# Nederlandse samenvatting

Dit proefschrift richt zich op chronische longziekte COPD, ook wel Chronisch Obstructief Longlijden genoemd. Deze ziekte wordt gekenmerkt door een chronische ontstekingsreactie in de longen die het gevolg is van het inademen van giftige deeltjes en gassen, waaronder sigarettenrook. COPD is een heterogene ziekte met verschillende verschijningsvormen en stadia van ernst van de ziekte. Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was om nieuwe en specifiekere kenmerken te ontdekken die deze verschillende verschijningsvormen en stadia van elkaar kunnen onderscheiden, zodat we in de toekomst nieuwe behandelingen kunnen ontwikkelen voor deze subgroepen van COPD-patiënten. We stelden de hypothese dat ernstig COPD en ernstig COPD dat begint op relatieve jonge leeftijd unieke subgroepen vertegenwoordigen binnen COPD met bijbehorende kenmerken. Om deze kenmerken te ontdekken hebben we gebruik gemaakt van een zogenaamde multi-omics benadering. Dit is een grootschalige screeningsmethode waarbij moleculaire kenmerken in verband worden gebracht met de specifieke COPD kenmerken. We hebben ons gericht op 3 moleculaire kenmerken te weten genexpressie, miRNA expressie en DNA methylatie, waarbij genexpressie en miRNA expressie iets zeggen over de hoeveelheid van een bepaald gen dat wordt afgeschreven van ons DNA, dus over de activiteit van bepaalde genen, terwijl de mate van DNA methylatie iets zegt over in hoeverre de genexpressie wordt gestimuleerd of geremd. Daarnaast kan de expressie van miRNAs ook iets zeggen over de mate waarin de expressie van genen vertaald kan worden naar eiwitten. Deze moleculaire kenmerken hebben wij onderzocht in verschillende compartimenten van het ademhalingssysteem, te weten de neus, de luchtwegen en het longweefsel. Daarnaast hebben we in het onderzoek ook gekeken naar de invloed van de rookstatus en het gebruik van inhalatiecorticosteroïden (ICS) van patiënten op de moleculaire kenmerken.

In **Hoofdstuk 2** onderzochten we het genexpressieprofiel in de luchtwegen van patiënten met ernstig COPD en vergeleken dat met gezonde controles en patiënten met mild tot matig COPD. We vonden een uniek genexpressieprofiel dat ernstig COPD onderscheidt van mild tot matig COPD en gezonde controles. Dit profiel weerspiegelde afwijkingen in luchtwegherstel, verminderde functie van fibroblasten, belangrijke structurele cellen in de long, en verminderde angiogenese, dat wil zeggen, vorming van nieuwe bloedvaten. Deze bevindingen ondersteunen de hypothese dat ernstig COPD zich onderscheid van mild-matig COPD en laat zien dat andere ziekteprocessen een rol spelen. Bovendien vonden we dat een groot deel van de genen die kenmerkend waren voor ernstig COPD in de luchtwegen ook terug te vinden waren in de neus, wat suggereert dat we de neus, als minder invasieve manier van monster afname, mogelijk als proxy kunnen gebruiken voor de long

In **Hoofdstuk 3** werd de focus verlegd naar perifeer longweefsel om te bepalen of ernstig COPD op jonge leeftijd, ook wel SEO-COPD genoemd, een verschillend genexpressieprofiel vertoont in vergelijking met controles zonder COPD, en patiënten met mild-matig COPD. We vonden een specifiek genexpressieprofiel dat verrijking liet zien van genen die betrokken zijn bij een B-cel-gemedieerde adaptieve immuunrespons, ontstekingsreacties, en extracellulaire matrix (ECM) organisatie, samen met een hogere expressie van het B-cel gen CD79A en het ECM-gen FBLN1 in SEO-COPD longweefsel. Daarnaast toonden we op eiwit niveau aan dat het aantal CD79A-positieve ontstekingsinfiltraten verhoogd was in SEO-COPD longweefsel. Ook vonden we een verband tussen de expressie van de SEO-COPD specifieke genen en genetische varianten in het DNA, wat mogelijk wijst op een rol voor genetische gevoeligheid voor het ontwikkelen van SEO-COPD.

