguleerd wordt, zowel voor MNA als voor niet-MNA tumoren. Ook wordt gesuggereerd dat MYCN de transcriptie van LIN28B in de hand werkt, en dat dit gecombineerd met de onderdrukking van let-7 voor een feed-forward loop zorgt (43). Door de link met RAS is reeds voor verschillende leden van de let-7 familie met behulp van miRNA therapeutica succesvol aangetoond dat ze in long- en prostaatkanker succesvol de tumorgroei inhiberen (4).

6.8.3 Disialoganglioside als mogelijk targettingmechanisme in therapeutica

Een veelbelovend targettingmechanisme voor een miRNA-therapie tegen neuroblastoma zijn antilichamen tegen disialoganglioside (GD2), een glycolipide (55). GD2 is aanwezig in meer dan 95% van alle gevallen van neuroblastoma (56). Tivnan et al. hebben met succes nanopartikels gekoppeld aan een anti-GD2 scFv fragment als targetmechanisme gebruikt. Een nadeel van dit targettingmechanisme is dat GD2 ook tot expressie wordt gebracht in andere perifere neurale weefsels, waardoor deze resulteren in substantiële pijn en andere schadelijke neveneffecten. Anti-GD2 antilichamen worden ook gebruikt in immunotherapie en geven een significante verbetering van de prognose zowel op zichzelf, maar vooral bij gelijktijdige toediening van *interleukine-2* en *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (56,57). Deze therapie heeft echter onaangename bijwerkingen. De voornaamste bijwerkingen van deze therapie zijn neuropathische pijn die zich hoofdzakelijk abdominaal bevindt, hypotensie, capillair lek syndroom en hypersensitiviteitsreacties (57). GD2 wordt ook tot expressie gebracht door andere tumoren van neuro-ectodermale oorsprong zoals melanoma, dat ook een hoge GD2 expressie heeft. Het GD2 antilichaam functioneert als een dockingmechanisme op het

corresponderende GD2 eiwit, wat aanleiding geeft tot receptorgemedieerde endocytose door middel van clathrine coated pits en vorming van endosomale compartimenten (37).

7. Discussie

De mogelijkheden van miRNA therapeutica zijn theoretisch zeer uitgebreid, volgend uit de ontregelingpatronen voor miRNAs die te voorschijn komen in verschillende ziektes. Het herintroduceren van verloren miRNA-functie in kankermodellen kan leiden tot reductie van tumorgrootte of zelfs volledige regressie, inhibitie van metastasering en/of toename van de gevoeligheid voor multimodale therapie. Door de pleiotrope werking van miRNA is het mogelijk om met 1 miRNA therapeuticum ook verschillende genen te reguleren, wat aangewezen is bij de behandeling van ziekten waarin verschillende pathways ontregeld zijn, wat vaak het geval is bij kanker.

Met het oogpunt op het ontwikkelen van een miRNA-gebaseerde therapie lijkt een convergerende aanpak van verschillende miRNAs die gelijkaardige pathways targetten een goede uitgangsmethode te zijn. Voor de selectie van een doelwit moet er een screening van de tumor gebeuren om ontregelde miRNAs of mRNAs op te sporen. In functie hiervan kunnen dan verschillende miRNA therapeutica of miRNA samen met siRNA gecombineerd worden in een nanopartikel-model of via korte LNA seed, naargelang de sequentie van de ontregelde miRNAs.

De voornaamste barrière om te overwinnen is de juiste molecule op de juiste plaats krijgen. Dit houdt in dat na toediening het miRNA de correcte cellen moet kunnen bereiken om zijn functie uit te oefenen. Hiervoor moeten verschillende barrières overwonnen worden, waaronder de degeneratie in de circulatie immuniteitsevasie en het binnendringen in de cel. Nanopartikels lijken hier het beste voor geschikt te zijn wegens de veelzijdigheid qua targetting, langdurige werkings en beperkte immuunrespons. De targettingmethode moet gekozen worden in functie van de aard van de ziekte, en in dit geval de tumor. Voor leveraandoeningen en -tumoren zijn LNAs, zoals reeds aangetoond met miravirsen, een goede mogelijkheid om verder therapieën op te ontwikkelen. De effectiviteit van naakte LNAs in de huidige klinische studies is voornamelijk te danken aan de accumulatie ter hoogte van deze organen. Er moet ook rekening mee gehouden worden dat er een hoge dosis zal nodig zijn om te compenseren voor deze accumulatie bij de toepassing van naakte LNAs aandoening ter hoogte van andere weefsels. Nanopartikels zijn veelbelovend en nuttig, zeker bij

