

De rol van microRNA's in de pathogenese van thoracale aorta-aneurysma's

Jelle BOSSUYT

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de Biochemie en de Biotechnologie
Major BIB
Academiejaar 2010-2011

Promotor: Prof. dr. Bart Loeys
Co-promotor: Prof. dr. Bruce Poppe
Wetenschappelijk begeleidster: Marjolijn Renard
Vakgroep Pediatrie en genetica
Labo Medische genetica

De rol van microRNA's in de pathogenese van thoracale aorta-aneurysma's

Jelle BOSSUYT

Masterproef voorgedragen tot het behalen van de graad van
Master in de Biochemie en de Biotechnologie
Major BIB
Academiejaar 2010-2011

Promotor: Prof. dr. Bart Loeys
Co-promotor: Prof. dr. Bruce Poppe
Wetenschappelijk begeleidster: Marjolijn Renard
Vakgroep Pediatrie en genetica
Labo Medische genetica

DANKWOORD

Deze thesis heeft mij de kans gegeven om kennis te maken met een wetenschappelijk onderzoek en vele unieke ervaringen op te doen. Dit manuscript is het resultaat van enkele maanden inzet en hard werk. Ik ben deze tocht echter niet alleen beleefd en daarom wil ik enkele mensen bedanken, zonder wie dit alles niet mogelijk was geweest. Eerst en vooral mijn begeleidster Marjolijn, die me warm wist te maken voor het onderwerp, me begeleidde door de vele technieken en raad gaf bij het schrijven. Daarnaast ook Pieter Mestdagh, die een grote hulp was bij het analyseren van de data. Ook dank aan mijn promotor Bart Loeys, eerst en vooral voor het opstellen van dit project, maar daarnaast ook voor het bijsturen en corrigeren waar nodig.

Ten slotte wil ik bij deze ook de mensen bedanken die dicht bij me staan en me op alle mogelijke manieren de voorbije maanden gesteund hebben. Ik denk hierbij aan mijn vriendin Liene, mijn ouders en mijn zussen, die zonder het te beseffen allemaal een enorme steun en drijfveer zijn geweest.

INHOUDSTAFEL

Dankwoord	i
Inhoudstafel	ii
Lijst met afkortingen	v
Samenvatting	vii
Summary	viii
Deel 1: Inleiding	1
1.1. Aneurysma	1
1.1.1. Definitie	1
1.1.2. Classificatie	1
1.2. Thoracale aorta	1
1.2.1. Anatomie	1
1.2.2. Functie	2
1.2.3. Aorta vaatwand	2
1.3. Extracellulaire matrix	3
1.3.1. Elastische vezels	3
1.3.2. Collageen vezels	5
1.3.3. Proteoglycanen	5
1.3.4. Gladde spiercellen	5
1.3.5. Fibroblasten	7
1.3.6. Proteasen	8
1.3.7. TGF- β	8
1.4. Thoracale aorta-aneurysma's	11
1.4.1. Etiologie	11
1.4.2. Pathogenese	13
1.5. MicroRNA	15
1.5.1. Inleiding	15
1.5.2. Baseparing principes	17
1.5.3. De rol van miRNA in TAA	17
Deel 2: Doelstelling	20
2.1. Inleiding	20
2.2. Experiment	20
Deel 3: Resultaten	22
3.1. Optimalisatie van methoden	22
3.1.1. Primer optimalisatie	22

3.1.2.	Transfectie optimalisatie	22
3.2.	qPCR optimalisatie	25
3.3.	Celcultuur en RNA isolatie.....	26
3.4.	miRNA kwaliteitscontrole	27
3.5.	miRNA profilering	27
3.5.1.	Globale miRNA expressie.....	27
3.5.2.	Specifieke miRNA expressie	28
3.5.3.	Doelwitgen predictie	35
3.5.4.	Doelwitgen expressie	35
3.6.	Geïntegreerde resultaten	37
Deel 4:	Discussie	40
4.1.	Expressie analyse.....	40
4.1.1.	Globale verschillen in miRNA expressie	40
4.1.1.	Specifieke verschillen in miRNA expressie.....	41
4.2.	Toekomstperspectieven	43
4.3.	Algemeen besluit	44
Deel 5:	Materiaal en methoden.....	45
5.1.	MiRNA profilering	45
5.1.1.	Stalen	45
5.1.2.	Celcultuur	45
5.1.3.	RNA isolatie, concentratiebepaling en kwaliteitscontrole	45
5.1.4.	MiRNA profilering.....	45
5.1.5.	Statistische analyse.....	46
5.1.6.	Doelwitgen predictie	46
5.2.	Transfectie van fibroblast cellen.....	46
5.2.1.	Vorbereiding transfectie	46
5.2.2.	Transfectie	47
5.2.3.	Analyse van transfectie efficiëntie	47
5.3.	RNA kwantificatie	47
5.3.1.	cDNA synthese.....	47
5.3.2.	cDNA expressie analyse.....	48
Deel 6:	Referenties	49
Deel 7:	Bijlagen	60
7.1.	Recepten	60
7.2.	Protocols	61

7.2.1.	Celcultuur	61
7.2.2.	miRNA isolatie.....	62
7.2.3.	Concentratie bepaling RNA	62
7.2.4.	Kwaliteitscontrole miRNA.....	62
7.2.5.	miRNA profilering	64
7.2.6.	Vorbereiding transfectie	67
7.2.7.	Transfectie	67
7.2.8.	RNA isolatie	68
7.2.9.	cDNA synthese.....	68
7.2.10.	Expressie analyse RNA	69
7.2.11.	Data verwerking	69
7.3.	Stalen	70
7.4.	Resultaten	71
7.4.1.	Testexperiment	71
7.4.2.	miRNA kwaliteitscontrole.....	72
7.4.3.	Primer optimalisatie	94
7.4.4.	miRNA profilering	99
7.4.5.	qPCR van potentiële targetgenen	110

LIJST MET AFKORTINGEN

Afkorting	Betekenis
AAA	Abdominaal aorta-aneurysma
Ago	Argonaute
ATP	Adenosinetriposfaat
A.U.	Arbitrary units
B2MP	Bone Morphogenic Protein
CNRQ	Calibrated Normalized Relative Quantity
CTGF	Connective tissue growth factor
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECM	Extracellulaire matrix
EMILIN	Elastin microfibril interface located protein
FDR	False discovery rate
FCS	Fetal Calf Serum
FTAAD	Familiale thoracale aorta-aneurysma en dissectie
LLC	Large Latent Complex
LDS	Loeys-Dietz syndroom
LTBP	Latency-associated TGF- β binding protein
MAGP	microfibril associated glycoprotein
MAP	Mitogen activated protein
MFS	Marfan syndroom
miRNA	MicroRNA
MLC	Myosin light-chain
MLCK	Myosin light-chain kinase
MMP	Matrix metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
NEAA	Non-essential amino acids
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RISC	RNA induced silencing complex
ROS	Reactive oxygen species
RQI	RNA quality indicator

SLC	Small latent complex
SMA-α	Smooth muscle α -actine
SM-MHC	Smooth muscle-myosin heavy chain
SMC	Gladde spiercel
SVM	Support vector machine
TAA	Thoracaal aorta-aneurysma
TAD	Thoracale aorta dissectie
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TGFBR1	TGF- β -receptor type I
TGFBR2	TGF- β -receptor type II
tPA	Tissue plasminogen activator
TSP-1	Thrombospondin-1
TIMP	Tissue inhibitors of metalloproteinases
UTR	Onvertaalde regio
VEGF	Vascular endothelial growth factor

SAMENVATTING

Een thoracaal aorta-aneurysma (TAA) is een vasculaire aandoening die gekenmerkt wordt door een agressief en mogelijk fataal karakter. TAA's ontstaan door degeneratie van de aorta vaatwand, wat vaak het gevolg is van ouderdom of slechte leefgewoontes. In 20 % van de gevallen echter, is er een genetische basis voor de aandoening, zoals bij onder andere het Loeys-Dietz syndroom (LDS) en het Marfan syndroom (MFS). Deze monogenetische aandoeningen zijn van grote waarde geweest bij het ontrafelen van de pathogenese van TAA's. Recent verschoof de focus hierbij van een louter structureel tot een meer regulatorisch oogpunt. Het belang van een verstoorde transforming growth factor- β (TGF- β) signalisatie kreeg hierbij groeiende aandacht. In het verlengde van deze evolutie traden de laatste jaren ook microRNA's (miRNA's) op de voorgrond. De recente observatie dat componenten van de TGF- β pathway, samen met heel wat structurele eiwitten, onder controle staan van miRNA's, vormt de basis voor dit project. Onze hypothese is dat een gewijzigde expressie van deze regulatorische moleculen, net zoals bij verschillende vormen van kanker of fibrose, bijdraagt tot de pathogenese van TAA's. Om deze hypothese te onderzoeken, werd een grootschalige miRNA profilering toegepast op fibroblasten van verschillende afkomst. Hierbij werden de cellen van tien MFS en vijf LDS patiënten in cultuur gebracht, samen met elf controle fibroblasten afkomstig van gezonde individuen. Na isolatie van miRNA, cDNA generatie en een pre-amplificatie stap, werd door middel van stem-loop gebaseerde qPCR de expressie van 754 humane miRNA's nagegaan. De vergelijking van de globale expressie tussen de verschillende groepen, bracht aan het licht dat er significant ($p < 0.05$) minder miRNA aanwezig was in de patiëntenstalen. Fibroblasten afkomstig van TAA patiënten bleken dus minder miRNA te expresseren, wat zou kunnen wijzen op een minder gedifferentieerde status van deze cellen. Al valt ook experimentele introductie van deze variatie niet uit te sluiten. Naast de globale verschillen konden na normalisatie ook specifieke wijzigingen in miRNA expressie gedetecteerd worden. Het gaat hierbij om in totaal 27 miRNA's, die in één of meerdere patiëntgroepen significant ($p < 0.05$) verschillend geëxprimeerd werden in vergelijking met de controles. De karakterisering van deze miRNA's onder de vorm van bio-informatische predictie, leverde een reeks potentiële doelwitgenen op. Na filtering van deze resultaten op basis van hoge predictiescore of een relevante functie van de doelwitgenen, bleven enkele interessante miRNA's over. Het gaat hierbij om twee miRNA's die downgereguleerd waren in de patiëntengroep (miR-29 en miR-889), en één miRNA dat relatief opgereguleerd was (miR-135a). MiR-29 werd voorspeld elastine en collageen mRNA te binden, terwijl miR-889 zou hybridiseren met de 3' UTR van SMAD-2 en SMAD-5. MiR-135a zou dan weer inwerken op angiopoietine-2 mRNA. Om deze predicties te valideren, werd de expressie van de voorspelde genen geanalyseerd door middel van qPCR. Hoewel hier opnieuw significante verschillen ($p < 0.05$) gedetecteerd werden tussen de verschillende groepen, konden deze resultaten geen enkele van de voorspelde miRNA-mRNA interacties bevestigen. Ondanks het gebrek aan validatie wijst deze studie toch op het belang van miRNA's en de rol die deze kleine moleculen mogelijk spelen in de pathogenese van MFS en LDS. Dit project kan daarom vooral als een eerste screening gezien worden, waarbij eerst 27 miRNA's en vervolgens 3 miRNA's uit de grote pool werden opgevist. MiR-29c, miR-889 en miR-135 kunnen zo als startpunt fungeren voor verder onderzoek, waarbij validatie en karakterisering centraal staan.

SUMMARY

A thoracic aortic aneurysm (TAA) is a vascular disorder that is characterized by an aggressive nature and possibly fatal progression towards rupture. TAAs are the consequence of a degeneration of the aortic wall, which is often caused by old age or bad lifestyle. Yet, in 20 % of the cases, there is a genetic ground for the disease, as in the Loeys-Dietz syndrome (LDS) and the Marfan syndrome (MFS). These monogenetic syndromes have played a key role in unravelling the pathogenesis of TAAs, which is evolving from a mere structural to a more regulatory point of view. Several groups emphasized the important role of the TGF- β pathway. In line with this evolution, more and more studies are addressing the role of microRNAs. The present project builds on the recent findings that components of the TGF- β pathway, together with a collection of structural proteins, are regulated by miRNAs. Our hypothesis is that an altered expression of these small regulatory molecules contributes to the pathogenesis of TAAs, as is the case in some types of cancer or fibrosis. To test this hypothesis, fibroblasts from different origin were subjected to a large scale miRNA profiling equipment. Cells obtained from ten MFS and five LDS patients were brought into culture, together with eleven control fibroblasts from healthy individuals. After isolation of the miRNA, cDNA synthesis, and a preamplification step, we examined the expression of 754 human miRNAs. A comparison of the global miRNA expression between the different groups, showed that the miRNA abundance was significantly ($p < 0.05$) decreased in patient samples. Fibroblasts from TAA patients appeared to have less miRNA expression, suggesting a less differentiated status. However, we cannot exclude any experimental introduction of this type of variation. In addition to these global differences, after normalization, also specific changes in miRNA expression were observed. A total of 27 miRNAs showed significant differences ($p < 0.05$) in expression in one or more patient groups compared to the controls. The characterization of these miRNA species by bioinformatic prediction algorithms yielded a list of target genes. After filtering these results based on prediction score or on a relevant function of the target genes, three miRNAs gained extra attention. Two of which were downregulated in the patient group (miR-29 and miR-889), whereas one was relatively upregulated (miR-135a). Bio-informatic analysis suggested that miR-29 was targetting collagen and elastin, that miR-889 hybridized with the SMAD-2 and SMAD-5 mRNA, and that miR-135 could knock-down the mRNA coding for angiotensin. To validate these findings, the expression of the predicted genes was investigated by qPCR. Although these experiments revealed some significant differences in gene expression, neither of these could support the predicted mRNA-miRNA interactions. Despite the lack of validation, this study could serve as a first screening, which identified 27 interesting miRNAs, of which three were very promising. miR-29c, miR-889 and miR-135a showed they have the potential to be important in the pathogenesis of TAAs. Therefore, it would be interesting to further characterize these miRNA species in the future and to validate their role in the pathogenesis of TAA.

Deel 1:INLEIDING

1.1.ANEURYSMA

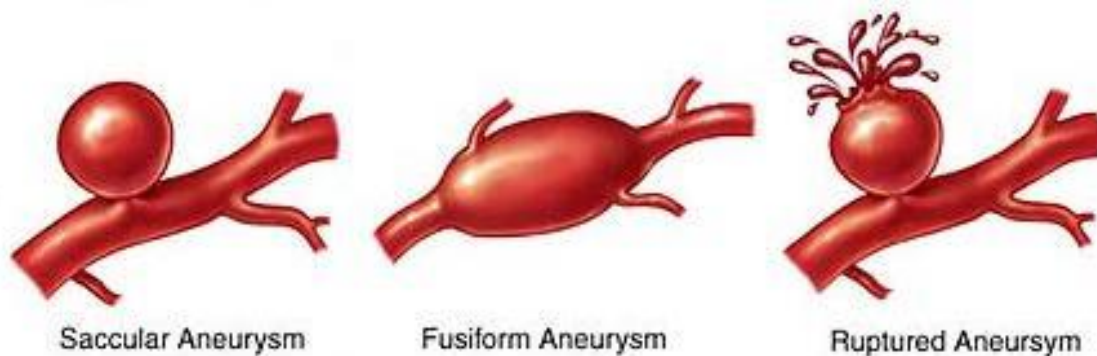
1.1.1.DEFINITIE

Een aneurysma is een vasculaire aandoening die gekenmerkt wordt door een lokale verwijding van een bloedvat. Op plaatsen met een verzwakte vaatwand kan een met bloed gevulde uitstulping ontstaan, die groter wordt na verloop van tijd. Wanneer de diameter van het aneurysma toeneemt, stijgt ook het risico op complicaties. Het bloedvat kan dissectereren of scheuren, wat leidt tot ernstige inwendige bloedingen, vaak met een fatale afloop. (Isselbacher, 2005)

1.1.2.CLASSIFICATIE

Aneurysma's kunnen op verschillende manieren geclassificeerd worden. Eén hiervan is op basis van hun morfologie. We onderscheiden hierbij sacculaire en fusiforme aneurysma's, waarbij de uitstulpingen respectievelijk asymmetrisch en symmetrisch zijn (Figuur 1). (Pappu *et al*, 2008)

Aneurysma's worden ook onderverdeeld volgens locatie. Deze kunnen in principe overal in het lichaam voorkomen, maar ontstaan voornamelijk in de hoofdslagader of aorta, "aorta-aneurysma". Afhankelijk van de positie boven of onder het diafragma, spreekt men over een thoracaal (TAA) of abdominaal (AAA) aorta-aneurysma. (Elefteriades, 2008) In dit project zullen enkel TAA's aan bod komen.

