

University of Groningen

siRNA in precision-cut lung slices: knocking down fibrosis?

Ruigrok, Mitchel

DOI:
[10.33612/diss.102801030](https://doi.org/10.33612/diss.102801030)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Ruigrok, M. (2019). *siRNA in precision-cut lung slices: knocking down fibrosis?*. Rijksuniversiteit Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.102801030>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



APPENDICES

Summary
Samenvatting
Dankwoord
Biography & List of Publications

SUMMARY

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive disease that is marked by uncontrolled deposition of extracellular matrix (ECM) proteins in the lungs, leading to breathlessness and, eventually, respiratory failure. Clinicians often prescribe drugs (e.g., nintedanib or pirfenidone) to slow the decline in lung function. As these drugs have a limited efficacy and do not cure the disease, there remains an unmet medical need for safer and more effective drugs. Developing such drugs, however, is notoriously difficult because the pathogenesis of IPF is not fully understood. To knockdown expression of fibrosis-related genes for therapeutic purposes or to investigate the pathogenesis of IPF, small interfering RNA (siRNA) could be used. siRNAs are double-stranded oligonucleotides that induce RNA interference, thereby leading to specific knockdown of messenger RNA (mRNA) and protein levels. The principal aim of this thesis was to evaluate whether siRNA can be used to treat pulmonary fibrosis.

We first determined – based on literature – whether pulmonary administration is suitable to achieve site-specific delivery of siRNA in the lungs (**chapter 2**). Local administration is preferred as it has clear advantages over systemic administration. More specifically, pulmonary administration of siRNA avoids rapid excretion via the kidneys and degradation by nucleases in the blood; these events occur immediately after intravenous administration. For that reason, we investigated published animal studies that reported pulmonary administration of siRNA. The majority of such publications reported positive outcomes, meaning knockdown was observed after pulmonary administration of siRNA. Still, several reoccurring challenges were identified and related to 1) the necessity, efficacy, and safety of delivery vectors, 2) the biodistribution of siRNA in tissues other than the lungs, 3) the poor correlation between *in vitro* and *in vivo* models, and 4) the long-term effects upon (repeated) administration of siRNA.

To address the poor translation from *in vitro* to *in vivo* models, we assessed if precision-cut tissue slices could be used as an experimental model to study the effects of siRNA (**chapter 3**). Precision-cut tissue slices are viable explants with well-defined dimensions that can be cultured *ex vivo* for up to a few days, while retaining functional and structural features. Because siRNA does not readily pass cell membranes, scientists often use lipid or polymer-based nanocarriers to achieve knockdown effects. Nanocarriers, however, have a limited diffusion into slices as they are too big. To deliver siRNA in lung and kidney slices, we used self-deliverable (Accell) siRNA, which is conjugated with a sterol moiety to enable

passive diffusion across cell membranes. In this chapter, we demonstrated Accell siRNA induced specific mRNA knockdown in lung and kidney slices, after an incubation of 48 h, without compromising the viability and morphology. Protein knockdown was unfortunately not observed.

With a focus on lung slices, we continued to further optimize our transfection method by also demonstrating protein knockdown (**chapter 4**). Because protein knockdown was not detected after 48 h, we hypothesized that the discrepancy between mRNA and protein knockdown was caused by differences in their respective half-lives. Longer incubation times might be necessary for protein levels to reflect changes in mRNA. We therefore cultured lung slices for up to 96 h with Accell siRNA that targeted either *Gapdh* mRNA or mRNA of fibrogenesis-related genes (i.e., *Ppib*, *Serpinh1*, or *Bcl2l1*). The results showed gene-targeting siRNAs did not only induce significant and specific mRNA knockdown but also protein knockdown. Although the transfections with Accell siRNA did not negatively affect the viability or morphology of lung slices, we did observe that slices displayed moderate signs of cell death inherent to the incubation. Optimizations regarding the viability of slices were therefore desired.