aandoeningen gekenmerkt door een atypische vasculatuur, zoals neo-angiogenese bij kanker, omdat het endotheel één van de beperkende factoren vormt. Bij andere aandoeningen zijn virale vectoren ook interessant, zeker wanneer deze selectief getarget kunnen worden. Er kan dan gewerkt worden met celspecifieke promotorregios om de miRNAs tot expressie te brengen. Virale vectoren lijken minder geschikt als targettingmechanisme dan targetted nanopartikels door de grotere complexiteit, de mogelijkheid tot immuunrespons. Ze zijn echter wel nuttig voor het toeleveren van miRNA sponzen, omdat deze door hun grootte cellulaire transcriptie van het sponsgen vereisen. Gedurende lange tijd was het grote voordeel van virale vectoren dat ze heel specifiek bepaalde cellen selectief kunnen infecteren, maar dit kan tegenwoordig ook met targetted nanopartikels. Op deze manier kan quasi elke cel specifiek worden bereikt.

Door de specifieke targetting en de grote capaciteit maken targetted nanopartikels combinatietherapieën van verschillende miRNAs, siRNAs of zelfs andere stoffen mogelijk. Dit resulteert in hetzelfde effect bij een lagere dosis. Resistentievorming tegen miRNA-therapeutica blijft tot de mogelijkheden behoren, maar is door de pleiotrope werking van een tumor suppressor miRNA met targets in verschillende oncogene pathways theoretisch minder waarschijnlijk. Mogelijks kan combinatietherapie van verschillende miRNAs op analoge wijze als bij de huidige chemotherapieën bescherming bieden tegen dergelijke resistentie. Verder onderzoek zal dit moeten uitwijzen.

Nieuwe uitdagingen

De keuze van een miRNA om therapeutisch te gebruiken is niet vanzelfsprekend.

Neuroblastoma.

Door het pleiotrope effect van miRNAs lijkt het een goed idee om verschillende miRNAs samen te laten werken, en zo een synergistisch effect te bekomen op verschillende cruciale pathways. Dit kan gebruikt worden om de hoge mate van redundantie van de genetische en epigentische inactivatie tegen te gaan. Zowel miR-34a als de miR-17-92 cluster en let-7, lijken geschikt als kandidaat miRNAs om een therapie tegen te ontwikkelen, omdat ze samen verschillende cruciale mechanismen in de levensvatbaarheid van neuroblastoma reguleren en inwerken op verscheidene met MYCN geassocieerde pathways. Daarboven is er voor deze miRNAs in vivo een significant effect aangetoond bij het herstellen van hun niveaus. Bij het ontwerpen van een miRNA therapeuticum tegen let-7 voor neuroblastoma kan het eventueel

nuttig zijn om dit met een siRNA specifiek tegen LINB28 te combineren om de vicieuze cirkel te doorbreken.

Er moet echter ook rekening gehouden worden dat bij ectopische overexpressie van miR-34a en let-7, er een kans bestaat op off-target effecten in gezonde weefsels. Deze kunnen mogelijks verminderd of zelfs verhinderd worden door adequate targetting. Gehumaniseerde of scFv anti-GD2-antilichamen lijken hiervoor uitstekende kandidaten te zijn door hun hoge penetrantie bij neuroblastomas, desondanks ze ook op niet-tumoraal weefsel voorkom. Het effect van deze therapieën wordt gedacht analoog te zijn aan de spontane regressie die gezien kan worden bij stadium 4S tumoren.

Uit de literatuurstudie bleek ook dat diverse miRNAs mogelijks een rol spelen bij de inductie van differentiatie en apoptose, en bij de downregulatie van MYCN door ATRA. Deze kunnen mogelijks ook gebruikt worden complementair aan andere therapieën om de prognose te verbeteren. Ook hiervoor is verder onderzoek noodzakelijk.