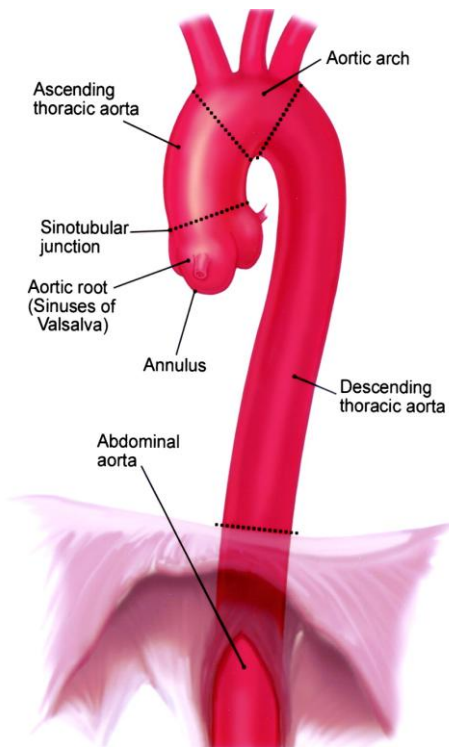


Figuur 1. Verschillende aneurysma morfologieën. Van links naar rechts: sacculair aneurysma, fusiform aneurysma, gescheurd sacculair aneurysma. (http://neuro.wehealny.org/endo/cond_aneurysms.asp)

1.2.THORACALE AORTA

1.2.1.ANATOMIE

De aorta is het grootste bloedvat van het lichaam, en loopt vanaf de linker ventrikel tot in het abdomen. In de thoracale aorta onderscheiden we, startend vanaf het hart: de aortawortel, de ascenderende aorta, de aortaboog en de descenderende aorta (Figuur 2).



Figuur 2. Anatomie van de thoracale aorta. De thoracale aorta en de verschillende zones zijn weergegeven, alsook de overgang in de abdominale aorta. (Isselbacher, 2005)

TAA's ontstaan het vaakst in de aortawortel en ascenderende aorta. (Isselbacher, 2005)

De diameter van de ascenderende thoracale aorta bedraagt in normale toestand gemiddeld \pm drie centimeter. Deze waarde neemt af naar gelang de afstand tot het hart, en wordt groter met de leeftijd. (Hager *et al*, 2002) Men spreekt van een TAA wanneer deze diameter twee standaard deviaties groter is dan het gemiddelde, in functie van leeftijd en lichaamsoppervlakte. (De Paepe *et al*, 1996) Concreet betekent dit een toename in diameter van ongeveer 150 %. (Elefteriades, 2002)

1.2.2.FUNCTIE

De primaire functie van de aorta is het transport van zuurstofrijk bloed van het hart naar perifere weefsels en organen. De aorta is echter meer dan gewoon een leiding waar bloed door stroomt. Dit bloedvat heeft namelijk ook een belangrijke hemodynamische functie. De vaatwand moet enerzijds weerstand bieden aan de hoge bloeddruk tijdens de systole, en daarnaast ook volgens het Windkessel effect¹ deze druk in stand houden tijdens de diastole, zodat een continue

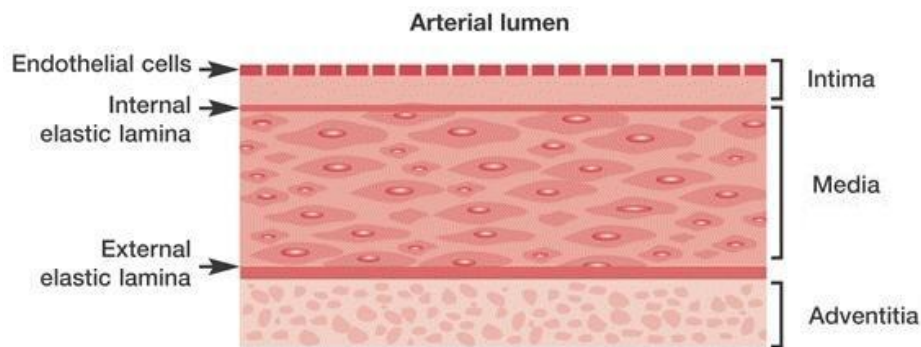
bloedsomloop wordt verzekerd. De aorta fungeert hierbij als een reservoir waarin het bloed tijdelijk opgeslagen wordt. (Dobrin, 1978) Voor deze functies zijn rigiditeit en vooral elasticiteit van cruciaal belang, eigenschappen die worden mogelijk gemaakt door de specifieke opbouw van de aorta vaatwand.

1.2.3.AORTA VAATWAND

De vaatwand van de aorta is onderverdeeld in drie lagen. Startend vanaf de luminale kant onderscheiden we: tunica intima, tunica media en tunica adventitia. Deze lagen zijn van elkaar gescheiden door interne en externe elastische lamina (Figuur 3). (Alberts, 2002)

De intima bestaat uit endotheliale cellen, rustend op een laag los subendotheliaal bindweefsel. Deze cellen voeren omwille van hun positie, rechtstreeks in contact met het bloed, belangrijke fysiologische functies uit. (Alberts, 2002) Het endothelium fungeert als een selectieve barrière tussen het lumen en het omliggend weefsel en controleert hier de uitwisseling van cellen en moleculen. Daarnaast speelt deze zone ook een rol in processen zoals inflammatie, angiogenese, controle van bloeddruk enz. (Behrendt & Ganz, 2002)

¹ Letterlijk "lucht kamer", doelt op het fenomeen waarbij de elastische aorta de schommelingen in bloeddruk indijkt. (Dobrin, 1978)



Figuur 3. Schematische voorstelling van de vaatwand ter hoogte van de aorta. Startend vanaf de luminale kant onderscheiden we de tunica intima, tunica media en tunica adventitia. (Niebauer, 2003)

De tunica media is voor elastische bloedvaten de belangrijkste en bijgevolg ook meest ontwikkelde zone. Hierin bevinden zich gladde spiercellen (SMC's) en structurele eiwitten, zoals collageen en elastine, die door deze cellen geproduceerd worden. (Alberts, 2002)

Ten slotte bestaat de tunica adventitia voornamelijk uit fibroblasten, die net als de SMC's structurele eiwitten produceren. Fibroblasten maken hier voornamelijk collageen aan. Daarnaast bevat de adventitia ook zenuwcellen en vaso vasora, die de media en adventitia van voedingsstoffen voorzien. (Alberts, 2002)

Hoewel deze basisstructuur dezelfde is voor alle slagaders, zijn naar gelang de functie kleine aanpassingen mogelijk. Omwille van zijn unieke hemodynamische rol, is de thoracale aorta bijvoorbeeld gekenmerkt door een sterk ontwikkelde media laag, die een uitgesproken elastisch karakter heeft. Om deze eigenschappen mogelijk te maken, is een geschikte samenstelling van de extracellulaire matrix nodig.

1.3.EXTRACELLULAIRE MATRIX

De extracellulaire matrix (ECM) is het driedimensionale netwerk van macromoleculen dat zich rondom de cellen bevindt. Als hoofdbestanddeel van het bindweefsel fungeert de ECM als een soort structureel raamwerk dat weefsels ondersteunt. Daarnaast voert deze matrix ook belangrijke fysiologische functies uit. Door interactie met integrines op het celoppervlak, of opslag van bepaalde groeifactoren, werkt de ECM mee aan de regulatie van bv. cel proliferatie, migratie, differentiatie enz. (Jarvelainen *et al*, 2009)

De ECM bestaat uit twee types macromoleculen. Enerzijds zijn er de lange, vezelachtige eiwitten zoals collageen, elastine, fibronectine en laminine. Deze laatste twee staan vooral in voor de aanhechting van de cellen aan de ECM, terwijl elastine en collageen voor elasticiteit en rigiditeit zorgen. Anderzijds komen in de ECM ook proteoglycanen voor, die een gelachtige grondsubstantie vormen. Beide componenten worden geproduceerd door de cellen gelegen in de ECM, de fibroblasten en SMC's. (Alberts, 2002)

1.3.1.ELASTISCHE VEZELS

Elastische vezels zijn langgerekte bundels van eiwitten, die het bindweefsel van soepelheid en veerkracht voorzien. Deze structuren zijn van groot belang voor elastische bloedvaten zoals

de aorta, waar ze vooral in de media teruggevonden worden. De elastische vezels organiseren zich hier rond SMC's met de vorming van concentrische elastische lamellen. (Silver *et al*, 1989) Deze structuren zijn in staat om opgelegde spanning, die inherent is aan een gesloten circulatorisch systeem, gelijkmatig over het oppervlak van de vaatwand te verdelen. Dit resulteert in de karakteristieke uitzetbaarheid en elasticiteit van de aorta. (Faury, 2001)

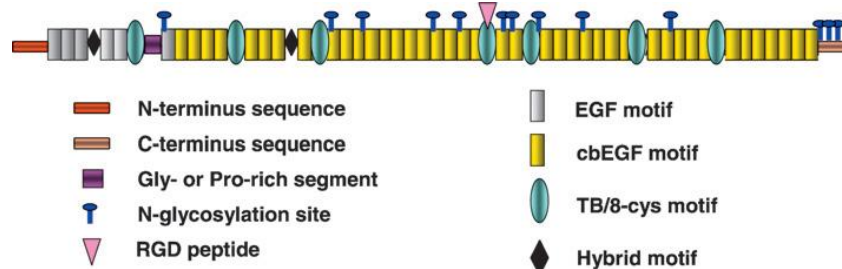
Elastische vezels bestaan grotendeels uit aggregaten van elastine, die gekoppeld worden aan microfibrillen.

- ELASTINE

Elastine wordt geproduceerd als een tropoelastine precursor. Dit 60-70 kDa eiwit bestaat uit hydrofobe residuen, afgewisseld met lysine bevattende crosslinking domeinen. (Gray *et al*, 1973). Interacties tussen de hydrofobe domeinen zijn essentieel voor de opbouw tot vezels en de elastische eigenschappen, terwijl de lysine residuen van belang zijn voor de crosslinking. (Bellingham *et al*, 2001)

- MICROFIBRILLEN

Microfibrillen zijn dunne 10 – 15 nm filamenten, die grotendeels zijn opgebouwd uit fibrilline glycoproteïnen. (Sakai *et al*, 1986) Er zijn drie soorten fibrillines geïdentificeerd (fibrilline-1, -2, en -3), die allen weinig verschillen in structuur (Figuur 4). Dankzij de vele interactiedomeinen, kunnen fibrillines niet alleen onderdelen van de ECM binden, maar ook groeifactoren zoals TGF- β sequestreren. (Chaudhry *et al*, 2007)



Figuur 4. De basis structuur van fibrilline glycoproteïnes. Dit schema toont de belangrijkste structurele kenmerken van de fibrilline familie. De mogelijke N-glycosylatiesites zijn gebaseerd op deze aanwezig in fibrilline-1. (Ramirez *et al*, 2007)

Naast fibrillines, maken in mindere mate ook *microfibril associated glycoproteins* (MAGP's), fibulines en *elastin microfibril interface located proteins* (EMILIN's) deel uit van de microfibrillen. Deze helpen mee bij de opbouw van de elastische vezel. (Gibson *et al*, 1986; Timpl *et al*, 2003; Colombatti *et al*, 2000)

- BIOSYNTHESE

In de assemblage van elastine tot elastische vezels, is een belangrijke rol weggelegd voor de leden van de lysyl oxidase (LOX) familie. Deze enzymen katalyseren de associatie van elastine units tot microaggregaten. Ze doen dit door middel van oxidatieve deaminatie van de lysine residuen van elastine, wat gevolgd wordt door spontane crosslinking. (Partridge *et al*, 1963). Door depositie van nieuw gesecreteerd elastine op bestaande aggregaten, ontstaan zo groeiende structuren op het celoppervlak. De producerende cel oefent hierbij een actieve rol uit, met de organisatie en alignering van elastine units. (Czirok *et al*, 2006) De gevormde

elastine microaggregaten worden vervolgens naar microfibrillen getransfereerd, waarmee ze fusioneren. Fibuline en MAGP eiwitten bevorderen het verloop van deze stappen. (El-Hallous *et al*, 2007) Uiteindelijk leidt de vorming van enkele finale crosslinks tot het ontstaan van een complete elastische vezel, waarbij een kern van elastine eiwitten omringd wordt door een mantel van microfibrillen. (Kielty *et al*, 2002)

1.3.2. COLLAGEEN VEZELS

Collageen vezels zijn langgerekte polymere strengen, die de meest abundante component van het bindweefsel vormen. (Di Lullo, 2001) In elastische weefsels, zoals de aorta vaatwand, worden deze structuren teruggevonden in de adventitia en in mindere mate ook in de media. Collageen vezels zorgen voor rigiditeit en trekvastheid, wat hen belangrijk maakt voor de integriteit van het weefsel. (Kadler *et al*, 2007)

- COLLAGEEN

De basis eenheid van de collageen vezel is het collageen eiwit. Deze macromolecule bestaat uit drie polypeptiden, de α -ketens, die met elkaar verweven zijn tot een superhelix. (Berisio *et al*, 2002) Naar gelang het soort α -keten, komen verschillende types collageen voor in het menselijk lichaam. Zo wordt in de adventitia vooral collageen I en III teruggevonden. (Murata *et al*, 1986)

- BIOSYNTHESE

Synthese van collageen vezels wordt gekarakteriseerd door een groot aantal processingsstappen. Intracellulair leiden post-translationele modificaties tot associates en de vorming van de driedubbele helix, het "procollageen". Na secretie worden de N- en C-terminale propeptiden van het procollageen afgekliefd, wat het mature collageen oplevert. Collageen units associëren vervolgens tot fibrillen, die op hun beurt covalent gekoppeld worden tot stabiele collageen vezels. Deze laatste crosslinking stappen worden net als bij elastine gekatalyseerd door enzymen van de LOX familie, opnieuw via deaminatie van lysine residuen. (Siegel, 1974)

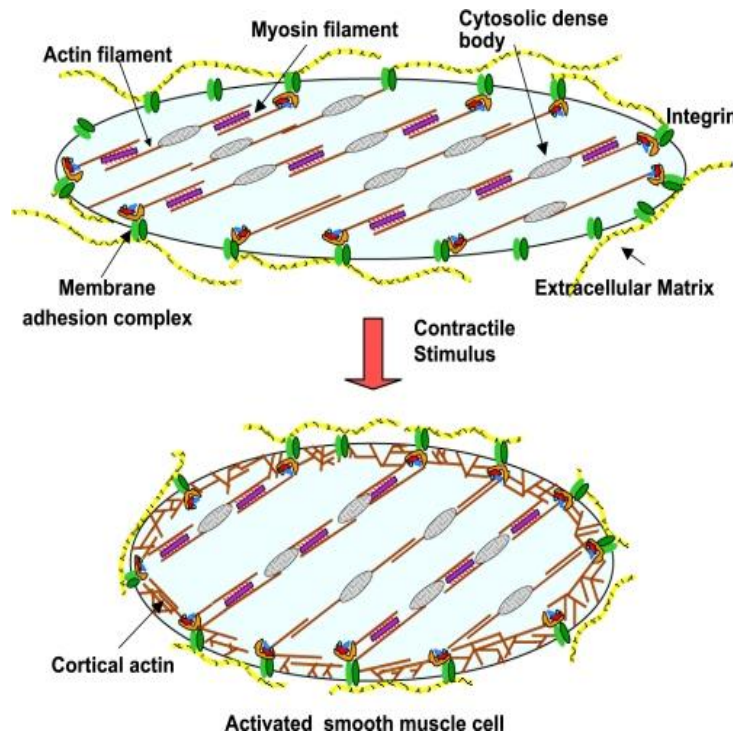
1.3.3. PROTEOGLYCANEN

Proteoglycanen zijn sterk geglycosylerde glycoproteïnen, die de amorfe grondsubstantie vormen. Ze bestaan uit een "kern eiwit", waarop vele glycosaminoglycanen (GAG's) zijn aangehecht. (Iozzo & Murdoch, 1996) GAG's zijn lange suikerketens die door hun vele sulfaat- en carboxylgroepen de proteoglycanen een negatieve lading geven. In de vaatwand is er een aanrijking van GAG's heparan sulfaat, chondroitine sulfaat en dermatan sulfaat. (Radhakrishnamurthy *et al*, 1990) Dankzij hun negatieve lading absorberen proteoglycanen grote hoeveelheden kationen en water, wat hen een sponsachtig karakter oplevert. Deze structuren dragen zo bij tot de hydratatie van het weefsel. (Lewin, 2007)

1.3.4. GLADDE SPIERCELLEN

De gladde spiercellen of *smooth muscle cells* (SMC's) bevinden zich tussen de elastische vezels in de media. Deze cellen zijn tijdens de ontwikkeling verantwoordelijk voor de productie van elastische vezels en andere componenten van de ECM. (Narayanan, 1976) In de adulte fase, wanneer de synthese van elastine verwaarloosbaar wordt, zijn SMC's meer

gedifferentieerd en voeren ze hun contractiele functie uit. Deze cellen worden gekenmerkt door de aanwezigheid van cytoplasmatische “myofilamenten”, die uit actine en myosine bestaan. (Cooke & Fay, 1972) Wanneer een SMC een contractiele stimulus ontvangt, stijgt de calciumconcentratie binnen de cel, wat tot de vorming van calcium-calmoduline complexen leidt, die op hun beurt het *myosin light-chain kinase* (MLCK) activeren. Dit regulatorische enzyme fosforyleert de *myosin light chain* (MLC), wat cyclische interacties tussen myosine en actine myofilamenten mogelijk maakt. (Webb, 2003) Hierbij “kruipt” het myosine als het ware over het actine, waardoor de volledige cel samentrekt (Figuur 5) Myosine verbruikt bij dit proces energie onder de vorm van ATP. (Huxley & Niedergerke, 1954)