As oxygen can exert unintended electron transfer reactions with cellular constituents, we studied whether the viability of lung slices could be improved by lowering the incubator oxygen concentration from 80 to 20% O₂ (**chapter 5**). Our study revealed lung slices cultured at 20% O₂ displayed fewer signs of cell death, anti-oxidant transcription, and acute inflammation as well as more cell proliferation, demonstrating these slices were considerably more viable than those incubated at 80% O₂. These findings are important for several reasons. For example, because precision-cut tissue slices derive their value from the fact that it represents a mini-model of an organ, structural and functional features should be preserved for as long as possible. On top of that, the results suggested the permissible incubation time could be extended from 96 to 144 h. Therefore, these findings greatly expanded our knowledge on lung slices and their improved culturing conditions.

Finally, we examined the effect and mechanism of *Serpinh1*-targeting siRNA in lung slices that displayed a fibrogenic phenotype (**chapter 6**). *Serpinh1* was selected as a target because it encodes heat shock protein 47 (HSP47), which is a molecular chaperone that resides in the endoplasmic reticulum and it is essential for the maturation of collagen molecules. Several *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated

knockdown of HSP47 alleviated fibrosis. Accordingly, we cultured lung slices with *Serpinh1*-targeting siRNA for up to 144 h, after which multiple aspects of fibrogenesis were analyzed, such as mRNA expression of fibrogenesis-related genes, fibronectin secretion into culture medium, expression of alpha smooth muscle actin (α -SMA), and maturation of collagen. Though strong knockdown of HSP47 was achieved, collagen maturation was not diminished. We believe future studies are warranted to elucidate the role of HSP47 in fibrosis as previously reported effects observed *in vitro* may not be entirely representative of what actually happened *in vivo*. We hope this research will serve as a basis for those studies.

SAMENVATTING

Idiopathische longfibrose (IPF) is een progressieve ziekte die wordt gekenmerkt door een ongecontroleerde afzetting van extracellulaire matrix (ECM) eiwitten in de longen, wat leidt tot kortademigheid en longfalen. Artsen schrijven vaak medicijnen voor, zoals nintedanib of pirfenidone, om de achteruitgang in longfunctie te vertragen. Omdat deze medicijnen de ziekte niet genezen, blijft er een behoefte aan veiligere en effectievere geneesmiddelen. Het ontwikkelen van zulke medicijnen is echter moeilijk omdat de pathogenese van IPF niet volledig duidelijk is. Om expressie van fibrose-gerelateerde genen te verminderen voor therapeutische doeleinden of om de pathogenese van IPF te onderzoeken, kan small interfering RNA (siRNA) gebruikt worden. siRNA's zijn dubbelstrengs oligonucleotiden die RNA-interferentie induceren, wat leidt tot de afbraak van specifiek messenger RNA (mRNA) en daarmee tot een verlaagde productie van eiwit waarvoor het mRNA codeert. Het doel van dit proefschrift was om te onderzoeken of siRNA gebruikt kan worden om IPF te behandelen.

Eerst hebben we – op basis van gepubliceerde literatuur – onderzocht of pulmonale toediening geschikt is om lokale afgifte van siRNA in de longen te bewerkstelligen (**hoofdstuk 2**). Lokale toediening heeft de voorkeur omdat het snelle excretie van siRNA via de nieren en afbraak door nucleasen in het bloed vermijdt. Om die reden hebben we gepubliceerde dierstudies onderzocht die pulmonale toediening van siRNA rapporteerden. Het merendeel van de publicaties beschreven positieve resultaten, wat betekent dat knockdown werd waargenomen na pulmonale toediening van siRNA. Ook hebben we uitdagingen geïdentificeerd. Deze waren over het algemeen gerelateerd aan 1) de noodzaak, werkzaamheid en veiligheid van afleveringsvectoren, 2) de biodistributie van siRNA in andere weefsels dan de longen, 3) de slechte correlatie tussen *in vitro* en *in vivo* modellen, en 4) de langetermijneffecten na (herhaaldelijke) toediening van siRNA.