Het selecteren van miRNAs om een therapie op te enten is niet vanzelfsprekend. Door de interspecies variatie kunnen off-target effecten moeilijk voorspeld worden op basis van muismodellen alleen. Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of de aangebrachte targets ook veilig zijn voor menselijk gebruik. Anderzijds lijkt de sleutelrol van voorgedragen miRNAs in de ontwikkeling en werking van neuroblastoma voldoende bevestigd te zijn in de literatuur. Voor miR-17-92 is er echter nog verder onderzoek nodig over de exacte formulering van de individuele antagomirs.

Conclusie

De ideale toeleveringsmethode voor een miRNA therapeuticum in neuroblastoma lijkt te bestaan uit targetted nanopartikels met gestabiliseerde miRNA modulatoren tegen één of meerdere miRNAs. Deze toedieningsmethode is reeds in vivo in muizen getest en veilig bevonden, maar deze bevinding heeft slechts een beperkte relevantie voor de veiligheid bij mensen. Om de vereiste dosis te verlagen kan de intracellulaire stabiliteit van de miRNA modulatoren worden verhoogd door chemische modificatie. Locked nucleid acids hebben reeds een effectiviteit en veiligheid kunnen aantonen in verschillende studies, en lijken de eerste keuze te zijn als stabiele miRNA modulatoren door hun vermogen om via kleine seedsequenties van ongeveer 8 basenparen al een significant effect te hebben. Hierdoor

kunnen er meerdere kopieën per nanopartikel aanwezig zijn, wat leidt tot een lagere dosis voor hetzelfde effect. In neuroblastoma lijken de ontregelde miR-34a, let-7 en de miR-17-92 cluster ideale kandidaten om een op miRNA gebaseerde therapie voor te ontwikkelen. Er is echter verder onderzoek nodig naar het effect van deze miRNAs in humane weefselmodellen.

8. Referenties

1. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;2008(2):102–14.
2. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Oct;9(10):775–89.
3. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* Elsevier B.V; 2011 Dec 1;717(1-2):1–8.
4. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CMP. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discovery Today.* Elsevier Ltd; 2012 Oct 17;:1–8.
5. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Therapy.* Nature Publishing Group; 2011 Apr 28;18(12):1104–10.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57–70.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* Elsevier Inc; 2011 Mar 4;144(5):646–74.
8. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way. *Cell.* 2009 Feb;136(4):586–91.
9. Rigoutsos I, Furnari F. Gene-expression forum: Decoy for microRNAs. *Nature.* 2010 Jun 24;465(7301):1016–7.
10. Ebert MS, Sharp PA. Emerging Roles for Natural MicroRNA Sponges. *Current Biology.* Elsevier Ltd; 2010 Oct 12;20(19):R858–61.
11. Garofalo M, Croce CM. microRNAs: Master Regulators as Potential Therapeutics in Cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2011 Feb 10;51(1):25–43.
12. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2005 Oct 27;353(17):1793–801.
13. Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013 Jan;93(1):98–104.
14. Das S, Bryan K, Buckley PG, Piskareva O, Bray IM, Foley N, et al. Modulation of neuroblastoma disease pathogenesis by an extensive network of epigenetically regulated microRNAs. *Oncogene.* 2012 Jul 16.
15. Davidoff AM. Neuroblastoma. *Seminars in Pediatric Surgery.* 2012 Feb;21(1):2–14.
16. Domingo-Fernández R, Watters K, Piskareva O, Stallings RL, Bray I. The role of genetic and epigenetic alterations in neuroblastoma disease pathogenesis. *Pediatr Surg Int.* 2012 Dec 29;29(2):101–19.
17. Pritchard J, Hickman JA. Why does stage 4s neuroblastoma regress spontaneously? *Lancet.* 1994 Sep 24;344(8926):869–70.
18. Verissimo CS, Molenaar JJ, Fitzsimons CP, Vreugdenhil E. Neuroblastoma therapy: what is in