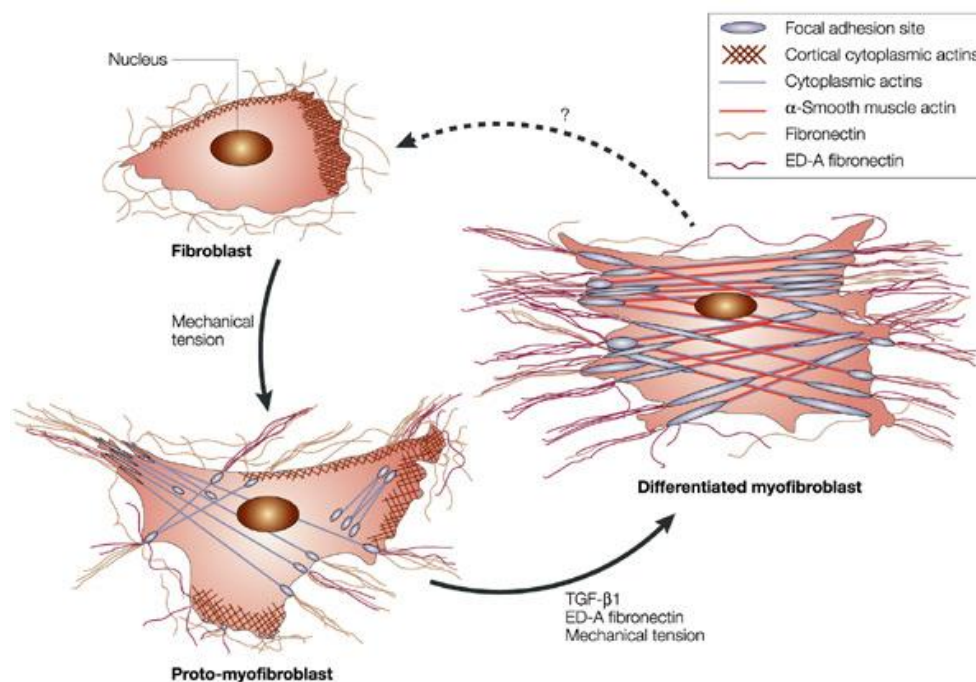


Figuur 5. Schematische voorstelling van het contractiel mechanisme van SMC's. Bovenaan: een SMC in rust. Onderaan: na een contractiele stimulus interageren myosine en actine filamenten, waarbij de volledige cel samentrekt. (Gunst & Zhang, 2008)

Ondanks deze gedifferentieerde status, behouden SMC's het vermogen om opnieuw een meer synthetiserend fenotype aan te nemen. Deze overgang, die fenotypische modulatie wordt genoemd, is onder andere nodig bij herstelprocessen, wat synthese van nieuwe ECM eiwitten vereist. (Rensen *et al*, 2007) SMC's kunnen hierbij de ECM remodelleren via de aanmaak of afbraak van structurele componenten. Gezien het complexe spatiotemporale karakter van o.a. de elastine vezel biosynthese, is dit proces echter inefficiënt in de adulte fase. Dit kan leiden tot de productie van misvormde of minder goed functionerende structuren. (Shifren & Mecham, 2006)

1.3.5.FIBROBLASTEN

In de adventitia is een ander celtype verantwoordelijk voor productie van de ECM, met name fibroblasten. Deze cellen produceren o.a. collageen, elastine en componenten van de grondsubstantie. Fibroblasten zijn vooral actief tijdens de ontwikkeling. In de adulte fase nemen deze cellen een rustiger fenotype aan. Net als SMC's kunnen fibroblasten echter een fenotypische transitie ondergaan, waarbij ze opnieuw geactiveerd worden. O.a. bij herstelprocessen ondergaan deze cellen een transdifferentiatie, met de omvorming tot "proto-myofibroblast", waaruit na verdere stimulatie een "myofibroblast" ontstaat (Figuur 6). (Masur *et al*, 1996) Deze "spiercelachtige" fibroblasten worden gekenmerkt door de expressie van typische SMC eiwitten, zoals *smooth muscle α -actine* (α -SMA) en *smooth muscle-myosin heavy chain* (SM-MHC), die hen toelaten om contracties uit te voeren. Daarnaast zijn deze cellen ook secretorisch veel actiever en voorzien van sterk ontwikkelde focale adhesie sites. (Hinz *et al*, 2007) Dankzij hun nieuwe verworven eigenschappen kunnen myofibroblasten migreren naar een plaats met weefselschade en aan de hand van contracties en depositie van ECM materiaal de wonde herstellen. Wanneer dit proces voltooid is, nemen de cellen opnieuw het passievere fenotype aan, of ondergaan ze apoptose. Dit proces kan echter ontsporen, waarbij door constitutieve activering van myofibroblasten grote hoeveelheden ECM eiwitten worden afgezet. Het gevolg is een pathogene modellering, zoals bij fibrose. (Di Wang *et al*, 2010; Stenmark, 2006)



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Figuur 6. De verschillende fenotypes van de fibroblast. Een fibroblast in rust kan door mechanische stress differentiëren tot een proto-myofibroblast. Dit celtype kan op zijn beurt omgevormd worden tot een myofibroblast, door inwerking van o.a TGF- β , ED-A fibronectine of mechanische stress. Myofibroblasten kunnen uiteindelijk apoptose ondergaan of opnieuw het normale, passieve fenotype aannemen. (Tomasek *et al*, 2002)

1.3.6. PROTEASEN

N naast de aanmaak van structurele eiwitten, kunnen zowel fibroblasten als SMC's de extracellulaire omgeving ook op een alternatieve manier beïnvloeden. Dit doen ze door de productie van matrix metalloproteinases (MMP's) en hun tegenhangers, de endogene *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP's). MMP's zijn een familie van zink-afhankelijke endopeptidases, die in staat zijn alle structurele eiwitten van de aorta ECM te degraderen. (Birkedal-Hansen *et al*, 1993) We onderscheiden hier collagenases, gelatinases, elastases enz. Afbraak van de ECM is vaak nodig bij herstelprocessen, of om cellulaire migratie mogelijk te maken. (Hiraoka *et al*, 1998) Daarnaast kunnen MMP's ook groeifactoren zoals TNF- α processeren en op die manier activeren. (Dubois *et al*, 1995) Om de integriteit van de ECM te bewaren, moeten deze MMP's sterk gecontroleerd worden. Naast de klassieke transcriptionele en post-transcriptionele mechanismen, zijn vooral de TIMP's hierbij belangrijk. Deze enzymen verzekeren door middel van inhibitie van MMP's dat het evenwicht in de ECM onder normale omstandigheden behouden blijft. (Nagase *et al*, 2006)

Naast de MMP's blijkt ook plasmine, een serine protease van de fibrinolytische pathway, een proteolytische functie te hebben in de vaatwand. Plasmine ontstaat na verknipping van plasminogeen, wat gekatalyseerd wordt door o.a. *tissue plasminogen activator* (tPA) of *urokinase plasminogen activator* (uPA). Dit enzyme is in staat fibronectine te degraderen (Meilhac *et al*, 2003) en daarnaast ook TGF- β mobilisatie en MMP activering te induceren. (Taipale *et al*, 1994; Borges *et al*, 2010)

1.3.7. TGF- β

Ondanks de belangrijke rol van de proteasen voor de integriteit van de ECM, moet de hoofdregulator van de vasculaire architectuur elders gezocht worden. Deze taak wordt toegeschreven aan een molecule die upstream van deze enzymen werkt en op elk celtype van de vaatwand een invloed heeft: *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β).

- ALGEMEEN

TGF- β is een cytokine dat lid is van de TGF- β superfamilie. Deze verzameling eiwitten bevat o.a. *Bone Morphogenic Proteins* (BMP's), activines en inhibines, die een overvloed aan functies uitoefenen. TGF- β zelf komt voor in drie isovormen, die allen weinig verschillen in structuur: TGF- β 1, TGF- β 2 en TGF- β 3. Deze drie peptiden bestaan uit respectievelijk 390, 412 en 412 aminozuren. (Heldin *et al*, 1997)

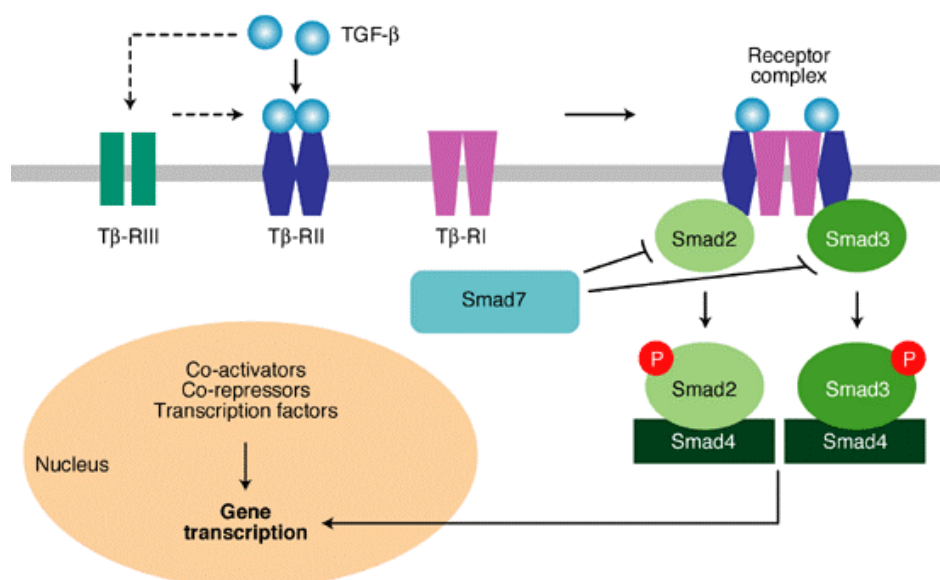
- BIOSYNTHESE

TGF- β wordt gevormd als een biologisch inactief pre-pro-polypeptide. Deze precursor bevat naast een signaalsequentie ook een *latency-associated peptide* (LAP). Na verschillende processingstappen, waarbij deze pre- en pro-domeinen verwijderd worden, ontstaat hieruit het mature TGF- β peptide dat homodimerisatie ondergaat. Dit homodimeer wordt vervolgens via een niet-covalente interactie opnieuw gekoppeld aan een dimeer van LAP's, wat aanleiding geeft tot de vorming van het *small latent complex* (SLC). Deze associatie verhindert de binding van TGF- β met zijn receptor. Het SLC blijft in de cel, tot het gebonden wordt door het *latency-associated TGF- β binding protein* (LTBP). Deze interactie is mogelijk door de vorming van een disulfidebrug tussen cysteine residuen van het LTBP en het LAP. (Kanzaki *et al*, 1990) Het *large latent complex* (LLC) dat zo ontstaat, wordt vervolgens gesecreteerd in

de extracellulaire ruimte. Hier wordt dit complex echter onmiddellijk naar de ECM gezonden, waar het via koppeling aan microfibrillen inactief gehouden wordt. (Khalil, 1999) Deze interactie is mogelijk door de binding van drie C-terminale domeinen van LTBP-1 aan vier N-terminale domeinen (EGF2, EGF3, first hybrid and cbEGF1) van fibrilline-1 (Isogai, 2002) en wordt gestabiliseerd door fibuline-4. (Chaudhry *et al*, 2007)

- PATHWAY

De signalisatie start wanneer één van de TGF- β isovormen vrijgesteld wordt van de ECM en bijgevolg geactiveerd wordt. Dit is mogelijk door inwerking van het thrombospondin-1 glycoproteïne (TSP-1), of door proteasen, zoals MMP's of plasmine. (Annes, 2003) Daarnaast kan ook een zure omgeving of de aanwezigheid van *reactive oxygen species* (ROS) tot activering van TGF- β leiden. (Barcellos-Hoff & Dix, 1996) Het cytokine kan vervolgens in contact komen met zijn receptoren op het celoppervlak, TGF- β type II (TGFBR2) en type I (TGFBR1) receptoren. Beide receptoren hebben een serine/threonine kinase activiteit. Binding van TGF- β gebeurt primair via TGFBR2. Een dimeer van TGFBR2's wordt herkend door twee TGFBR1's, die naar het complex gerekruteerd worden. De nabijheid van beide receptoren laat toe dat het constitutief actieve kinase domein van TGFBR2, specifieke serine en threonine residuen van TGFBR1 fosforyleert en op die manier activeert. Deze geeft op zijn beurt het signaal door via fosforylatie van cytoplasmatische signaaltransducers: de Smad-eiwitten. Deze verzameling van receptor-gereguleerde eiwitten (R-Smad), co-activators (coSmad) en inhibitors (I-Smad), wordt door verschillende pathways gebruikt, wat onderlinge communicatie mogelijk maakt. Wanneer geactiveerde R-smads (Smad-2 en -3) interageren met een coSmad (Smad-4), ontstaat een actief complex dat naar de nucleus transloceert. Hier zal het dan fungeren als transcriptiefactor en in samenwerking met andere regulatoren specifiek de expressie van doelwitgenen beïnvloeden (Figuur 7). (Heldin *et al*, 1997; Goumans *et al*, 2009)



Figuur 7. TGF- β signalisatie pathway. Een TGF- β dimeer bindt op de TGF- β type II receptor (T β -RII), eventueel na interactie met een type III receptor (T β -RIII). Een koppel TGF- β type I receptoren (T β -RI) wordt naar dit complex gerekruteerd. Receptor-geassocieerde Smad eiwitten (Smad2 en Smad3) worden door het receptor-complex geactiveerd d.m.v. fosforylatie. Deze stap kan geïnhibeerd door inhibitorische Smads (Smad-6 en -7). Het Smad2/3-Smad4 complex wordt naar de kern getransloceerd, waar het als transcriptiefactor de genexpressie reguleert. (Pinzani & Marra, 2001)

Het is duidelijk dat deze pathway op vele niveaus gereguleerd kan worden. Naast de klassieke transcriptionele regulatie, is er in grote mate post-transcriptionele controle. Deze start bij de verschillende processingsstappen en de sequestratie van TGF- β in de ECM. Maar ook het celoppervlak is een belangrijk punt van regulatie. Hier vinden we de zogenaamde “type III” receptoren terug, zoals endogline en betaglycaan. Deze missen het intracellulaire signalisatiedomein, waardoor ze een louter presenterende functie hebben en het TGF- β ligand al dan niet beschikbaar kunnen maken voor signalisatie. (ten Dijke & Arthur, 2007) Ten slotte is er naast de klassieke Smad-afhankelijke, ook Smad-onafhankelijke signalisatie mogelijk. Zo zijn er verschillende *mitogen activated protein* (MAP) kinasen geïdentificeerd die door TGF- β geactiveerd kunnen worden. Deze niet-canonieke pathway kent andere doelwitgenen en regulatoren, wat voor nóg meer functionele complexiteit zorgt. (Derynck & Zhang, 2003)

- FUNCTIE

Het TGF- β signaal kan door een veelvoud aan celtypes geproduceerd en ontvangen worden. Algemeen heeft dit cytokine een invloed op celproliferatie en -differentiatie, waarbij sterk uiteenlopende effecten mogelijk zijn naar gelang concentratie en context. (Berk, 2001) In de vaatwand is TGF- β het meest gekend voor zijn cruciale rol in herstel van weefselschade, waarbij deze factor een voornamelijk profibrotisch karakter heeft. (LeRoy *et al*, 1990) Concreet zorgt TGF- β signalisatie in fibroblasten er bijvoorbeeld voor dat deze cellen prolifereren en gestimuleerd worden tot collageen depositie. (Ignotz & Massagué, 1986) Fibroblasten transdifferentiëren hierbij tot de actievere myofibroblasten. (Willis & Borok, 2007) Daarnaast wordt ook de expressie van de profibrotische eiwitten, *connective tissue growth factor* (CTGF) en TIMP's gestimuleerd en de stabiliteit van tropoelastine mRNA verhoogd. (Moussad & Brigstock, 2000). De productie van verschillende MMP's wordt dan weer geïnhibeerd door TGF- β . (Yan & Boyd, 2007). Ook SMC's worden door TGF- β beïnvloed. Deze cellen nemen een meer gedifferentieerd fenotype aan na stimulatie van de TGF- β pathway. (Owens, 1995) Daarnaast induceert TGF- β signalisatie in SMC's ook collageen productie door deze cellen. (Kubota, 2003)

Ondanks deze ECM-stabiliserende eigenschappen, kan het TGF- β cytokine ook degradatie van de ECM veroorzaken. Dit gebeurt vermoedelijk via alternatieve pathways. (Kim *et al*, 2004) Zo kan TGF- β signalisatie in fibroblasten deze cellen aanzetten tot de productie van tissue plasminogen activator (tPA). (Laiho *et al*, 1986) In borstkanker cellen bleek TGF- β zelfs de expressie van bepaalde MMP's op te reguleren. (Kim *et al*, 2004)

Deze tegenstrijdige werking, samen met concentratie- en context-afhankelijke responsen, maken het enorm moeilijk het exacte effect van TGF- β op de vaatwand te achterhalen. Wat wel vaststaat, is dat perturbaties in signalisatie vaak nefast zijn voor vasculaire integriteit en het dus van cruciaal belang is dat deze pathway niet verstoord wordt. (Gharaee-Kermani *et al*, 2009)

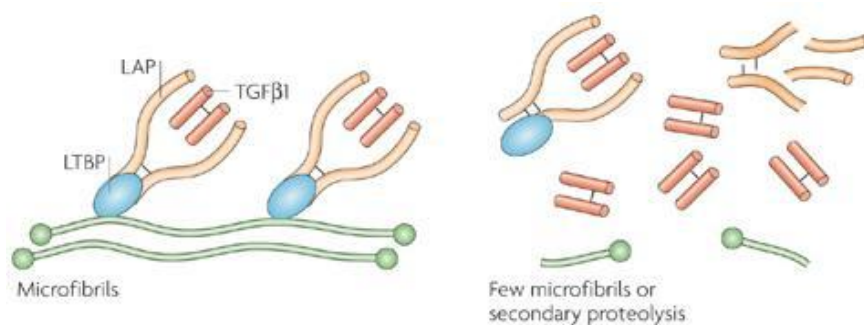
1.4.THORACALE AORTA-ANEURYSMA'S

1.4.1.ETIOLOGIE

Belangrijke risicofactoren voor de ontwikkeling van een TAA zijn roken, hoge bloeddruk, diabetes mellitus, hoge cholesterol en atherosclerose. (Dapunt *et al*, 1994). Ook infecties die de vaatwand beschadigen (bv. syfilis) of mechanische trauma's, zoals bij een auto-ongeval, kunnen leiden tot TAA's. (Mickley *et al*, 1995; Steinberg, 1957) Deze aandoening wordt echter gekenmerkt door een belangrijke genetische component. Uit linkage studies leerde men dat er bij 20 % van de gevallen een familiale basis is voor TAA's. (Elefteriades, 2002) Er zijn reeds verschillende erfelijke syndromen beschreven die gekarakteriseerd worden door de aanwezigheid van een TAA, onder meer het syndroom van Marfan (MFS) en het Loeys-Dietz syndroom (LDS). Daarnaast komen ook niet-syndromale vormen van TAA voor, met name Familiaal Thoracaal Aorta-Aneurysma/Dissectie (FTAAD), eventueel in combinatie met bicuspide klep (BAV) of patente ductus arteriosus (PDA).