Om de slechte vertaling van *in vitro* naar *in vivo* modellen aan te pakken, hebben we onderzocht of precision-cut tissue slices gebruikt kunnen worden om de effecten van siRNA te bestuderen (**hoofdstuk 3**). Precision-cut tissue slices zijn levensvatbare weefselplakjes met consistente dimensies die enkele dagen *ex vivo* kunnen worden gekweekt, met behoud van functionele en structurele kenmerken. Omdat siRNA niet gemakkelijk wordt opgenomen door cellen, gebruiken wetenschappers vaak liposomen of andere nanodeeltjes om siRNA alsnog in een cel te krijgen. Nanodeeltjes hebben echter een beperkte diffusie in weefselplakjes door sterische hindering omdat ze te groot zijn. Daarom behandelden wij plakjes van long- en

nierweefsel met chemisch-gemodificeerd (Accell) siRNA, wat is geconjugeerd met een sterolgroep om passief transport door celmembranen mogelijk te maken. In dit hoofdstuk hebben we aangetoond dat Accell siRNA specifieke mRNA knockdown in long- en nierplakjes veroorzaakte na een incubatie van 48 uur. Bovendien hebben we aangetoond dat Accell siRNA geen invloed had op de vitaliteit en morfologie van de weefselplakjes. Eiwitknockdown werd helaas niet waargenomen.

Voor longplakjes hebben we deze transfectiemethode verder geoptimaliseerd zodat ook eiwitknockdown mogelijk werd (**hoofdstuk 4**). Aangezien eiwitknockdown niet werd gedetecteerd na 48 uur, verwachtten we dat de discrepantie tussen mRNA en eiwitknockdown werd veroorzaakt door het verschil in halfwaardetijd tussen mRNA en eiwit. We hebben daarom longplakjes 96 uur gekweekt met Accell siRNA dat gericht was op *Gapdh* mRNA of mRNA van fibrogenese-gerelateerde genen (namelijk *Ppib*, *Serpinh1* of *Bcl2l1*). De resultaten toonden aan dat gen-gerichte siRNA's niet alleen significante en specifieke mRNA knockdown induceerden, maar ook eiwitknockdown. Hoewel de behandeling met Accell siRNA geen invloed had op de vitaliteit of morfologie van longplakjes, zagen we wel tekenen van celdood als gevolg van de relatief lange incubatietijd. Vandaar dat het belangrijk was om de kweekcondities te optimaliseren zodat longplakjes voor een langere periode vitaal blijven.

Omdat een hoge concentratie zuurstof ongewenste oxidatie van cellulaire componenten kan veroorzaken, hebben we onderzocht of de levensvatbaarheid van longplakjes kon worden verbeterd door de zuurstofconcentratie van de incubator te verlagen van 80 naar 20% O₂ (**hoofdstuk 5**). Ons onderzoek toonde aan dat longplakjes die gekweekt waren in 20% O₂ minder tekenen vertoonden van celdood, antioxidant transcriptie en acute inflammatie terwijl meer celproliferatie werd waargenomen, wat aangeeft dat deze plakjes aanzienlijk vitaler waren dan plakjes die geïncubeerd werden in 80% O₂. Deze bevindingen zijn om diverse redenen belangrijk. Omdat weefselplakjes hun waarde ontleen aan het feit dat het een geminiaturiseerd model van een orgaan vertegenwoordigt, moeten structurele en functionele eigenschappen zo lang mogelijk worden geconserveerd. Daarnaast suggereerden de resultaten ook dat de incubatietijd kon worden verlengd van 96 naar 144 uur. Derhalve hebben deze bevindingen onze kennis over longplakjes aanzienlijk uitgebreid.