- the pipeline? *Endocrine Related Cancer*. 2011 Oct 27;18(6):R213–31.
19. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008 Aug 24;455(7215):930–5.
 20. Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am. J. Hum. Genet.* 2004 Oct;75(4):727–30.
 21. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, et al. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):971–4.
 22. Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, et al. Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature*. Nature Publishing Group; 2012 Apr 12;469(7329):216–20.
 23. Miele E, Spinelli GP, Miele E, Di Fabrizio E, Ferretti E, Tomao S, et al. Nanoparticle-based delivery of small interfering RNA: challenges for cancer therapy. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3637–57.
 24. Bader AG, Brown D, Winkler M. The Promise of MicroRNA Replacement Therapy. *Cancer Research*. 2010 Sep 14;70(18):7027–30.
 25. Croce CM. miRNAs in the spotlight: Understanding cancer gene dependency. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group; 2011 Aug 1;17(8):935–6.
 26. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 2012 Feb 20;4(3):143–59.
 27. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *The Journal of Cell Biology*. 2012 Oct 29;199(3):407–12.
 28. Bader AG, Brown D, Stoudemire J, Lammers P. Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Therapy*. Nature Publishing Group; 2011 Jun 2;18(12):1121–6.
 29. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: Progress and possibilities. *RNA*. 2010 Oct 18;16(11):2043–50.
 30. Choi WY, Giraldez AJ, Schier AF. Target Protectors Reveal Dampening and Balancing of Nodal Agonist and Antagonist by miR-430. *Science*. 2007 Oct 12;318(5848):271–4.
 31. Iorio MV, Casalini P, Piovan C, Braccioli L, Tagliabue E. Breast cancer and microRNAs: therapeutic impact. *The Breast*. Elsevier Ltd; 2012 Jan 18;20:S63–S70.
 32. Stenvang J, Silahatoglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*. 2008 Apr;18(2):89–102.
 33. Veedu RN, Wengel J. Locked nucleic acids: promising nucleic acid analogs for therapeutic applications. *Chem. Biodivers*. 2010 Mar;7(3):536–42.
 34. Yeung ML, Jeang K-T. MicroRNAs and cancer therapeutics. *Pharm. Res*. 2011 Dec;28(12):3043–9.
 35. Liu YP, Ben Berkhout. miRNA cassettes in viral vectors: Problems and solutions. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V; 2011 Nov 12;1809(11-12):732–45.

36. Mowa M, Crowther C, Arbuthnot P. Therapeutic potential of adenoviral vectors for delivery of expressed RNAi activators. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010 Dec 26;7:1373–85.
37. Tivnan A, Orr WS, Gubala V, Nooney R, Williams DE, McDonagh C, et al. Inhibition of Neuroblastoma Tumor Growth by Targeted Delivery of MicroRNA-34a Using Anti-Disialoganglioside GD2 Coated Nanoparticles. Chesler L, editor. *PLoS ONE.* 2012 May 25;7(5):e38129.
38. Love KT, Mahon KP, Levins CG, Whitehead KA, Querbes W, Dorkin JR, et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010 Feb 2;107(5):1864–9.
39. Chen Y, Zhu X, Zhang X, Liu B, Huang L. Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Mol. Ther.* 2010 Sep;18(9):1650–6.
40. Yu B, Zhao X, Lee LJ, Lee RJ. Targeted Delivery Systems for Oligonucleotide Therapeutics. *AAPS J.* 2009 Mar 19;11(1):195–203.
41. Jackson AL, Levin AA. Developing microRNA therapeutics: approaching the unique complexities. *Nucleic Acid Ther.* 2012 Aug;22(4):213–25.
42. Terrile M, Bryan K, Vaughan L, Hallsworth A, Webber H, Chesler L, et al. miRNA expression profiling of the murine TH-MYCN neuroblastoma model reveals similarities with human tumors and identifies novel candidate miRNAs. *PLoS ONE.* 2011;6(12):e28356.
43. Molenaar JJ, Domingo-Fernández R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, et al. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat Genet. Nature Publishing Group;* 2012 Oct 7;44(11):1199–206.
44. De Preter K, Vandesompele J, Heimann P, Yigit N, Beckman S, Schramm A, et al. Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes. *Genome Biol.* 2006;7(9):R84.
45. Schulte JH, Horn S, Schlierf S, Schramm A, Heukamp LC, Christiansen H, et al. MicroRNAs in the pathogenesis of neuroblastoma. *Cancer Letters. Elsevier Ireland Ltd;* 2009 Feb 8;274(1):10–5.
46. Laneve P, Di Marcotullio L, Gioia U, Fiori ME, Ferretti E, Gulino A, et al. The interplay between microRNAs and the neurotrophin receptor tropomyosin-related kinase C controls proliferation of human neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 May 8;104(19):7957–62.
47. Stallings RL. MicroRNA involvement in the pathogenesis of neuroblastoma: potential for microRNA mediated therapeutics. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(4):456–62.
48. Das S, Foley N, Bryan K, Watters KM, Bray I, Murphy DM, et al. MicroRNA Mediates DNA Demethylation Events Triggered by Retinoic Acid during Neuroblastoma Cell Differentiation. *Cancer Research.* 2010 Oct 13;70(20):7874–81.
49. Foley NH, Bray I, Watters KM, Das S, Bryan K, Bernas T, et al. MicroRNAs 10a and 10b are potent inducers of neuroblastoma cell differentiation through targeting of nuclear receptor corepressor 2. *Cell Death and Differentiation. Nature Publishing Group;* 2011 Jan 7;18(7):1089–98.
50. Welch C, Chen Y, Stallings RL. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene.* 2007 Feb 12;26(34):5017–22.