- MARFAN SYNDROOM

Het Marfan syndroom (MFS, OMIM#154700) is een autosomaal dominante aandoening, gekenmerkt door een variabele fenotypische expressie. Deze multisystemische aandoening tast onder meer het skeletaal (arachnodactylie, overbeweeglijke gewrichten enz), het oculair (ectopia lentis) en het cardiovasculair systeem (aorta-aneurysma) aan. Naast manifestaties in deze systemen kunnen Marfan patiënten ook schade aan de longen, de huid en het centraal zenuwstelsel vertonen. (De Paepe *et al*, 1996) De belangrijkste doodsoorzaak echter zijn de cardiovasculaire complicaties. Patiënten ontwikkelen al op jonge leeftijd aneurysma's, voornamelijk ter hoogte van de aortawortel, met het risico op een fatale breuk of dissectie. (Cañadas *et al*, 2010)



Figuur 8. Model voor de pathogenese van MFS. Links, de normale situatie: microfibrillen interageren met LTBP en houden zo het TGF- β complex inactief in de ECM. Rechts, de situatie bij MFS patiënten: een te klein aantal of door fragmentatie getrunceerde microfibrillen zijn niet in staat TGF- β voldoende te sequestrenen, waardoor dit cytokine geactiveerd wordt, met een verhoogde TGF- β signalisatie tot gevolg. (ten Dijke & Arthur, 2007)

Wereldwijd treft MFS één op de vijf- tot tienduizend mensen, waarbij de ziekte in 75 % van de patiënten een familiale achtergrond kent. (Pearson *et al*, 2008) De overige 25 % kan verklaard worden door de aanwezigheid van een *de novo* mutatie. (Keane & Pyeritz, 2008) In de meeste gevallen wordt de aandoening veroorzaakt door een mutatie in het *FBN1* gen (15q21.1), dat codeert voor fibrilline-1, een belangrijke structurele component van de ECM. Tot op heden zijn er al meer dan 1500 mutaties geïdentificeerd in *FBN1*. Het betreft zowel

missense, nonsense, frameshift, splicing mutaties als inserties/deleties. (Robinson *et al*, 2006) Er werd lange tijd aangenomen dat een mutatie in het FBN1 gen via problemen met microfibrillen tot een structurele verzwakking van het bindweefsel leidt, met o.a. een vermindering in vasculaire integriteit tot gevolg. (Judge *et al*, 2004)

Hoewel deze theorie aannemelijk lijkt, is ze niet in staat alle symptomen van MFS te verklaren, waardoor de laatste jaren een meer complex mechanisme naar voor geschoven werd (Figuur 8). (Neptune *et al*, 2003) Hierbij focust men op de regulatorische rol van fibrilline-1, waarbij dit eiwit groeifactoren en cytokines al dan niet beschikbaar kan maken. (ten Dijke & Arthur, 2007) Zo zagen we reeds dat TGF- β gesequestreerd wordt door de uit fibrilline opgebouwde microfibrillen. Muismodellen bevestigen dat een verstoring van deze interactie leidt tot een verhoogde vrijgave van TGF- β , met een overstimulatie van de pathway en pathogene veranderingen in de ECM tot gevolg. (Habashi, 2006)

- LOEYS-DIETZ SYNDROOM

Het Loeys-Dietz syndroom (LDS, OMIM#609192) is eveneens een autosomaal dominante bindweefselaandoening, die fenotypisch sterke gelijkenissen vertoont met MFS. Deze ziekte wordt voornamelijk gekenmerkt door een triade van hypertelorisme, bifide uvula/gespleten verhemelte en aorta-aneurysma en arteriële tortuositeit. (Loeys *et al*, 2005) Wat LDS echter onderscheidt van MFS is de vroegere ontwikkeling en het agressiever verloop van de aorta-aneurysma's, met een grotere kans op dissectie. De gemiddelde levensverwachting van LDS patiënten is hierdoor gereduceerd tot slechts 37 jaar. (Johnson *et al*, 2007)

Op moleculair niveau wordt LDS veroorzaakt door heterozygote mutaties in de TGFBR1 of TGFBR2 genen, die respectievelijk coderen voor de TGF- β receptoren 1 en 2. Uit genotypische analyse leerde men dat de mutaties vooral het serine-threonine domein treffen, waardoor de receptoren hun kinase functie verliezen. (Loeys *et al*, 2006) Ondanks deze defecten blijken downstream targets, zoals phospho-Smad2 en CTGF, vaak opgereguleerd te zijn in LDS patiënten, wat wijst op een paradoxale overstimulatie van TGF- β signalisatie. (Maleszewski *et al*, 2009) Het is algemeen aanvaard dat de TGF- β pathway, net als bij MFS, een zeer belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van TAA's bij LDS. De manier waarop een loss-of-function mutatie in de receptor tot een verhoogde signalisatie leidt, blijft echter nog onduidelijk. (Van Hemelrijk *et al*, 2010)

- FAMILIALE THORACALE AORTA-ANEURYSMA EN DISSECTIE

Een thoracaal aorta-aneurysma kan ook geïsoleerd voorkomen. In ongeveer 20% van de gevallen is er dan een familiale basis voor het voorkomen van TAA. (Biddinger *et al*, 1997) Familiale thoracale aorta-aneurysma en dissectie (FTAAD) wordt doorgaans autosomaal dominant overgeërfd met een verminderde penetrantie en variabele expressie. Genetisch wordt FTAAD gekenmerkt door een hoge heterogeniteit. Zo zijn er mutaties geïdentificeerd in verschillende geannoteerde en niet-geannoteerde loci. In de meeste gevallen (14 %) gaat het hierbij om een mutatie het ACTA2 gen, dat voor het SMA- α eiwit codeert. (Guo *et al*, 2007) In mindere mate kunnen ook mutaties in de MYH11 en MYLK genen, die respectievelijk voor SM-MHC en MLC coderen, FTAAD veroorzaken (Wang *et al*, 2010). Daarnaast komen ook mutaties voor in genen die verbonden zijn met de TGF- β pathway, zoals *TGFBR1*, *TGFBR2*, *FBN1* en *SMAD3*. (van de Laar *et al*, 2011) Tot slot zijn enkele vaak gemuteerde loci gekend, waar de causale genen nog niet geïdentificeerd konden

worden: *AAT1* (11q23.3-24), *AAT2* (5q13-14) en *TAAD5* (49 Mb regio op chromosoom 12). (Guo *et al*, 2010)

Wat het pathogenetisch mechanisme van FTAAD betreft, suggereren defecten in contractiele eiwitten zoals SM-MHC en SMA- α een belangrijke rol voor SMC's. Zo zorgen mutaties in *MYH11* bijvoorbeeld voor een daling in stabiliteit van de myosine myofilamenten (Zhu *et al*, 2006), terwijl *ACTA2* mutaties tot problemen in polymerisatie van actine myofilamenten leiden. Beide veroorzaken een dysfunctie van SMC's, wat histologisch zichtbaar is als een verlies of desorganisatie van deze cellen. (Guo *et al*, 2009)

1.4.2.PATHOGENESE

Ondanks de verschillen in etiologie, vertonen alle TAA patiënten enkele gemeenschappelijke fenotypische kenmerken. Zo bleek uit histologische analyse dat deze aandoening een karakteristieke degeneratie van de aorta vaatwand kent. Vooral de mediale laag, die van cruciaal belang is voor de hemodynamische functie van de thoracale aorta, wordt hierbij getroffen. Deze degeneratie, in de literatuur vaak beschreven als "cystische mediale necrose", wordt gekenmerkt door een combinatie van structurele, cellulaire en regulatorische afwijkingen in de tunica media. (El-Hamamsy & Yacoub, 2009)

- STRUCTUREEL

Wat de structuur betreft zijn er grote verschillen in samenstelling van de ECM tussen de normale en aneurysmale vaatwand. (Manley, 1964) Zo zijn de elastische vezels, die normaal gezien abundant voorkomen in de media, gefragmenteerd bij TAA's. Dit is te wijten aan de proteolytische degradatie van elastine en microfibrillen die deze structuren vorm geven. (Raffetto & Khalil, 2008) Daarnaast wordt ook afbraak van collageen vezels geobserveerd. (Defigueiredoborges *et al*, 2008) Het verlies van deze structuren wordt gecompenseerd door een verhoogde afzetting van grondsubstantie, onder de vorm van amorfe mucopolysacchariden. Deze nieuwe samenstelling van de ECM leidt tot een daling in elasticiteit en integriteit van de aorta, wat dit weefsel vatbaar maakt voor dissectie.

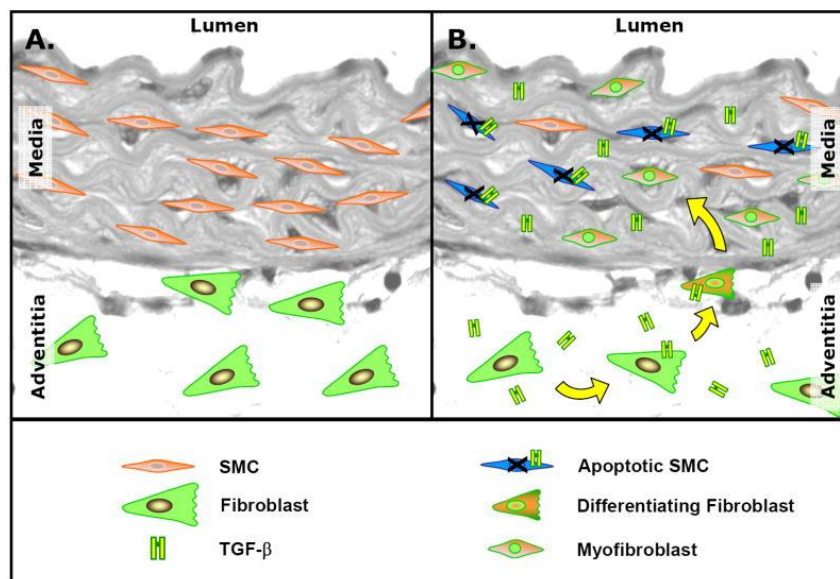
- CELLULAIR

Naast de veranderde structurele compositie, wordt ook een wijziging in cellulaire samenstelling van de media waargenomen. Vooral de organisatie van SMC's is hierbij verstoord, waarbij zowel apoptose als ongeordende proliferatie gedetecteerd werden. (Henderson *et al*, 1999) De nieuwe schikking maakt het onmogelijk voor SMC's om hun typische synchrone contracties uit te voeren, wat voor een daling in vasculaire integriteit zorgt. (Milewicz *et al*, 2008)

Ook fibroblasten zijn fenotypisch verschillend bij TAA patiënten. Net als bij herstelprocessen wordt namelijk een verhoogde differentiatie tot myofibroblast geobserveerd. (Jones *et al*, 2010) Deze cellen dragen door hun secretorische en contractiel fenotype vermoedelijk bij tot de pathogene remodelering van de aorta vaatwand.

- REGULATORISCH

Zowel de structurele als de cellulaire problemen zijn grotendeels te wijten aan een onevenwicht in de protease systemen, die als belangrijke regulatoren van de ECM homeostase gelden. (Barbour *et al*, 2007) Zo wordt bij TAA's een extensieve productie van o.a. MMP-1 en MMP-9 gedetecteerd (Koullias *et al*, 2004), samen met verminderde aanmaak van TIMP-1 en TIMP-2. (Tsarouhas *et al*, 2010) Deze verhoogde MMP/TIMP ratio induceert een proteolytische omgeving, die structurele componenten van de ECM aantast. Daarnaast kunnen proteasen via degradatie van ECM eiwitten ook onrechtstreeks een wijziging in cellulair fenotype veroorzaken. Zo kan bijvoorbeeld plasmine-gemedieerde afbraak van adhesieve eiwitten, zoals fibronectine, celdood van SMC's induceren. (Meilhac *et al*, 2003)



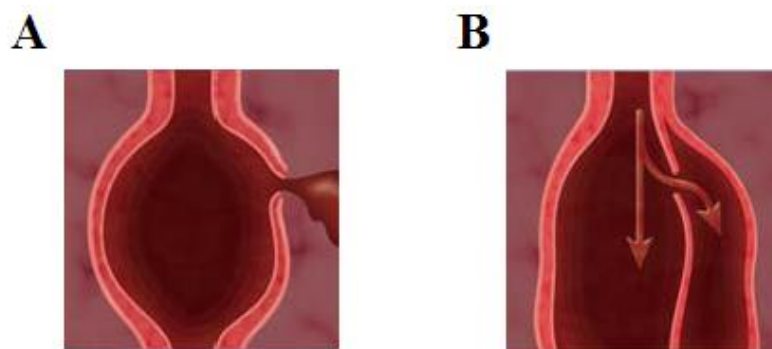
Figuur 9. Vooropgesteld mechanisme van mediale degeneratie door TGF- β stimulatie. **A:** De normale thoracale aorta: SMC's in de media en fibroblasten in de adventitia bevinden zich in homeostase. **B:** De thoracale aorta onderhevig aan een aneurysma: SMC's ondergaan apoptose en verdwijnen uit de media. Fibroblasten differentiëren tot myofibroblasten en koloniseren deze zone. TGF- β stimulatie van myofibroblasten leidt vervolgens tot productie van MMP's door deze cellen, wat tot afbraak van ECM, vasculaire destabilisatie en uiteindelijk ontwikkeling van aneurysma's leidt. (Jones *et al*, 2009)

Wellicht nog belangrijker dan deze proteasen, is de rol van het TGF- β cytokine. Deze regulator controleert o.a. de differentiatiestatus van vasculaire SMC's en fibroblasten, en stuurt zo ook de productie van ECM eiwitten of proteasen door deze cellen. Bovendien werd de TGF- β pathway op verschillende wijzen in verband gebracht met TAA's. Zo werd bij MFS en LDS patiënten herhaaldelijk een verhoogde signalisatie gevonden. Het pleiotrope en complexe karakter van TGF- β maakt de zoektocht naar het exacte mechanisme echter niet eenvoudig. Jones *et al* (2009) deden een poging om de pathogene werking van dit peptide te verklaren (Figuur 9). Hierbij zou een verhoogde TGF- β signalisatie in de eerste plaats een wijziging in cellulair samenstelling van de vaatwand veroorzaken. SMC's ondergaan celdood, gevolgd door transdifferentiatie van fibroblasten tot myofibroblasten, die naar de mediale zone migreren. Dankzij hun nieuw verworven eigenschappen, zouden myofibroblasten in de media anders reageren op de verhoogde extracellulaire TGF- β concentratie. Deze cellen zouden bijvoorbeeld meer MMP's en minder TIMP's expresseren,

wat tot afbraak van o.a. de collageen en elastische vezels leidt. Op deze manier zou de verhoogde TGF- β signalisatie voor degeneratie van de media zorgen, al blijft dit proces onderwerp van hypothese. (Jones *et al*, 2009)

- ALGEMEEN

Ongeacht het pathogene mechanische, gaat men er vanuit dat de structurele complicaties de vaatwand vatbaar maken voor verwijdingen. De verzwakte aorta verliest hierbij het vermogen om weerstand te bieden aan de systolische druk, wat voor een toename in diameter zorgt. Volgens de wet van Laplace² zorgt dit proces voor een groter wordende wandspanning, die de diameter van de aorta nog meer doet stijgen. (Beller *et al*, 2010) Cycli van verwijdingen en daaropvolgende drukverhoging, leiden tot een pathogene vicieuze cirkel, die zonder interventie resulteert in een dissectie of breuk van de aorta (Figuur 10). (Elefteriades, 2008)



Figuur 10. Gevolgen van een verzwakte vaatwand: Aneurysma vs dissectie. Mediale degeneratie leidt tot een verzwakking van de vaatwand, die onder invloed van de bloeddruk kan verwijden. Dit resulteert uiteindelijk in een breuk (A) of dissectie (B) van het bloedvat. (Elefteriades, 2005)