**Hoofdstuk 4** onderzocht de expressie van miRNAs in perifeer longweefsel van SEO-COPD in vergelijking met controles zonder COPD en patiënten met mild-matig COPD. Hier identificeerden we een differentiële miRNA-profiel in SEO-COPD van drie miRNAs (miR-202-5p, miR-193b-3p en miR-331-3p). MiR-193b-3p is betrokken bij communicatie tussen cellen door middel van uitgescheiden blaasjes met moleculen, , miR-331-3p is mogelijk betrokken bij de regulatie van de ECM-veranderingen in SEO-COPD, die we in hoofdstuk 3 aantoonden, en miR-202-5p is mogelijk betrokken bij de veranderingen van eiwitstructuren .

In **Hoofdstuk 5** onderzochten we de expressie van miRNAs in de luchtwegen in relatie tot rookstatus in zowel COPD als gezonde controles. We vonden twee miRNA's, miR-203a-3p en miR-375, die meer tot expressie kwamen in de luchtwegen van huidige rokers dan bij ex- en nooit-rokers in COPD en gezonde controles. Deze miRNA's spelen een rol in de ontgifting en ontstekingsreactie op rook. Bovendien ontdekten we dat miR-31-3p alleen in COPD-patiënten hoger tot expressie kwam bij huidige rokers en niet in ‘gezonde’. MiR-31-3p zou een beschermende rol kunnen spelen in COPD-rokers via het verminderen van de PDE5A-expressie in de luchtwegen. Deze studie levert kandidaat miRNA's voor toekomstig onderzoek om te begrijpen hoe door roken veroorzaakte ontsteking de epigenetica beïnvloedt en hoe deze een rol kunnen spelen in de pathogenese van COPD.

In **Hoofdstuk 6** identificeerden we veranderingen in DNA methylatie die geassocieerd zijn met de aanwezigheid van COPD en de ernst van de ziekte. Met de aanwezigheid van COPD identificeerden we op zes plaatsen in het DNA-verandering in methylerings, waarvan vijf in genen die betrokken zijn bij gladde spiercontractie, corticosteroïd metabolisme en regeneratie, en cellulaire differentiatie. Daarnaast onderzochten we de de correlatie tussen de methylatie veranderingen in het DNA en de expressie van de genen die gelegen zijn in dat deel van het DNA. We identificeerden 819 methylatie-gen expressie correlaties voor FEV1 % pred en RV/TLC % pred, welke belangrijke longfunctie parameters zijn voor de ernst van COPD , die gerelateerd zijn aan genen die een rol spelen in het immuunsysteem en signaaltransductieroutes, allemaal belangrijke processen die betrokken zijn bij COPD. Deze bevindingen toonden aan dat DNA-methylatie veranderingen geassocieerd zijn met zowel de aanwezigheid als de ernst van COPD en mogelijk betrokken zijn bij de ontwikkeling van COPD.

In **Hoofdstuk 7** onderzochten we de invloed van langdurige behandeling met inhalatiecorticosteroïden (ICS) en het effect van staken van deze behandeling, op de veranderingen in DNA-methylatie in de luchtwegen van COPD-patiënten. In dit hoofdstuk vonden we dat ICS-behandeling geassocieerd was met veranderingen in DNA methylatie in het hele genoom, met effecten die aanhouden na het staken van de behandeling (93,6%). Het overgrote deel van de methylatie veranderingen bevond zich buiten de gebieden waar de ICS kunnen binden en zou mogelijk een rol kunnen spelen in de indirecte regulatie van ontstekingsremmende genen. We hebben ons vervolgens gericht op een klein deel (0,79%) van de gemethyleerde plaatsen in het DNA die zich bevinden in gebieden waar de ICS kunnen binden en daarmee een direct effect kunnen bewerkstellingen. Met behulp van functionele experimenten hebben we de correlatie tussen 1 van de gemethyleerdere plekken, namelijk cg23416081 en het betrokken genFKBP5, bevestigd in long cellen. Dit onderzoek toont aan dat DNA-methylatie verandert door behandeling met inhalatiecorticosteroïden en dat dit vervolgens de genexpressie beïnvloedt die geassocieerd is met de respons op corticosteroïden. Bovendien vonden we dat een groot deel van de veranderingen in DNA methylatie na ICS-behandeling blijvend zijn en dus mogelijk consequenties hebben voor de langere termijn.

Figuur 8.1 geeft een overzicht van de belangrijkste bevindingen van de onderzoeken die beschreven zijn in dit proefschrift.