51. Mestdagh P, Boström A-K, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, et al. The miR-17-92 MicroRNA Cluster Regulates Multiple Components of the TGF- β Pathway in Neuroblastoma. *Molecular Cell*. Elsevier Inc; 2010 Dec 10;40(5):762–73.
52. Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinnazzi S, Forloni M, et al. Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS ONE*. 2008;3(5):e2236.
53. Loven J, Zinin N, Wahlstrom T, Muller I, Brodin P, Fredlund E, et al. MYCN-regulated microRNAs repress estrogen receptor- (ESR1) expression and neuronal differentiation in human neuroblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Jan 26;107(4):1553–8.
54. Haug BH, Henriksen JR, Buechner J, Geerts D, Tomte E, Kogner P, et al. MYCN-regulated miRNA-92 inhibits secretion of the tumor suppressor DICKKOPF-3 (DKK3) in neuroblastoma. *Carcinogenesis*. 2011 Jul 1;32(7):1005–12.
55. Matthay KK, George RE, Yu AL. Promising Therapeutic Targets in Neuroblastoma. *Clinical Cancer Research*. 2012 May 14;18(10):2740–53.
56. Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *N. Engl. J. Med*. 2010 Jun 10;362(23):2202–11.
57. Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, et al. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med*. 2010 Sep 30;363(14):1324–34.
58. Wei JS, Song YK, Durinck S, Chen Q-R, Cheuk ATC, Tsang P, et al. The MYCN oncogene is a direct target of miR-34a. *Oncogene*. 2008 May 26;27(39):5204–13.
59. Hu H, Du L, Nagabayashi G, Seeger RC, Gatti RA. ATM is down-regulated by N-Myc-regulated microRNA-421. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Jan 26;107(4):1506–11.
60. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, et al. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group; 2010 Feb 21;12(3):247–56.
61. Foley NH, Bray IM, Tivnan A, Bryan K, Murphy DM, Buckley PG, et al. MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2. *Mol. Cancer*. 2010;9:83.
62. Bray I, Tivnan A, Bryan K, Foley NH, Watters KM, Tracey L, et al. MicroRNA-542-5p as a novel tumor suppressor in neuroblastoma. *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2011 Apr 1;303(1):56–64.
63. Tivnan A, Tracey L, Buckley PG, Alcock LC, Davidoff AM, Stallings RL. MicroRNA-34a is a potent tumor suppressor molecule in vivo in neuroblastoma. *BMC Cancer*. BioMed Central Ltd; 2011 Jan 25;11(1):33.
64. Cole KA, Attiyeh EF, Mosse YP, Laquaglia MJ, Diskin SJ, Brodeur GM, et al. A Functional Screen Identifies miR-34a as a Candidate Neuroblastoma Tumor Suppressor Gene. *Molecular Cancer Research*. 2008 May 1;6(5):735–42.
65. Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, et al. miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma. *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2010 Sep

26;16(10):1134–40.

66. Huang T-C, Chang H-Y, Chen C-Y, Wu P-Y, Lee H, Liao Y-F, et al. Silencing of miR-124 induces neuroblastoma SK-N-SH cell differentiation, cell cycle arrest and apoptosis through promoting AHR. *FEBS Letters*. Federation of European Biochemical Societies; 2011 Nov 16;585(22):3582–6.
67. Meseguer S, Mudduluru G, Escamilla JM, Allgayer H, Baretino D. MicroRNAs-10a and -10b Contribute to Retinoic Acid-induced Differentiation of Neuroblastoma Cells and Target the Alternative Splicing Regulatory Factor SFRS1 (SF2/ASF). *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Feb 4;286(6):4150–64.