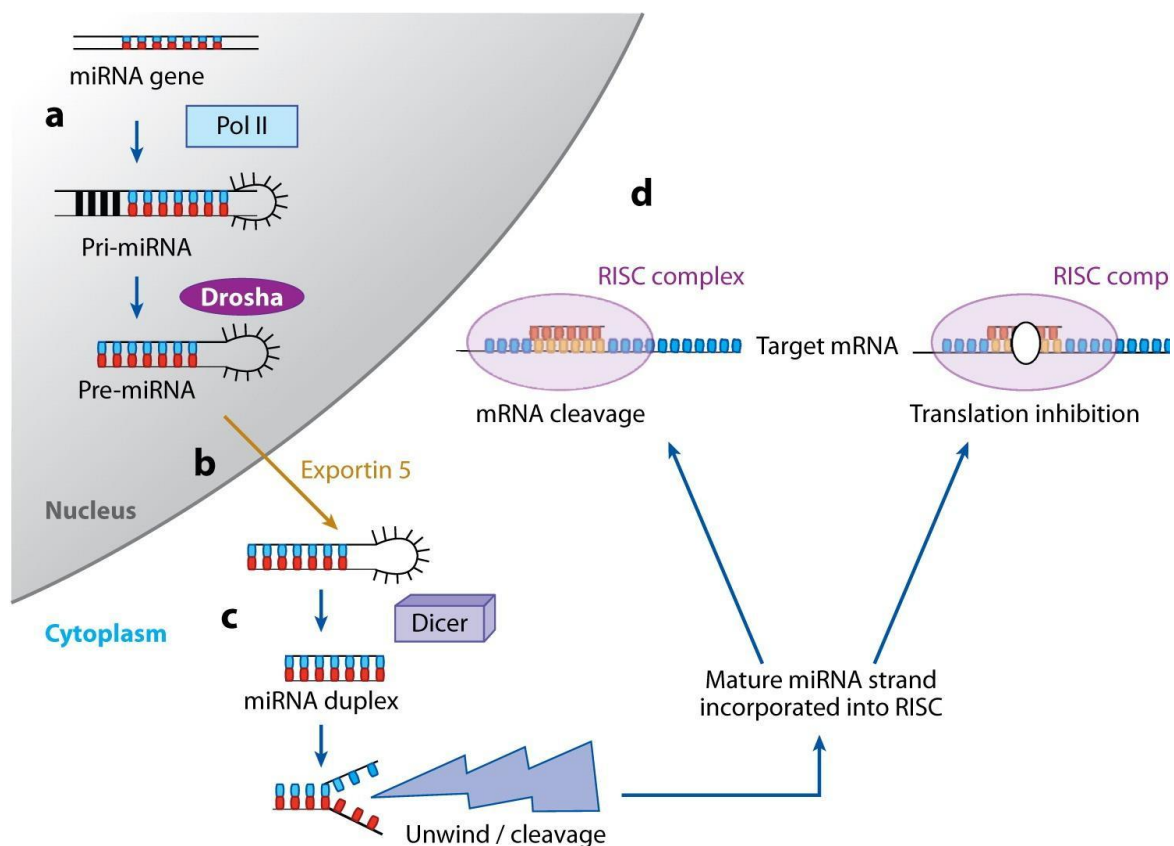
1.5.MICRORNA

1.5.1.INLEIDING

Genexpressie kan op verschillende manieren gecontroleerd worden. Naast de klassieke regulatie van transcriptie van het DNA in RNA, is de stabiliteit en vertaling van dit messenger RNA (mRNA) een tweede belangrijk punt van controle. MicroRNA's (miRNA's) spelen hierbij een sleutelrol. Dit is een familie van endogene RNA moleculen van ± 22 nucleotiden lang, die een louter regulatorische functie uitoefenen. In tegenstelling tot mRNA wordt dit type RNA niet vertaald in eiwit. (Bartel, 2004) Een lange miRNA precursor wordt onmiddellijk na synthese onderworpen aan een reeks processingsstappen, waarbij endonucleases Drosha en Dicer een korte, mature miRNA duplex genereren (Figuur 11). Deze dubbelstrengige RNA molecule wordt vervolgens naar het *RNA induced silencing complex* (RISC) geleid. Dit is een multimeer complex dat o.a. de katalytisch actieve Argonaute (Ago) eiwitten bevat. Eén van de functies van dit complex is het enkelstrengig maken van het miRNA, waarbij één streng geselecteerd wordt op basis van thermodynamica. De streng met het minst stabiele 5' uiteinde, de "*guide strand*", wordt geïncorporeerd in het RISC, terwijl de

² De Wet van Laplace, toegepast op een bloedvat, beschrijft de relatie tussen wandspanning (T), de druk (P), de de straal (R) en de dikte (M), waarbij $T = (P \times R)/M$. (Beller *et al*, 2010)

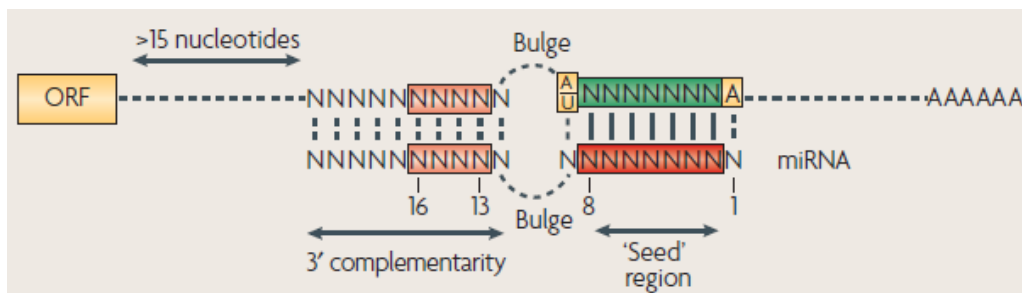
andere “*passenger strand*” gedegradeerd wordt. (Khvorova *et al*, 2003) In een volgende stap gidst de *guide strand* het complex naar zijn doelwit mRNA. Specifieke baseparing van deze streng met het 3' onvertaalde gebied (UTR) van het mRNA verzekert dat deze stap correct gebeurt. Vervolgens is het de beurt aan leden van de Ago familie om hun represserende functie uit te oefenen. Hier zijn verschillende mechanismen mogelijk. Zo kunnen Ago eiwitten de polyA staart van het mRNA degraderen, wat voor een daling in mRNA stabiliteit zorgt. (Parker & Song, 2004) Daarnaast kunnen ze ook initiatie van translatie verhinderen, door interactie met de hiervoor essentiële 5' cap van het mRNA. (Kiriakidou *et al*, 2007) De keuze van het mechanisme wordt bepaald door het type Ago enzyme dat zich in het RISC bevindt, wat dan weer voor een groot deel afhankelijk is van de mate van complementariteit in de miRNA-mRNA baseparing. (Valencia-Sanchez, 2006) Naast deze uitvoerig gekarakteriseerde translationele repressie, is er groeiend bewijs dat miRNA's ook kunnen inwerken op het niveau van transcriptie. (Kim *et al*, 2008) Complementariteit van miRNA met de promotor regio zou via histon modificaties of DNA methylatie voor inhibitie van transcriptie zorgen. Over het precieze mechanisme is echter nog weinig geweten. (Younger & Corey, 2011) Wat wel vaststaat is dat miRNA's ondanks hun kleine afmeting een grote impact kunnen hebben op het fenotype van de cel. Zo zijn er al meer dan duizend verschillende miRNA's ontdekt (<http://www.mirbase.org>), waarvan voorspeld wordt dat ze samengeteld tot 30 % van onze genen kunnen beïnvloeden. (Kong *et al*. 2009; Gartel & Kandel, 2008)



Figuur 11. Biogenese en werking van miRNA. a) Een miRNA gen wordt door RNA polymerase II afgeschreven in een lange precursor: pri-miRNA. b) Na processing door Droscha ontstaat hieruit pre-miRNA, dat vervolgens door Exportine 5 geëxporteerd wordt uit de kern. c) Het cytoplasmatische Dicer enzyme vormt het pre-miRNA om tot een miRNA duplex, die naar het RISC complex wordt gestuurd. Hier wordt één van beide strengen geselecteerd. d) Deze *guide strand* leidt het complex naar het doelwit mRNA, waar het RISC zijn represserende functie uitoefent. (Garzon *et al*, 2009)

1.5.2. BASEPARING PRINCIPES

Een heel belangrijke factor in de regulatie van gen expressie door miRNA's is de specificiteit. Uiteraard mogen enkel de "correcte genen" gesilenced worden. Dit wordt verzekerd door specifieke baseparing tussen het miRNA en het doelwit mRNA. Uit experimentele en bioinformatische analyses bleek echter dat deze hybridisatie niet altijd perfect is en onderworpen is aan een reeks principes. (Brennecke *et al*, 2005) Zo vereisen enkel nucleotiden 2 tot 8 van het miRNA, de zogenaamde "seed" regio, perfecte baseparing met het mRNA. (Figuur 12) Voor de overige nucleotiden gelden minder strenge regels. (Filipowicz *et al*, 2008). Deze flexibiliteit heeft tot gevolg dat één miRNA soms meerdere mRNA's kan targetten, net als de UTR van één mRNA ook door meerdere miRNA's tegelijk kan gebonden worden, wat tot synergistische effecten kan leiden. (Chau & Brenner, 2011)



Figuur 12. Baseparing principes tussen miRNA en mRNA. Bovenaan is het 3' uiteinde van het mRNA voorgesteld. De belangrijke nucleotiden (N) zijn aangeduid in kleur. De onderste sequentie komt overeen met het miRNA. Hier zijn de essentiële 5' seed regio, de middelste uitstulping (*bulge*) en de minder cruciale 3' regio weergegeven. (Filipowicz *et al*, 2008)

Bioinformatici hebben algoritmes ontwikkeld die het mogelijk maken de doelwitgenen van miRNA's te voorspellen. Daarnaast is het ook mogelijk om vertrekkende van een gen, de mogelijke miRNA partners te identificeren. Deze algoritmes maken onder meer gebruik van baseparingsprincipes, thermodynamische berekeningen en evolutionaire studies (Min & Yoon, 2010). Voorbeelden zijn DIANA, Targetscan, PITA, Tarbase enz. Ook miRDB (<http://miRDB.org>) wordt vanwege zijn grote betrouwbaarheid vaak gebruikt. Dankzij een ingenieus *support vector machine* (SVM) systeem, gebaseerd op experimentele data, is dit algoritme in staat de potentiële doelwitgenen te rangschikken volgens een bepaald targetscore. (Wang & El Naqa, 2008; Wang, 2008) De identificatie van doelwitgenen kan helpen om de functie van één of meerdere miRNA's te achterhalen.

1.5.3. DE ROL VAN MIRNA IN TAA

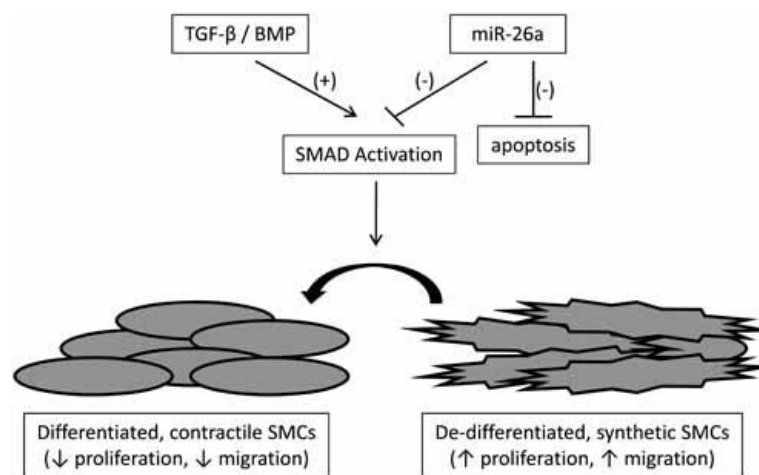
MiRNA's controleren een waaier aan fysiologische processen en dysregulatie werd reeds in verband gebracht met heel wat aandoeningen, zoals kanker of fibrose. (Jiang *et al*, 2009) Verschillende hoofdrolspelers in de pathogenese van TAA zijn eveneens onderworpen aan deze vorm van gen regulatie.

Eén van de meest beschreven regulatoren is microRNA-29 (miR-29). Deze familie van miRNA's speelt een belangrijke rol in de homeostase van de ECM. Experimenteel kon worden aangetoond dat leden van de miR-29 familie o.a. elastine en collageen mRNA kunnen binden. (Maurer *et al*, 2010) Een downregulatie van miR-29 werd reeds gedetecteerd in

verschillende vormen van fibrose, waarbij een daling in repressie van collageen expressie tot extensieve depositie van deze macromoleculen leidt. (Liao *et al*, 2011)

Andere miRNA's die een belangrijke rol spelen in de homeostase van de ECM zijn miR-17 en miR-133/miR-30. Deze eerste reguleert fibronectine expressie, terwijl de laatste twee CTGF productie kunnen onderdrukken. (Shan *et al*, 2009; Duisters *et al*, 2009) Beide eiwitten dienen eveneens geïnhibeerd te worden om overmatige depositie van ECM materiaal te vermijden.

MiR-143 en miR-145 spelen een belangrijke rol in de plasticiteit van vasculaire SMC's. (Cordes *et al*, 2009) Deze miRNA's zorgen namelijk voor het behoud van de differentiatiecapaciteit van SMC's. Dit is noodzakelijk om de contractiele functies van deze cellen te bewaren, wat op zijn beurt cruciaal is voor de vasculaire integriteit.



Figuur 13. Vooropgesteld mechanisme waarop miR-26a het fenotype van SMC's beïnvloedt. Rechts zijn SMC's voorgesteld in een proliferatieve, ongedifferentieerde status. Activering van bepaalde SMAD eiwitten in deze cellen zorgt voor fenotypische modulatie naar een gedifferentieerde, contractiele status (links). MiR-26a is in staat dit proces te inhiberen. (Leeper *et al*, 2011)

Verder zijn ook een reeks miRNA's ontdekt die componenten van de TGF-β pathway targetten. Zo zorgt miR-26a er via inhibitie van Smad-1 en Smad-4 eiwitten voor dat TGF-β signalisatie in SMC's geremd wordt. Wanneer dit miRNA onvoldoende wordt aangemaakt, leidt overstimulatie van genen die downstream van TGF-β liggen tot een verstoorde differentiatiestatus van o.a. SMC's (Figuur 13). Dit blijkt bijvoorbeeld het geval bij AAA's, waar een verlaagde miR-26a expressie de drijfveer is voor SMC dysfunctie en toename in de abdominale aorta diameter. (Leeper *et al*, 2011)

Naast inhibitie kunnen miRNA's ook stimulatie van de TGF-β pathway verwezenlijken. MiR-21 doet dit bijvoorbeeld door in te werken op de inhibitorische Smad-7. (Liu *et al*, 2010) Ook de receptoren, zoals TGFBR2, worden mogelijk gereguleerd door miRNA's, met name de miR-17-92 cluster. (Mestdagh *et al*, 2010)

Tot slot verwijzen we naar een recent gepubliceerd onderzoek, waarin een miRNA profilering werd uitgevoerd bij patiënten met thoracaal aorta dissectie (TAD). Hoewel deze aandoening kleine verschillen vertoont met TAA, is de pathobiologie ook hier gekenmerkt door mediale degeneratie. De resultaten van dit experiment konden niet alleen enkele vorige bevindingen bevestigen, maar kon daarnaast ook nieuwe miRNA's en doelwitgenen identificeren, die vaak

ook minder voor de hand liggend zijn. Zo detecteerde men verschillen in expressie van bvb. miR-29 en miR-30, die respectievelijk genen betrokken in de focale adhesie en MAPK pathway reguleren. Verder vond men ook een aanrijking van de MTOR en Wnt signalisatie pathways. (Liao *et al*, 2011)

Ondanks deze nuttige informatie, zijn deze resultaten niet zomaar extrapoleerbaar naar TAA's. Naast de histologische verschillen, zijn TAD en TAA ook op moleculair vlak niet identiek. Zo blijken er bijvoorbeeld verschillen te zijn in het collageen gehalte van de vaatwand, dat iets hoger ligt bij TAD's. (Wang, 2006; Defigueiredoborges *et al*, 2008) Het is daarom noodzakelijk om ook bij TAA patiënten een uitvoerige miRNA profilering te doen, zodat het belang van miRNA in de pathogenese van deze aandoening duidelijk wordt.

Deel 2:DOELSTELLING

2.1.INLEIDING

De pathogenese van TAA's is nog niet volledig begrepen. Genetische syndromen zoals LDS en MFS hebben reeds hun nut bewezen door het belang van bepaalde eiwitten aan te tonen. Zo werd de vaak verstoorde TGF- β pathway als één van de hoofdrolspelers geïdentificeerd, net als de vele ECM eiwitten die dit cytokine weet te reguleren. Over de exacte moleculaire mechanismen waarop deze verstoringen tot TAA's leiden, blijven echter vraagtekens bestaan, waardoor men het vaak over een "paradox in pathogenese" heeft. (Jones *et al*, 2009)

MiRNA is een vorm van genregulatie, die in alsmaar meer processen een rol blijkt te spelen. Zo werden recent miRNA's ontdekt, die verschillende ECM eiwitten reguleren, terwijl andere dan weer in staat zijn de TGF- β pathway te controleren. (Mestdagh *et al*, 2010)

Aangezien de miRNA wereld een nog vrij onontgonnen gebied is en de link met TAA's alles behalve gefundeerd is, is verder onderzoek nodig. Het doel van dit project is om na te gaan wat de rol is van miRNA's bij de ontwikkeling van TAA's. Hierbij wordt uitgegaan van TAA's van verschillende syndromale oorsprong (LDS en MFS), met als doel een gezamenlijk patroon terug te vinden dat karakteristiek is voor TAA's. We vermoeden dat deze strategie zal werken, aangezien ondanks de etiologische verschillen tussen de syndromen, deze allen resulteren in de karakteristieke degeneratie van de aortawand.