Tot slot hebben we het effect en het mechanisme van *Serpinh1*-gericht siRNA onderzocht in longplakjes die een fibrotisch fenotype vertoonden (**hoofdstuk 6**).

Serpinh1 werd als target gekozen omdat het codeert voor heat shock protein 47 (HSP47) – een moleculaire chaperonne die zich in het endoplasmatisch reticulum bevindt en essentieel is voor de productie van collageen. In de literatuur zijn er verschillende *in vitro* en *in vivo* studies gepubliceerd waarin werd aangetoond dat knockdown van HSP47 een therapeutisch effect had op fibrose. Daarom kweekten we longplakjes 144 uur met *Serpinh1*-gericht siRNA, waarna verschillende aspecten van fibrogenese werden geanalyseerd, zoals mRNA-expressie van fibrogenese-gerelateerde genen, fibronectine secretie, expressie van alpha smooth muscle actin (α -SMA) en productie van collageen. Ondanks sterke knockdown van HSP47 was de productie van collageen niet verminderd. Wij zijn daarom van mening dat er in de toekomst onderzoek zou moeten worden uitgevoerd om de rol van HSP47 bij fibrose verder op te helderen, aangezien eerder gerapporteerde effecten die *in vitro* zijn waargenomen mogelijk niet representatief zijn voor wat er feitelijk *in vivo* is gebeurd. We hopen dat ons onderzoek als basis voor zulke studies zal dienen.

DANKWOORD

In den beginne was er niet zo veel, behalve een idee en een enorme nieuwsgierigheid. Maar, na vier jaar slice-experimenten, data-analyses, bescheiden haarverlies, gepubliceerde manuscripten en geaccepteerde abstracts ligt er een proefschrift. Hoewel tijdens een promotietraject de focus voor een aanzienlijk deel op het product – het proefschrift – ligt, is de reis ernaartoe ook niet geheel onbelangrijk. Het is immers deze reis die ons vormt tot zelfstandige en kritische wetenschappers. Deze reis bewandelde ik niet alleen, en de totstandkoming van dit proefschrift is dan ook een product van gezamenlijke inspanningen. Daarom wil ik met dit dankwoord mijn dankbaarheid uitspreken naar een aantal mensen die een belangrijke bijdrage hebben geleverd aan de totstandkoming van dit proefschrift en/of die mijn tijd op de afdeling onvergetelijk hebben gemaakt.

Eerst wil ik mij wenden tot mijn eerste promotor: Prof. Dr. Erik Frijlink. Beste Erik, ik ben je zeer erkentelijk dat je mij de mogelijkheid hebt gegeven om, onder jouw supervisie, mijn promotieonderzoek uit te voeren bij de afdeling Farmaceutische Technologie en Biofarmacie (FTB). Bedankt voor het vertrouwen! Ik ben je veel dank verschuldigd voor jouw deskundigheid, betrokkenheid en hartelijkheid. Jouw steun en feedback hebben dit proefschrift zeker completer gemaakt. Dankzij jouw inspanningen kunnen mijn collega's en ik niet alleen fascinerend onderzoek doen, maar ook interessante congressen bezoeken en boeiende cursussen volgen. Ook ben ik je enorm dankbaar voor mijn postdoc-aanstelling bij de afdeling FTB. Zo kan ik mij als wetenschapper verder ontwikkelen en kan ik nog even genieten van al jouw verhalen over wetenschappelijke, zakelijke en maatschappelijke contexten.