9. Bijlagen

Tabel 1: Resultaten literatuurstudie miRNAs in neuroblastoma

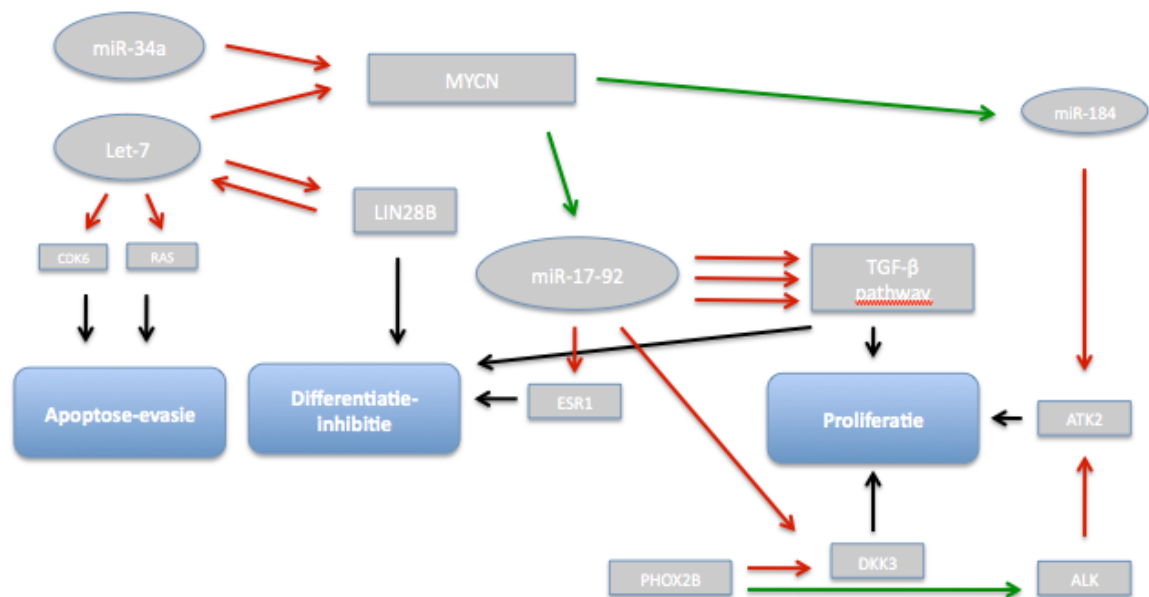
miRNA	mRNA Target	Effecten van miRNA dysregulatie
miR-34a (-)	MYCN	miR-17-92 transcriptie (58) door directe binding op de promotor (52) miR-421 transcriptie (59) miR-9 transcriptie (60) p21 downregulatie (52) miR-184 transcriptie via ongekend mechanisme (direct of indirect) (61) miR-542-5p inhibitie (62)
	MDM2	Angiogenese bevorderend (63) en p53 inactivatie (16)
	CCND1	Apoptose evasie en proliferatie (47)
	E2F3	Proliferatie (normaal pro-apoptotisch effect door inductie caspase 3/7 apoptotische patwhay)
	CDK6	Apoptose evasie en proliferatie (47)
	BCL2	Apoptose-evasie (64)
miR-17-92 (+)	CDKN1A, BCL2L11, pSMAD2 en SMAD4	Inhiberen van TGF- β pathway op verschillende niveaus, differentiatie en proliferatie (51)
miR-17-5p (+) miR-18a (+) miR-19a (+) miR-20 (+) miR-92 (+)	BIM	Anti-apoptotisch effect (52)
	p21	Celcycluscontrole (52)
	ESR1	Onderdrukken groei en differentiatie (53)
	ESR1	gelijkaardig als miR-18a (53)
	p21	Cfr miR-17-5p maar minder prominent (52)
	DKK3	Proliferatie (54)
miR-137 (-)	KDM1A	Herintroductie geeft caspase 9 cleavage en minder proliferatie (46)
miR-125a	trkC	Proliferatie (46)
miR-125b	trkC	Proliferatie (46)
	LINB28	MYCN toename (43)
miR-542-5p(-)	onbekende targets	primaire tumorgroei en metastasering (46)
	SOX11	Proliferatie (65)
mir-380-5p (-)	p53	HRAS oncogen activatie en tumorvorming (60)
miR-421 (-)	Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)	Beïnvloeden van celcycluscheckpoints en verlies van genomische integriteit (59)
miR-9 (+)	CHD1 (E-Cadherine)	Invasie en metasering (60)
	trkC	Proliferatie (46)
miR-124 (-)	ARH	Verhinderen van differentiatie (66)
miR-204 (-)	SOX11	Proliferatie (14)
miR-340 (-)	SOX2	Dedifferentiatie en apoptoseontwikking (14)
	onbekende targets	Dedifferentiatie en apoptoseontwikking (61)
miR-184 (-)	ATK2	Proliferatie (49)
miR-10a en b (-)	NCOR2	Dedifferentatie (67)