2.2.EXPERIMENT

In een voorbereidende fase worden fibroblast cellen van LDS en MFS patiënten en gezonde controles in cultuur gebracht. Deze cellen zijn afkomstig van huidbiopsies, doorgaans afgenomen aan de binnenzijde van de bovenarm. Ten gepaste tijde worden de cellen geoogst en het RNA geïsoleerd. Dit RNA wordt vervolgens gebruikt om het miRNA expressie patroon van de verschillende stalen na te gaan. Hierbij worden na een pre-amplificatie stap, 754 humane miRNA's gekwantificeerd in elk staal. Dit alles ten einde te achterhalen of bepaalde miRNA's meer of minder tot expressie komen in patiënten versus controles.

Verdere experimenten worden uitgevoerd met miRNA's die significant verschillend geëxprimeerd worden in de TAA groep. Om hun functionele rol te verklaren, wordt onderzocht welke doelwitgenen deze miRNA's beïnvloeden. Dit gebeurt in eerste instantie *in silico* door het gebruik van bio-informatische predictieprogramma's. Gespecialiseerde zoekmachines, zoals miRDB, genereren hierbij een lijst met genproducten die in theorie door de miRNA's getroffen kunnen worden.

In een volgende stap dienen deze bevindingen gevalideerd te worden. Dit gebeurt door mRNA expressie analyse van de voorspelde doelwitgenen. Concreet wordt hierbij een vergelijking gemaakt tussen de mRNA en miRNA expressie. Een omgekeerd verband tussen beide resultaten geeft dan extra aanwijzingen dat deze miRNA's effectief in staat zijn de expressie van de voorspelde doelwitgenen te inhiberen.

Om extra bewijs te leveren voor de betrokkenheid van een bepaald miRNA, moeten echter transfectie-experimenten worden uitgevoerd. Via introductie van positieve of negatieve miRNA precursoren wordt hierbij het miRNA expressie profiel gemanipuleerd, gevolgd door

een beoordeling van het fenotype via qPCR. Dit geeft dan mogelijk het ultieme bewijs voor het pathogene effect van een verstoorde miRNA-balans op de cel. In dit project wordt echter enkel de optimalisatie van deze stap uitgevoerd, waarbij gezocht wordt naar het optimale assay om fibroblasten te transfecteren.

Samengevat is het uiteindelijke doel de identificatie en karakterisatie van een reeks miRNA's, waarvoor sterke aanwijzingen bestaan dat deze een rol spelen in de pathogenese van TAA's.

Deel 3:RESULTATEN

3.1.OPTIMALISATIE VAN METHODEN

3.1.1.PRIMER OPTIMALISATIE

Verschillende kwantitatieve assays maken gebruik van specifieke primers voor de amplificatie van een fragment van een doelwitgen. Deze primers werden zelf ontworpen met het programma Primer3 (v. 0.4.0), waarbij werd geopteerd voor hybridisatiesites in verschillende exonen, gescheiden door een groot intron, met de bedoeling om gDNA amplificatie te vermijden. Verder werd de kwaliteit beoordeeld op basis van de afwezigheid van SNP's (via www.ensembl.org), de specificiteit van de primers (via NCBI BLAST) en de afwezigheid van secundaire structuren (DINAmelt). Experimenteel werd dan de amplificatie-efficiëntie bepaald, waarbij een cDNA verdunningsreeks geamplificeerd werd en het resultaat geanalyseerd in qBase^{PLUS} 2.0. Dit programma levert een E-waarde op, die een maat is voor de toename in materiaal per cyclus (efficiëntie), en een R²-waarde, die de lineariteit aangeeft. Voor de E-waarde zijn streefwaarden van 1,9 en 2,1 opgesteld, terwijl de R²-waarde best zo dicht mogelijk bij 1 ligt. Voor volgende genen werden primers ontworpen, die allen voldoen aan de vooropgestelde criteria: *PTK9*, *ACTN*, *CAPN2*, *FBN1*, *PPM1A*, *SMAD5*, *TGFBRI*, *TGIF2*, *TIMP2*. Standaardcurves kunnen teruggevonden worden in de bijlage (p94).

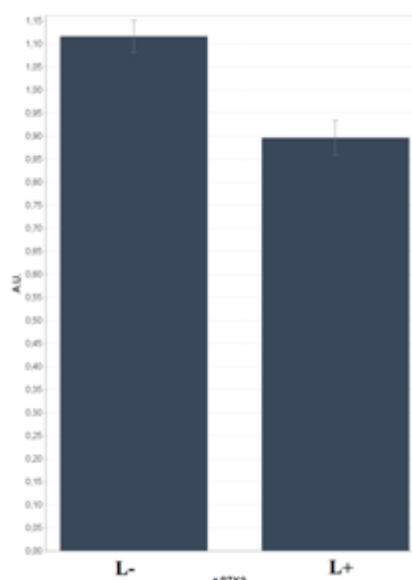
3.1.2.TRANSFECTIE

OPTIMALISATIE

Verschillende assays werden getest, met als doel de voor fibroblasten optimale transfectiemethode te identificeren. Hierbij werd aan een cultuur van controle fibroblasten telkens één van de volgende transfectiemixen toegevoegd, X-treme Gene, Lipofectamine of Dharmafect, samen met een miRNA precursor. De transfectie-efficiëntie werd op twee manieren beoordeeld, enerzijds kwantitief via een qPCR assay, anderzijds ook kwalitatief met behulp van fluorescentie.

- QPCR ASSAY

Om de efficiëntie kwantitatief te kunnen bepalen, werd een miRNA precursor gericht tegen het *PTK9* gen aan één van de transfectiemixen toegevoegd (Pre-miRTM hsa-miR-1 miRNA Precursor). Cellen waaraan deze mix werd toegevoegd, werden

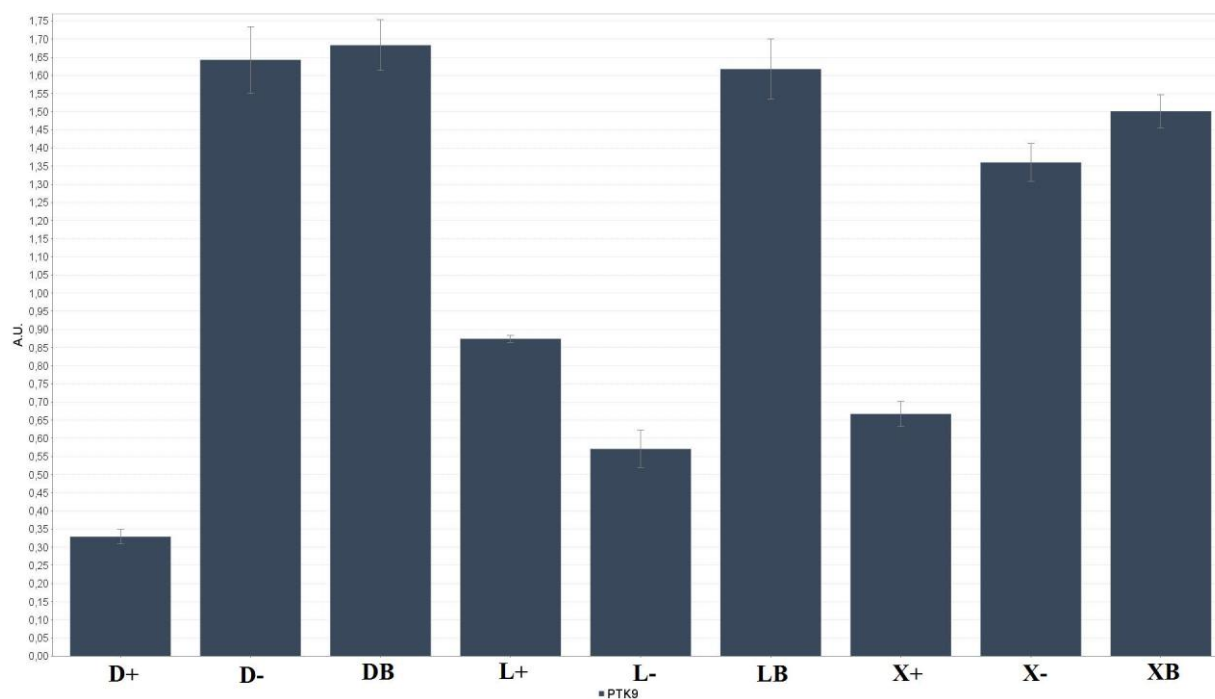


Lipofectamine		
Samples	A.U.	knock-down
L+	0,897	20%
L-	1,121	

Figuur 14. Resultaat van de qPCR assay ter optimalisatie van transfectie. Controle fibroblasten werden getransfecteerd met Lipofectamine reagentia en miRNA precursoren gericht tegen het *PTK9* transcript (L+) of met random precursoren (L-). Na transfectie werd de expressie van *PTK9* bepaald en genormaliseerd a.d.h.v drie referentiegenen. Het resultaat werd geanalyseerd m.b.v qBase^{PLUS}. Bovenaan een grafische weergave, waarbij per staal de expressie is uitgedrukt in *arbitrary units* (A.U). Onderaan een numerieke weergave, waarbij de procentuele knock-down werd berekend t.o.v. L-.

vervolgens vergeleken met controles, waarbij de transfectiemix een pool van random pre-miR's (Pre-miR™ Negative Control #1), of geen miRNA precursoren bevatte (blanco). Aangezien de Pre-miR™ hsa-miR-1 miRNA Precursor voor een 60-95 % downregulatie van *PTK9* expressie zorgt op het mRNA niveau (Lim *et al*, 2005), kon de transfectie-efficiëntie door middel van kwantificatie van *PTK9* cDNA beoordeeld worden. De cellen werden na transfectie 48u in cultuur gehouden, waarna het RNA geïsoleerd werd en omgezet in cDNA. Het *PTK9* cDNA werd vervolgens met behulp van 5x Roche Mastermix en specifiek ontworpen primers gekwantificeerd, samen met drie referentiegenen: *YWHAZ*, *GADPH* en *HPRT1*.

Dit experiment werd in tweevoud uitgevoerd: met enkel Lipofectamine reagentia (Figuur 14), en voor zowel Dharmafect, Lipofectamine als X-treme Gene reagentia (Figuur 15). De resultaten tonen een neerregulatie van het *PTK9* transcript bij alle transfectiemethoden. De neerregulatie blijkt het hoogst bij de cellen die met het Dharmafect assay getransfecteerd werden (**D+**). Hier werd een knock-down van 80 % geobserveerd.

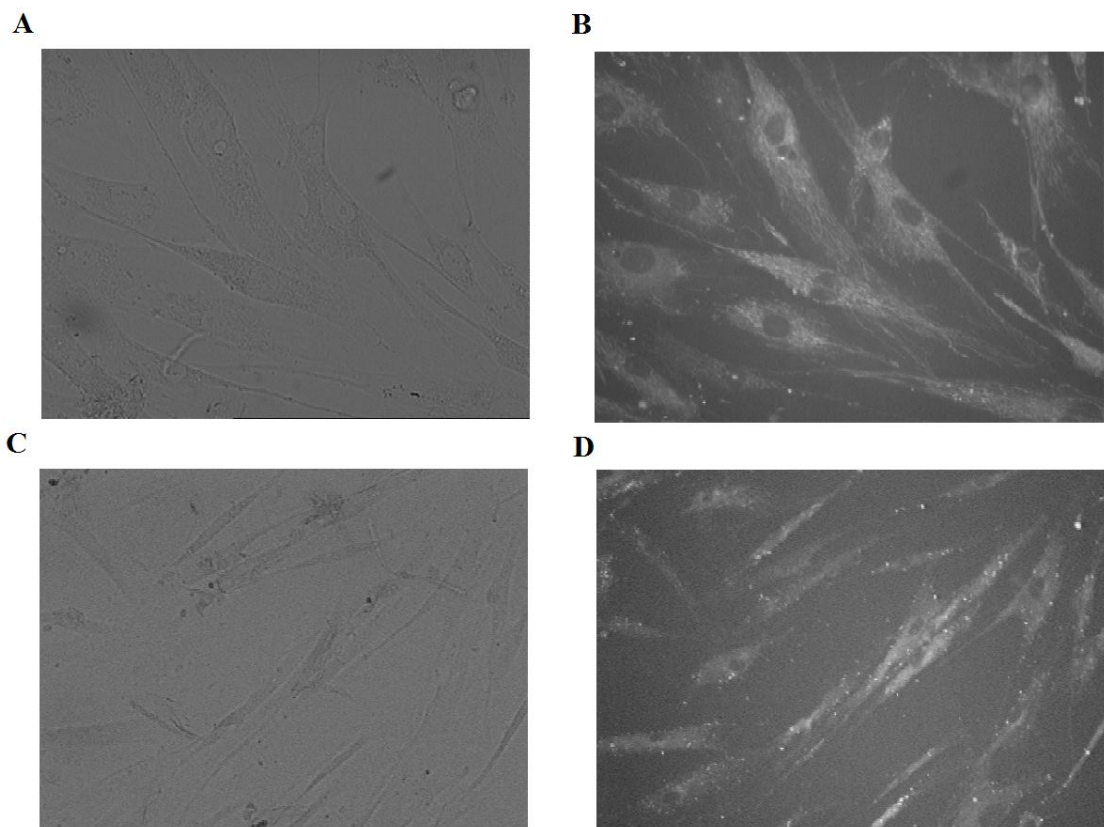


Dharmafect			Lipofectamine			X-treme Gene		
Samples	A.U.	knock-down	Samples	A.U.	knock-down	Samples	A.U.	knock-down
D+	0,329	80%	L+	0,874	46%	X+	0,667	56%
D-	1,643		L-	0,571		X-	1,36	
DB	1,683		LB	1,617		XB	1,501	

Figuur 15. Resultaat van de qPCR assay ter optimalisatie van transfectie. Controle fibroblasten werden getransfecteerd met miRNA precursoren gericht tegen het *PTK9* transcript (+), random precursoren (-) of zonder miRNA template (B). Er werden drie transfectiereagentia getest: X-treme Gene (X), Lipofectamine (L) en Dharmafect (D). Na transfectie werd de expressie van *PTK9* bepaald en genormaliseerd a.d.h.v drie referentiegenen. Het resultaat werd geanalyseerd m.b.v qBase^{PLUS}. Bovenaan een grafische weergave, waarbij per staal de expressie is uitgedrukt in *arbitrary units* (A.U). Onderaan een numerieke weergave, waarbij de procentuele knock-down werd berekend t.o.v. de blanco.

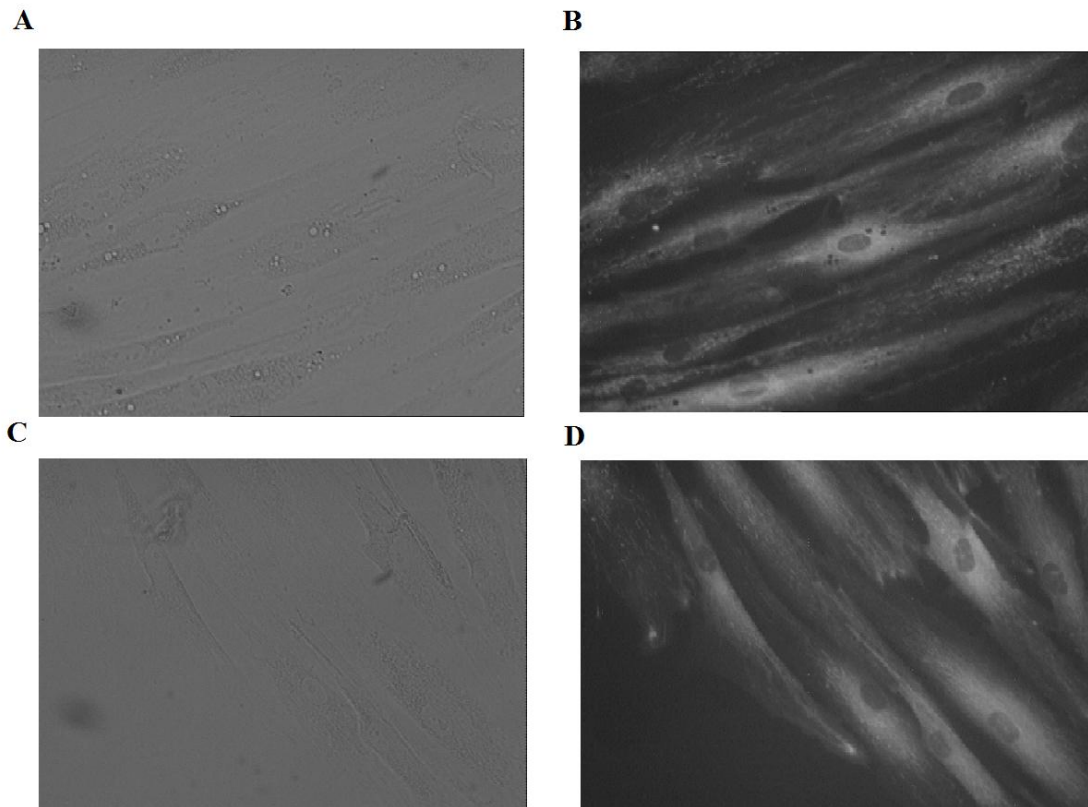
- FLUORESCENT ASSAY

Om de transfectie-efficiëntie van het Lipofectamine assay ook kwalitatief te beoordelen, werden CyTM3 fluorescent gelabeld miRNA precursor (Ambion) enerzijds en CyTM3 fluorescent gelabeld anti-miRNA (Ambion) anderzijds aan de transfectiemix toegevoegd. Het resultaat werd 24u post-transfectie geanalyseerd onder de PixCell II microscoop (Figuur 16). Deze beelden tonen een duidelijke aanwezigheid van fluorescentie in het cytoplasma van de cellen, wat erop wijst dat de fibroblasten zowel miRNA precursor als anti-miRNA efficiënt opnemen bij transfectie met Lipofectamine reagentia. Deze opname gebeurt bovendien in alle cellen die onderworpen zijn aan het transfectiemengsel. De uniforme verdeling van het signaal over het cytoplasma wijst op een goede distributie van het miRNA na opname.