Prof. Dr. Peter Olinga, mijn tweede promotor, heeft ook een essentiële rol gespeeld bij de totstandkoming van dit proefschrift. Beste Peter, jij hebt mij wegwijs gemaakt in de befaamde en wonderlijke wereld van fibrose-onderzoek en weefselplakjes. Heel veel dank voor het delen van jouw kennis, enthousiasme en ideeën! Jouw feedback op manuscripten, abstracts en posters was altijd erg waardevol. Heel erg bedankt ook voor je laagdrempeligheid; ik kan altijd bij je binnenlopen, of ik nu een afspraak heb gemaakt of niet. Ondanks dat jouw kantoor ietwat 'amorf' is, voel ik mij er altijd welkom. Ook ben ik je erg dankbaar voor het herkennen van mijn interesse in de commerciële aspecten van wetenschappelijk onderzoek. Dat waardeer ik ten zeerste. Dankzij onder andere jouw vertrouwen blijft het niet bij 'slechts' een interesse.

Graag wil ik ook Dr. Wouter Hinrichs, mijn copromotor, bedanken voor zijn inspanningen, deskundigheid en vriendelijkheid. Beste Wouter, hoewel mijn proefschrift toch iets minder farmaceutische technologie omschrijft dan wat we in eerste instantie voor ogen hadden, heb je een heel belangrijke rol gespeeld in mijn ontwikkeling als onderzoeker en daarvoor ben ik je zeer erkentelijk. Jouw deskundige, constructieve en snelle feedback op mijn stukken beschouwde ik altijd als erg leerzaam. Zeker gedurende werkbesprekingen was jouw wetenschappelijke, maar ook pragmatische, insteek heel waardevol. Waar Peter en ik soms neigden naar langdradigheid, wist jij de materie perfect samen te vatten. Bovendien ben je niet alleen een wetenschapper waar ik tegen opkijk, maar je bent ook een onderzoeker met een heel goed gevoel voor humor!

Tegenwoordig is het alom bekend dat samenwerkingsverbanden een positieve bijdrage kunnen leveren aan de kwaliteit van wetenschappelijk onderzoek. Dat heb ik tijdens mijn promotieonderzoek ook mogen ervaren. Daarom wil ik van deze gelegenheid gebruikmaken om Prof. Dr. Barbro Melgert te bedanken. Mijn onderzoek begon immers met het transfecteren van 3T3 cellen met siRNA om te onderzoeken wat de invloed is van osteoprotegerin op de ontwikkeling van fibrose – onderdeel van een onderzoekslijn die jij eerder hebt opgezet. Jouw kritische blik op mijn manuscripten was altijd van onschatbare waarde. Bovendien is jouw enthousiasme voor wetenschappelijk onderzoek heel aanstekelijk. Ik overdrijf niet als ik zeg dat je een voorbeeld bent voor veel (jonge) onderzoekers. Ik kijk er enorm naar uit om in de toekomst, gedurende mijn postdoc project, met jou te blijven samenwerken!

Ook wil ik mij wenden tot Prof. Dr. Wim Jiskoot, Prof. Dr. Joke Bouwstra en Prof. Dr. Liesbeth de Lange. Gedurende mijn studie biofarmaceutische wetenschappen aan de Universiteit Leiden ben ik tijdens verschillende onderzoeks- en literatuurprojecten door jullie begeleid; iets wat ik als bijzonder leerzaam en plezierig heb ervaren. Het is lastig om op papier uit te drukken hoe dankbaar ik jullie ben en hoezeer ik jullie waardeer. Een eenvoudig 'dankjewel' is bij lange na niet genoeg. Jullie zijn een enorme inspiratie voor mij en hebben een heel belangrijke rol gespeeld in mijn academische vorming. Ik hoop, op termijn, anderen te kunnen inspireren zoals jullie mij hebben geïnspireerd. Heel erg bedankt voor de mogelijkheden die jullie mij gegeven hebben om mijzelf te ontwikkelen.