	SFRS1	Dedifferentiatie(43)
let-7 (-)	RAS, MYC en CDK-6	Proliferatie (43)
	LIN28	Differentiatie verhinderen (43)

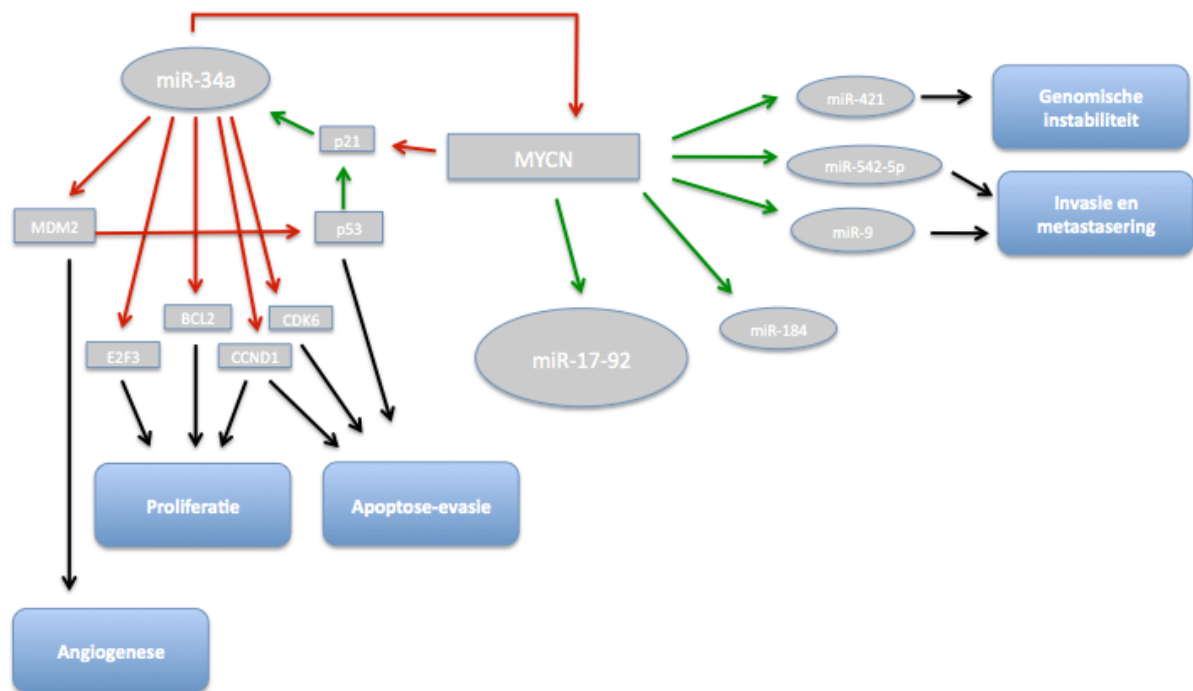
Legende bij tabel 1:

(-): Tumor suppressor miRNA

(+): OncomiR



Afbeelding 5: Illustratie van het miRNA regulatienetwerk van miR-17-92 en let-7. Groene pijlen staan voor het opwaarts reguleren, rode pijlen voor het neerwaarts reguleren. Zwarte pijlen hebben geen speciale betekenis.



Afbeelding 6: Illustratie van het miRNA regulatienetwerk van miR-34a. Groene pijlen staan voor het opwaarts reguleren, rode pijlen voor het neerwaarts reguleren. Zwarte pijlen hebben geen speciale betekenis.