Figuur 16. Resultaat van Lipofectamine transfectie van fibroblast cellen met fluorescent gelabeld miRNA. A-B: Fibroblast cellen werden getransfecteerd met CyTM3 gemerkte miRNA precursor. Beelden werden genomen met de Pixcell II microscoop, met een 40x objectief, zonder (A) en met (B) fluorescente excitatie. **C-D:** Hetzelfde werd gedaan voor CyTM3 fluorescent gelabeld anti-miRNA, opnieuw zonder (C) en met (D) excitatie.

Dit experiment werd herhaald voor het Dharmafect protocol, maar met een licht gewijzigde setup. Ten einde te controleren voor spontane opname, onafhankelijk van de transfectiemix, werden ook cellen meegenomen waaraan enkel miRNA werd toegevoegd. De beelden suggereren dat de opname bij afwezigheid van Dharmafect reagentia even efficiënt gebeurt als bij cellen die deze transfectiemix wel kregen. Deze laatste onderscheiden zich enkel door de aanwezigheid van endosomale vesikels in het cytoplasma (Figuur 17).



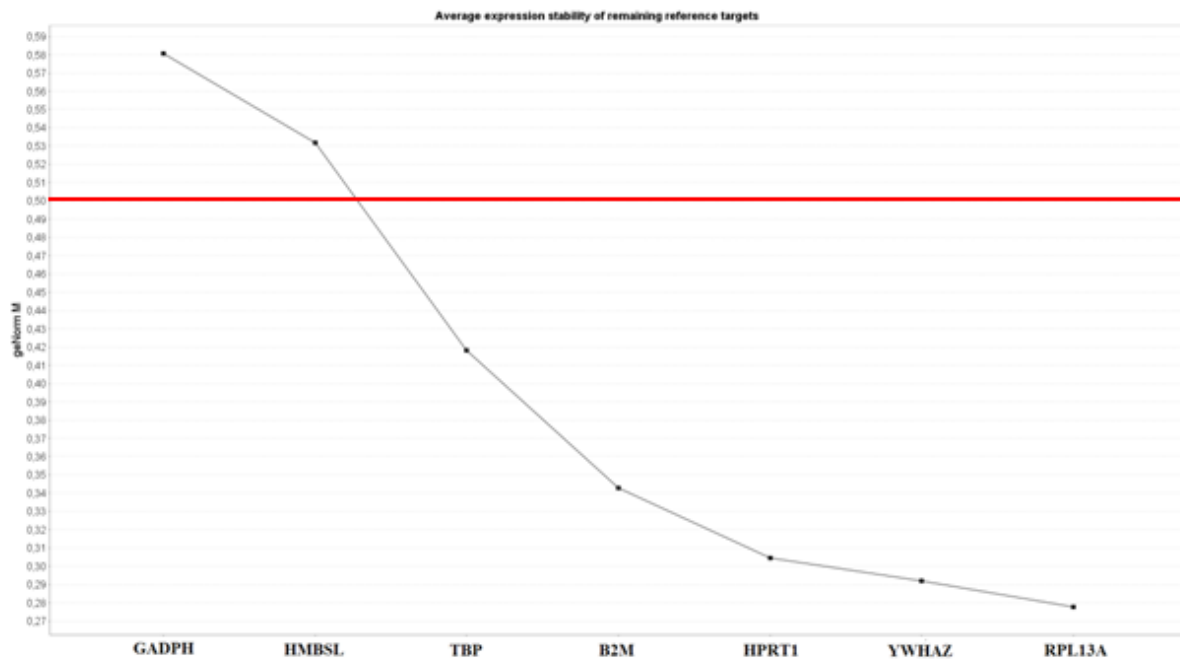
Figuur 17. Resultaat van Dharmafect transfectie van fibroblast cellen met fluorescent gelabeld miRNA. A-B: Fibroblast cellen werden getransfecteerd met CyTM3 gemerkte miRNA precursor met behulp van Dharmafect reagentia. Beelden werden genomen met de Pixcell II microscoop, met een 40x objectief, zonder (A) en met (B) fluorescente excitatie. C-D: Hetzelfde werd gedaan voor cellen waaraan enkel de CyTM3 gemerkte miRNA precursor werd toegevoegd, zonder transfectiemix, opnieuw zonder (C) en met (D) excitatie.

3.2.QPCR OPTIMALISATIE

- IDENTIFICATIE VAN OPTIMALE REFERENTIEGENEN

Om de meest geschikte referentiegenen voor normalisatie van qPCR data van fibroblasten te identificeren, werd onderzocht welke genen het stabielst tot expressie komen in controle fibroblasten. Hierbij werd cDNA van vijf verschillende stalen controle fibroblasten met behulp van 5x Roche Mastermix en specifiek ontworpen primers geamplificeerd. Volgende referentiegenen werden in het assay opgenomen: *GADPH*, *HMBSL*, *TBP*, *RPL13A*, *YWHAZ*, *HPRT1* en *B2M*. Om de resultaten te beoordelen werd de geNorm functie van het qBase^{PLUS} programma gebruikt. Dit algoritme drukt de stabiliteit van een gen uit aan de hand van een M-waarde, waarbij genen met $M < 0,5$ als stabiel mogen beschouwd worden (Vandesompele et al, 2002). De resultaten zijn weergegeven in Figuur 18. Uit de curve is op te maken dat

volgende genen aan de stabiliteits-assumptie voldoen: *TBP*, *B2M*, *HPRT1*, *YWHAZ* en *RPL13A*. De uniformiteit van de gebruikte stalen is wellicht deels verantwoordelijk voor dit hoge aantal stabiele referentiegenen. Verwacht wordt dat in een assay waarin naast controlestalen ook patiëntenstalen worden meegenomen, minder genen onder de drempel van $M < 0,5$ zullen liggen. Het is daarom aangewezen om in volgende experimenten op zijn minst de twee genen met hoogste stabiliteit te gebruiken, met name *RPL13A* en *YWHAZ*.



Figuur 18. Resultaat van de expressie analyse van referentiegenen in fibroblast cDNA. Verschillende referentiegenen werden gekwantificeerd met behulp van qPCR. De resultaten werden onderworpen aan het geNorm algoritme. De bekomen M-waarde (y-as) werd uitgezet in functie van het onderzochte gen. De $M = 0,5$ drempel-waarde is aangegeven door een rode lijn.

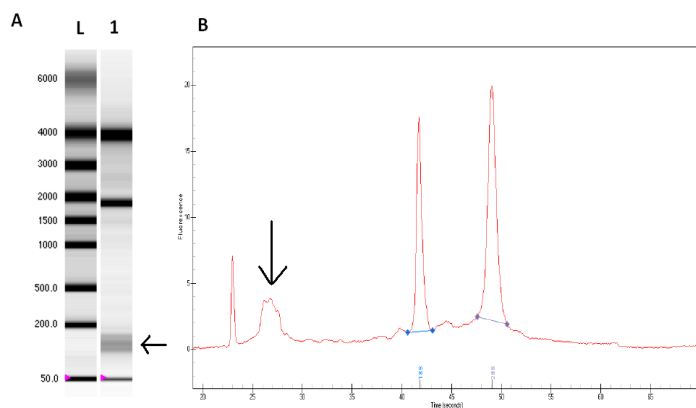
3.3. CELCULTUUR EN RNA ISOLATIE

Fibroblasten van MFS en LDS patiënten en controles werden opgegroeid in DMEM+FCS, tot confluente. Vervolgens werden deze getransfereerd naar p60 petrischalen, waar ze gedurende één week confluente werden gegroeid. Een eerder uitgevoerd testexperiment toonde immers aan dat dit relevantere resultaten oplevert dan wanneer er al bij 80 % confluente geogst wordt (data: bijlage p71). Dit tijdstip laat immers hogere productie van ECM eiwitten door de de cellen toe.

RNA werd vervolgens geïsoleerd met behulp van de miRNeasy Mini Kit (Qiagen). De concentratie werd bepaald met behulp van de Nanodrop 2000. Dit leverde telkens een voldoende hoge concentratie op om de gewenste 10 ng/μl verdunning te bekomen. De exacte concentraties per staal zijn terug te vinden in de bijlage (p70).

3.4.MIRNA KWALITEITSCONTROLE

Om na te gaan of de celcultuur en isolatiemethoden voldoende hoog kwalitatief miRNA opleveren, werd steekproefsgewijs een kwaliteitscontrole uitgevoerd. Hierbij werden RNA



Figuur 19. Resultaat van het miRNA kwaliteitscontrole experiment. In figuur A is het elektroforese gel weergegeven. L staat voor de ladder (“Experion RNA ladder”) en de 1 voor het nummer van het staal. In figuur B is het elektroferogram weergegeven. De fluorescentie in units staat in functie van de retentietijd in seconden. De miRNA fractie is telkens aangeduid met een zwarte pijl.

stalen elektroforetisch gescheiden met behulp van het Bio-rad Experion 2000 toestel. Dit maakt het mogelijk de fractie miRNA te onderscheiden van het 18S en 28S RNA. Een voorbeeld van het resultaat hiervan is weergegeven in Figuur 19. Het is duidelijk dat er een substantiële hoeveelheid miRNA aanwezig is en het piekenpatroon en kwaliteitsscore (RQI³ 9.3) duiden op een kwalitatief goed staal. Resultaten van alle stalen kunnen teruggevonden worden in de bijlage (p72)

3.5.MIRNA PROFILERING

De expressie van 754 miRNA's in de verschillende stalen werd nagegaan door middel van qPCR. Dit resulteerde per miRNA in een expressieprofiel voor elk staal. Indeling van de stalen in groepen en berekening van de gemiddelde expressie per groep liet toe om onderlinge vergelijkingen te maken. Hierbij werd de verdeling in de controle groep (n = 11) telkens vergeleken met deze in de MFS (n = 10) en LDS (n = 5) groep, die samen de TAA-groep (n = 15) vormen. Ruwe data kan teruggevonden worden in de bijlage (p99)

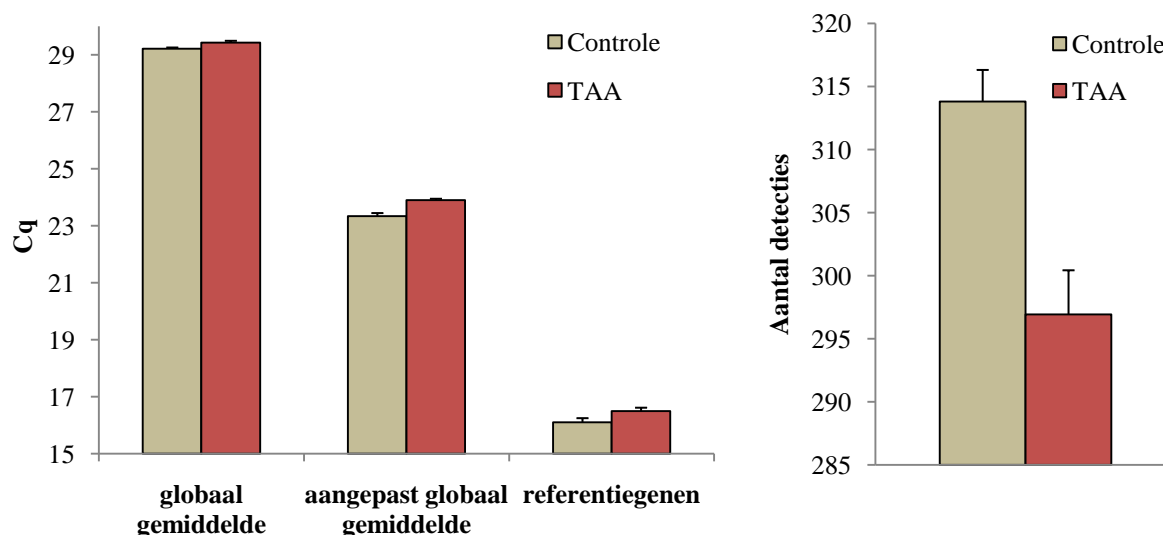
3.5.1.GLOBALE MIRNA EXPRESSIE

In een eerste stap werd nagegaan of er een verschil was in globale miRNA expressie tussen de groepen. Hierbij werd de totale hoeveelheid miRNA in elk staal op verschillende manieren geschat. Enerzijds werd geteld hoeveel keer een miRNA boven de drempelwaarde van 32 cycli uitkwam. Anderzijds werd ook de gemiddelde miRNA expressie berekend, waarbij ofwel alle miRNA's werden meegeteld (globaal gemiddelde), ofwel enkel die miRNA's die in elk staal tot expressie komen (aangepast globaal gemiddelde). Bij berekening van het globaal gemiddelde werd dan aan elk miRNA dat niet boven de drempel uitkwam een arbitraire waarde van 32 cycli toegekend. Tot slot werd ook de expressie van de RNA referentiegenen RNU44, RNU48 en U6 snRNA bepaald. De resultaten zijn weergegeven in (Tabel 1). Hier

³ RQI = RNA quality indicator. Deze waarde beoordeelt de kwaliteit van het RNA op een schaal van 0 (gedegrademd RNA) tot 10 (intact RNA)

zien we dat zowel het totale aantal gedetecteerde miRNA's, als beide types globaal gemiddelde significant verschillen tussen de controle en de TAA-groep ($p < 0.05$), waarbij telkens een grotere hoeveelheid miRNA aanwezig is in de controle groep. Dit verschil varieert van 68 % tot 86 %, naar gelang de gebruikte schatting van de totale hoeveelheid materiaal.

Tabel 1. Vergelijking van de globale gemiddelde miRNA expressie tussen de TAA en controle groep. Links: Gemiddelde Cq van resp. alle miRNA's, alle 100 % gedetecteerde miRNA's en referentiegenen, vergeleken tussen de controle en TAA groep. **Rechts:** Vergelijking van het aantal miRNA's dat per groep boven de detectielimiet uitkwam.



	Globaal gemiddelde	Aangepast globaal gemiddelde	Gemiddelde expressie referentiegenen	Gemiddeld aantal detecties
Controle	29,206	23,333	16,095	313,818
TAA	29,421	23,890	16,486	296,933
Fold change	0,861	0,680	0,763	-
p-waarde	0,028	0,021	0,175	0,009

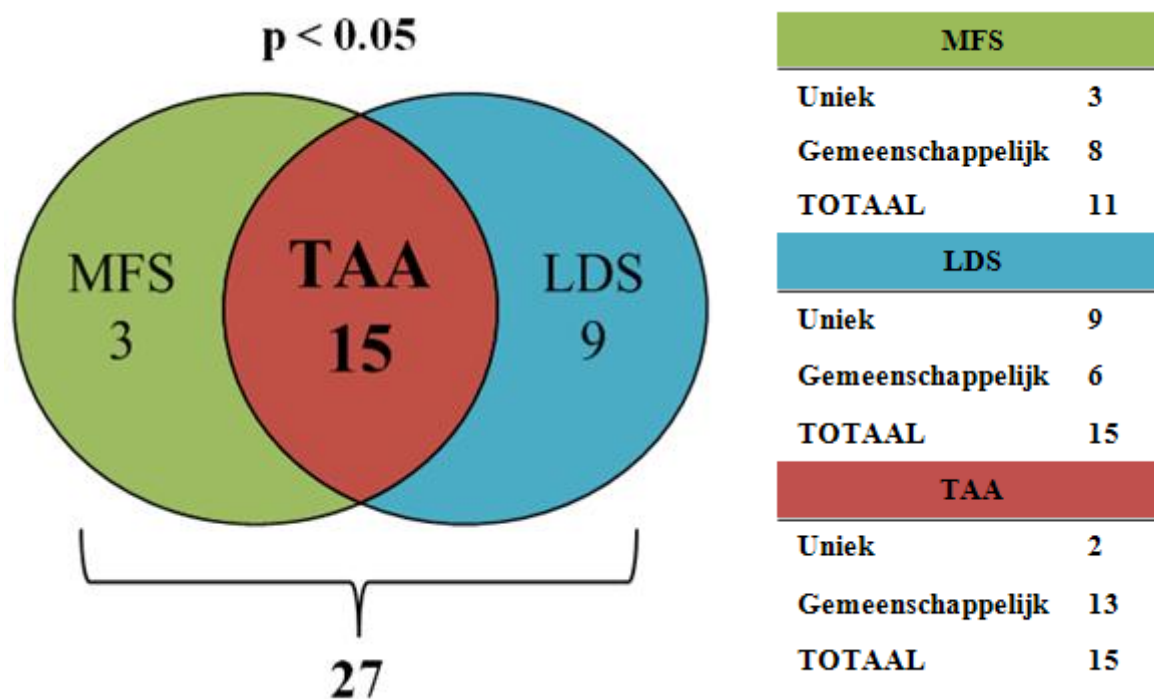
3.5.2. SPECIFIEKE MIRNA EXPRESSIE

Om de expressie van elk miRNA species apart te onderzoeken, werd gecorrigeerd voor het globale verschil door gebruik te maken van een normalisatiestap. Hierbij werd van elke Cq-waarde het aangepast globaal gemiddelde per staal afgetrokken en het teken omgewisseld, wat resulteert in genormaliseerde waarden, die onderlinge vergelijkingen in miRNA expressie toelaten. Om het optimale type teststatistiek te bepalen, werd eerst een Kolmogorov–Smirnov test toegepast, die nagaat of de waarden een normale verdeling volgen. Aangezien dit voor alle miRNA's het geval was, werd geopteerd voor een onafhankelijke student t-test. Hierbij werd per miRNA nagegaan of de nulhypothese H_0 mocht verworpen worden ten voordele van de alternatieve hypothese H_A , waarbij

H_0 = bovenop het globale verschil, is er geen verschil in miRNA expressie naar gelang de beschouwde groepen.