Veel van mijn experimenten voerde ik uit in het 'Groothuis Slicelab'. Onder het genot van wat achtergrondmuziek en goed gezelschap (Carin Biel, Emilia Bigeava,

Miriam Boersema, Konstanze Gier, Emilia Gore, Yvette Jansen, Rick Mutsaers, Dorenda Oosterhuis, Gerian Prins, Kurnia Putri, Suriguga, Isabel Stribos en Louise van Wijk) waren de slices zo gemaakt. Heel erg bedankt voor jullie steun, hulp en gezelligheid! Graag wil ik ook Max Beugeling, Leonie Beljaars, Annemarie Broesder, Rick Heida, Renée van der Kooij, Imco Sibum, Yu Tian en Caroline Visser bedanken. Mede dankzij jullie heb ik het enorm naar mijn zin gehad tijdens mijn promotieonderzoek. Verder wil ik ieder ander bedanken die werkzaam is bij de afdeling FTB. Jullie maken de afdeling zoals die is: vol sfeer, kennis en kunde!

Naast mijn werk in de laboratoria van de afdeling FTB stond ik ook met enige regelmaat in de laboratoria van de afdeling Farmacokinetiek, Toxicologie en Targeting (FTT). Marina de Jager, Eduard Post en Catharina Reker-Smit hebben mij destijds geholpen om wegwijs te worden, zodat ik vlot aan de slag kon met het kweken van cellen en het uitvoeren van verscheidene analytische technieken. Vandaar dat ik jullie graag wil bedanken voor jullie tijd en moeite! Ik zou ook een speciaal woord van dank willen richten aan Adhyatmika, Roberta Bartucci, Fransien van Dijk en Anienke van Veen. Het was nuttig om met jullie te sparren over wetenschappelijke zaken. Ook hebben we hilarische momenten gedeeld, waar ik goede herinneringen aan heb overgehouden. Heel erg bedankt daarvoor!

Tijdens een promotieonderzoek leer je heel veel over allerlei aspecten van onderzoek doen. Denk aan het kritisch analyseren van literatuur, het opzetten van experimenten en het analyseren van resultaten. Een ander belangrijk en deugdelijk aspect betreft het begeleiden van studenten. Daarom wil ik van deze gelegenheid gebruikmaken om mijn dank uit te spreken voor het voortreffelijke werk van mijn studenten Nalinie Maggan, Delphine Willaert, Kaling Xian, Khaled El Amasi, Marina Roest en Jair Tan. Heel erg bedankt voor jullie tomeloze inzet! Met een onuitputtelijk enthousiasme hebben jullie een belangrijke bijdrage geleverd aan dit proefschrift. Het was mij een genoegen om jullie begeleider te zijn. Ik wens jullie veel succes en plezier toe met al jullie toekomstplannen.

Mijn ouders en broer wil ik ook bedanken. Mam, pap en Kevin, het is moeilijk om de woorden te vinden die recht doen aan mijn liefde, waardering en dankbaarheid voor jullie. Van kleins af aan stimuleerden jullie met bevologenheid de ontwikkeling van mijn interesses in de exacte wetenschappen, met in het bijzonder biologie en farmacie. Na mijn studie aan de Universiteit Leiden en een promotietraject aan de Rijksuniversiteit Groningen komt nu de kers op de taart: het bemachtigen van een doctoraatsdiploma. Hoewel mijn verhalen over mislukte experimenten misschien

niet altijd even coherent waren, wisten jullie mij altijd op te beuren, zodat ik weer met frisse moed verder kon. Vanuit een grenzeloze waardering voor wie jullie zijn en wat jullie doen, wil ik jullie intens bedanken... voor alles!

Ten slotte wil ik mijn partner Michel bedanken. Lieve Michel, ook jij hebt een wezenlijke bijdrage geleverd aan de totstandkoming van dit proefschrift. Jouw onvoorwaardelijke steun en liefde maakten de laatste loodjes een stuk minder zwaar! Hoewel werk en privé onmogelijk gescheiden te houden was gedurende een promotietraject, weet ik dat je altijd voor mij klaarstaat. Dit waardeer ik ten zeerste. Wat ik óók enorm waardeer, is dat je regelmatig met mij meeding naar het laboratorium, wanneer ik in het weekend samples moest nemen. Dan dronken we altijd even wat koffie, thee of warme chocolademelk. Lieve Michel, ik kan het niet vaak genoeg zeggen, ik ben je enorm dankbaar en ik kijk uit naar alle activiteiten die we in de toekomst gaan ondernemen!

BIOGRAPHY



Mitchel Ruigrok was born in Leiden (The Netherlands) on the 15th of May, 1992. From an early age, he demonstrated a keen interest in biology and chemistry. For that reason, it was not surprising that Mitchel decided to pursue a bachelor's degree in pharmaceutical sciences at the University of Leiden. To finalize his bachelor's degree program, he conducted a research internship of 10 weeks in the department of Drug Delivery Technology at the University of Leiden. Under supervision of Prof. Dr. J. Bouwstra, Prof. Dr. W. Jiskoot, and P. Schipper (M.Sc.), Mitchel investigated whether gold-coated surfaces could be chemically modified to bind proteins in a pH-sensitive manner. After receiving his bachelor's degree (2013), he pursued a master's degree in pharmaceutical sciences

at the University of Leiden. As a part of his master's degree program, Mitchel first performed a research internship of 9 months in the department of Drug Delivery Technology at the University of Leiden. Supervised by Prof. Dr. J. Bouwstra, Prof. Dr. W. Jiskoot, and P. Schipper (M.Sc.), he developed antigen- and adjuvant-coated microneedles for transdermal vaccination purposes. Mitchel subsequently conducted a research internship of 6 months at Coriolis Pharma in Martinsried (Germany). Under supervision of Prof. Dr. W. Jiskoot, Dr. A. Hawe, and D. Weinbuch (M.Sc.), he investigated whether nanoparticulate impurities found in pharmaceutical-grade sucrose could affect the stability of therapeutic proteins. After receiving his master's degree *cum laude* (2015), Mitchel started a PhD project in the department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy at the University of Groningen (The Netherlands). Supervised by Prof. Dr. Erik Frijlink, Prof. Dr. Peter Olinga, and Dr. Wouter Hinrichs, he studied whether RNA interference could be harnessed to treat pulmonary fibrosis. To that end, he used precision-cut lung slices to identify suitable targets which, upon knockdown, alleviate fibrosis.

LIST OF PUBLICATIONS

1. **Ruigrok, M.J.R.**, et al. The effects of oxygen concentration on cell death, anti-oxidant transcription, acute inflammation, and cell proliferation in precision-cut lung slices. *Sci. Rep.* (2019).
2. **Ruigrok, M.J.R.** et al. siRNA-mediated protein knockdown in precision-cut lung slices. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **133**, 339–348 (2018).
3. Weinbuch, D., **Ruigrok, M.J.R.**, Jiskoot, W. & Hawe, A. Nanoparticulate impurities isolated from pharmaceutical-grade sucrose are a potential threat to protein stability. *Pharm. Res.* (2017).
4. Schipper, P. et al. Diphtheria toxoid and N-trimethyl chitosan layer-by-layer coated pH-sensitive microneedles induce potent immune responses upon dermal vaccination in mice. *J. Control. Release* **262**, 28–36 (2017).
5. **Ruigrok, M.J.R.** et al. siRNA-mediated RNA interference in precision-cut tissue slices prepared from mouse lung and kidney. *AAPS J.* **19**, 1855–1863 (2017).
6. **Ruigrok, M.J.R.**, Frijlink, H.W. & Hinrichs, W.L.J. Pulmonary administration of small interfering RNA: The route to go? *J. Control. Release* **235**, 14–23 (2016).
7. **Ruigrok, M.J.R.** & de Lange, E.C.M. Emerging insights for translational pharmacokinetic and pharmacokinetic-pharmacodynamic studies: Towards prediction of nose-to-brain transport in humans. *AAPS J.* **17**, 493–505 (2015).