H_A = bovenop het globale verschil, is er een verschil in miRNA expressie naar gelang de beschouwde groepen.

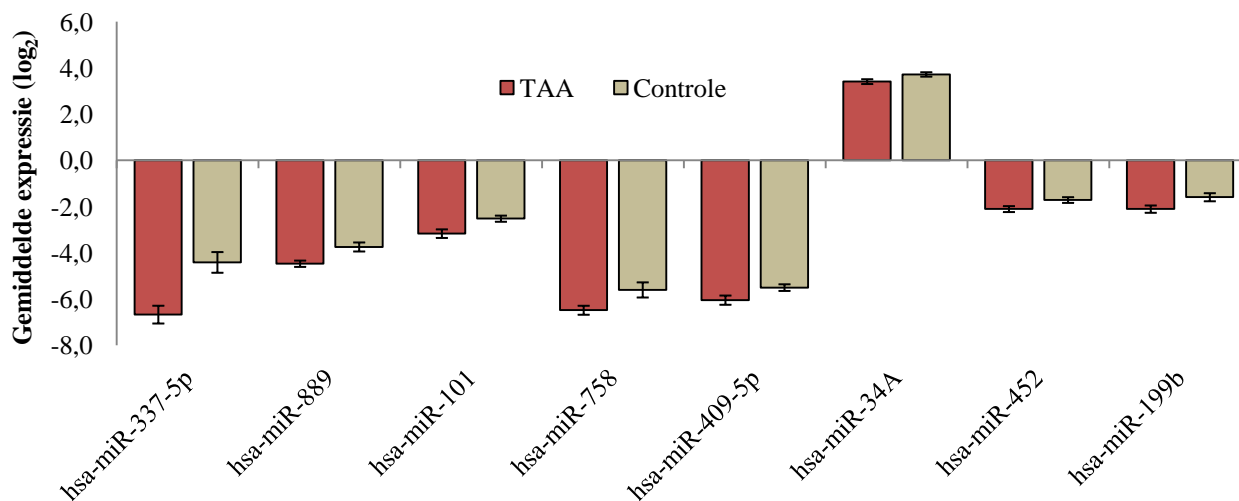
Dit resulteerde in een lijst van 15 miRNA's die een significant verschil ($p < 0.05$) in expressie vertonen tussen de controle- en de TAA-groep (Tabel 2). Wanneer deze laatste werd opgesplitst in een MFS- en een LDS-groep, kwamen grotendeels dezelfde miRNA's naar boven, aangevuld met enkele species die specifiek zijn voor één van beide aandoeningen (Figuur 20). 11 miRNA's bij MFS (Tabel 3) en 15 bij LDS (Tabel 4) zijn significant verschillend geëxprimeerd vergeleken met de controles, waarbij resp. 3 en 9 miRNA's uniek zijn per aandoening. Deze laatste brengen het totale aantal op 27 miRNA's die een significant verschil ($p < 0.05$) in expressie vertonen in de verschillende patiëntengroepen, vergeleken met de controles. Toepassing van een multiple testing correctie op de p-waarden, volgens de methode van Benjamini & Hochberg (Green & Diggle, 2007), leverde per miRNA een q-waarde op, die de *False Discovery Rate* (FDR) aangeeft⁴. Door deze omzetting konden slechts twee miRNA's uit de LDS-groep nog significantie bereiken ($q < 0.05$), wat op een lage betrouwbaarheid van de resultaten wijst.



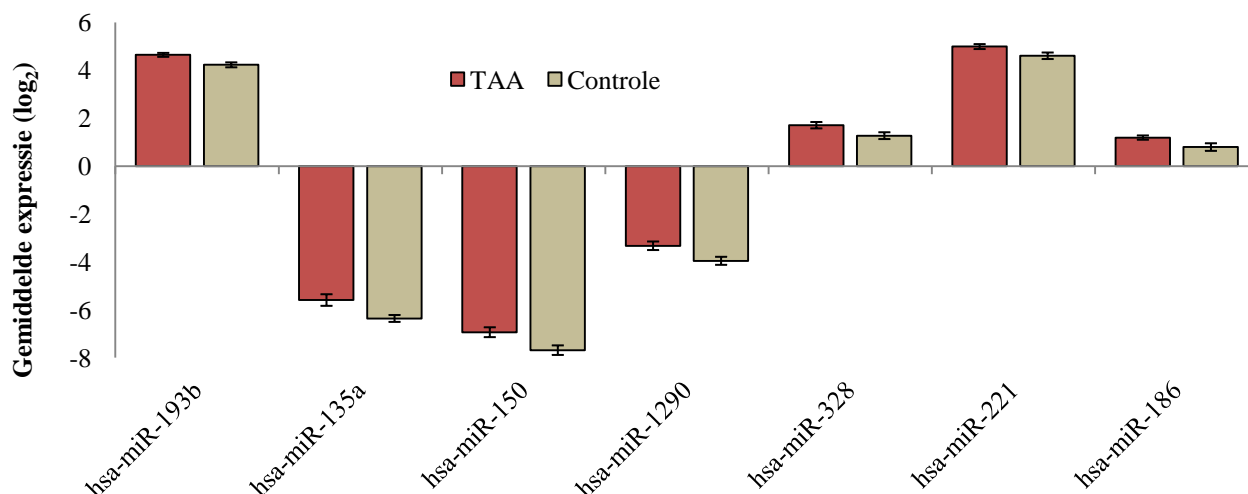
Figuur 20. Diagram van alle miRNA's die een p-waarde bereikten < 0.05 bij vergelijking van de gemiddelde expressie in patiëntgroepen met de controlegroep. Links: Venn-diagram, waarbij alle unieke significante miRNA's uit de MFS (3) en LDS (9) groepen en alle gemeenschappelijke miRNA's uit de TAA-groep (15) opgeteld werden en samen het totale aantal significant verschillend geëxprimeerde miRNA's vormen (27). Rechts een gedetailleerd overzicht per groep.

⁴ De FDR drukt de kans uit op het maken van een type I fout, m.a.w het incorrect verwerpen van de nulhypothese.

Tabel 2. Vergelijking van de gemiddelde expressie van verschillende miRNA's tussen de TAA en controle groep. miRNA's waarvan de gemiddelde relatieve expressie significant verschillend is tussen de TAA en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde. **Boven:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **downgereguleerd** zijn in de TAA-groep. **Onder:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **opgereguleerd** zijn in de TAA-groep.

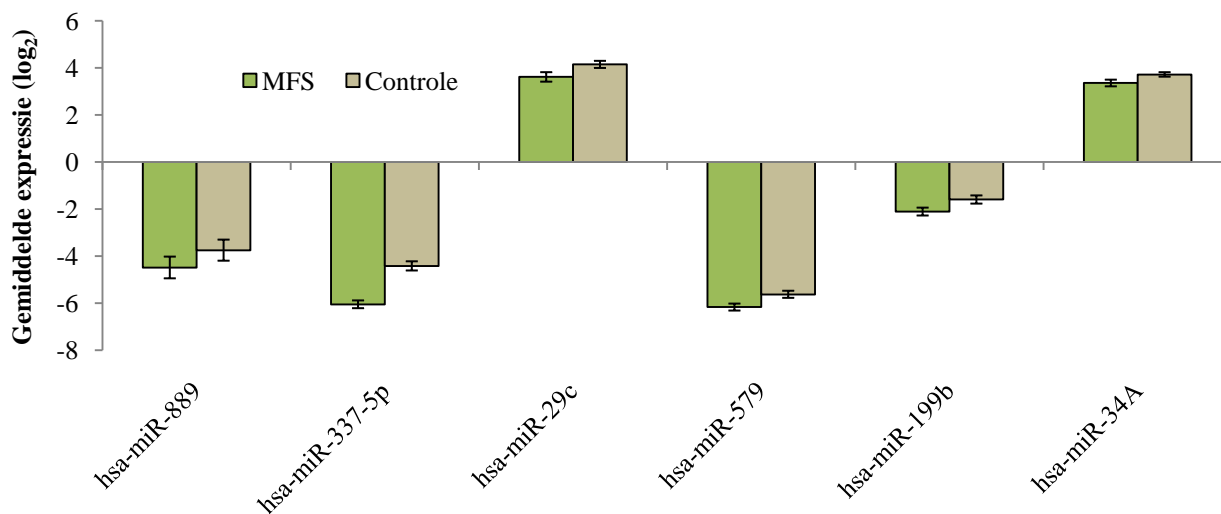


miRNA	TAA	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-337-5p	- 6,67	- 4,41	0,21	0,00093	0,238
hsa-miR-889	- 4,47	- 3,75	0,60	0,00651	0,558
hsa-miR-101	- 3,17	- 2,52	0,64	0,00930	0,597
hsa-miR-758	- 6,48	- 5,61	0,54	0,03391	0,723
hsa-miR-409-5p	- 6,05	- 5,50	0,69	0,03701	0,723
hsa-miR-34A	3,41	3,72	0,81	0,03727	0,723
hsa-miR-452	- 2,11	- 1,72	0,76	0,03854	0,723
hsa-miR-199b	- 2,11	- 1,59	0,70	0,03940	0,723

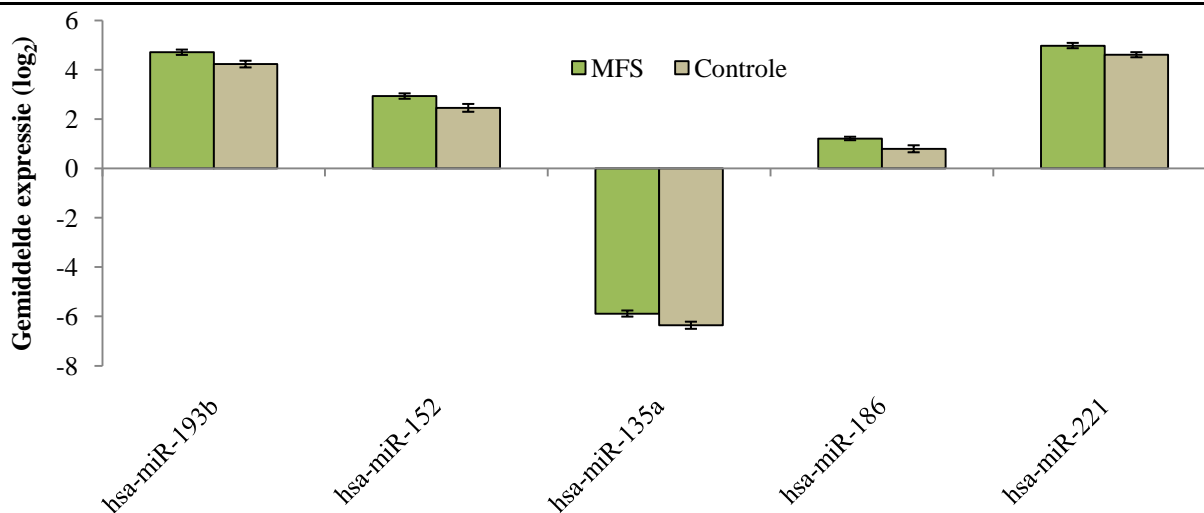


miRNA	TAA	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-193b	4,65	4,23	1,34	0,00486	0,558
hsa-miR-135a	- 5,59	- 6,36	1,70	0,01247	0,622
hsa-miR-150	- 6,94	- 7,69	1,68	0,01532	0,622
hsa-miR-1290	- 3,33	- 3,95	1,55	0,01694	0,622
hsa-miR-328	1,71	1,27	1,35	0,03535	0,723
hsa-miR-221	4,99	4,61	1,30	0,03591	0,723
hsa-miR-186	1,19	0,79	1,32	0,04488	0,737

Tabel 3. Vergelijking van de gemiddelde expressie van verschillende miRNA's tussen de MFS en controle groep. miRNA's waarvan de gemiddelde relatieve expressie significant verschillend is tussen de MFS en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde. **Boven:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **downgereguleerd** zijn in de MFS-groep. **Onder:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **opgereguleerd** zijn in de MFS-groep.

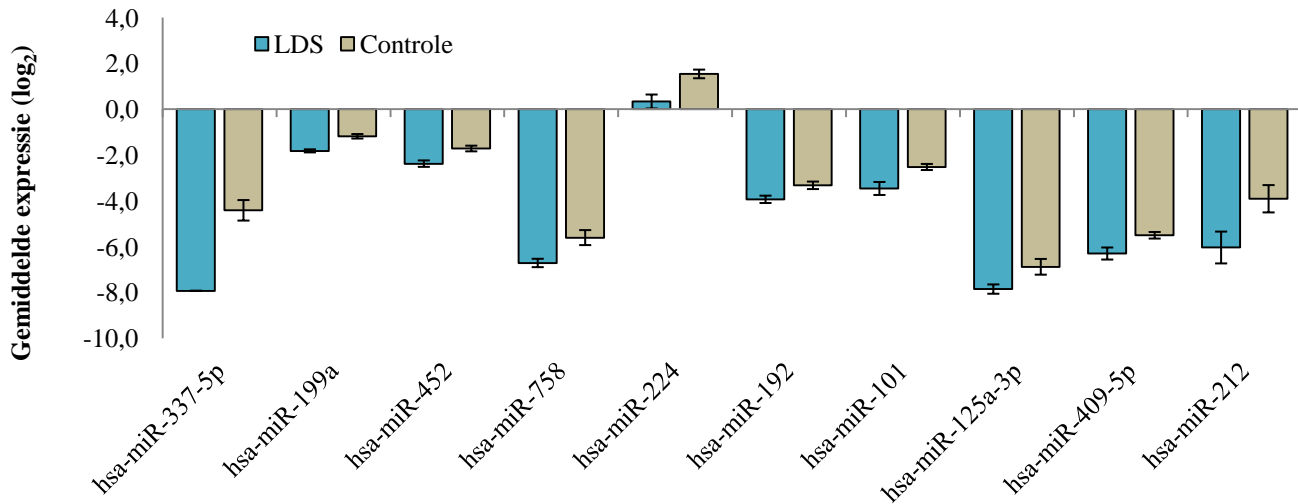


miRNA	MFS	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-889	- 4,48	- 3,75	0,60	0,00965	0,826
hsa-miR-337-5p	- 6,05	- 4,41	0,32	0,02014	0,910
hsa-miR-29c	3,61	4,14	0,69	0,02093	0,910
hsa-miR-579	- 6,16	- 5,62	0,69	0,04565	0,910
hsa-miR-199b	- 2,11	- 1,59	0,70	0,04735	0,910
hsa-miR-34A	3,35	3,72	0,78	0,04911	0,910

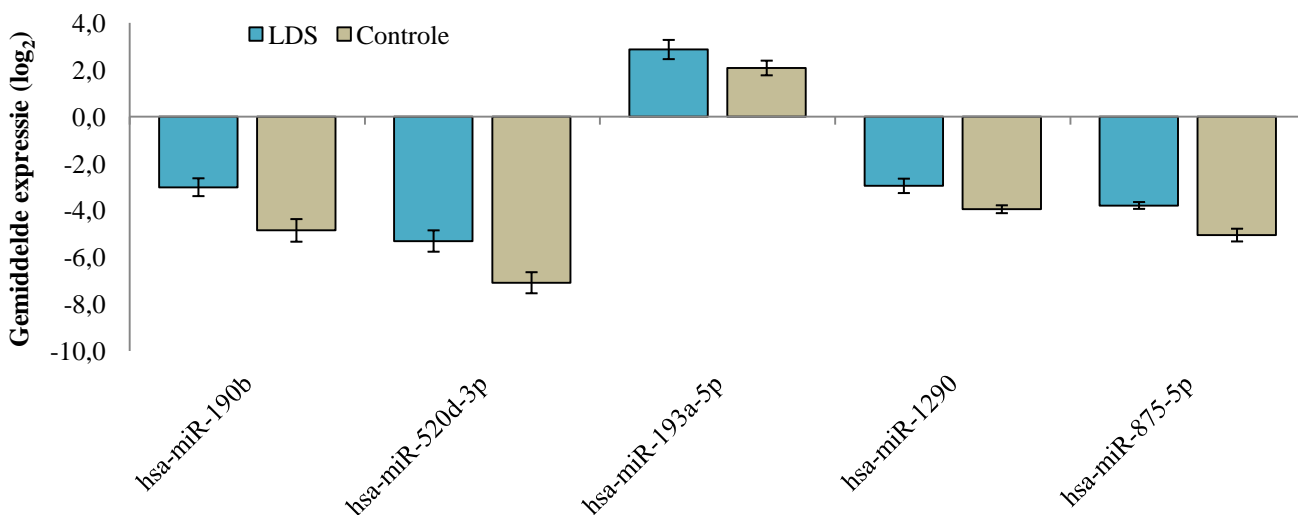


miRNA	MFS	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-193b	4,71	4,23	1,40	0,00466	0,826
hsa-miR-152	2,93	2,45	1,39	0,00887	0,826
hsa-miR-135a	- 5,89	- 6,36	1,39	0,02202	0,910
hsa-miR-186	1,21	0,79	1,34	0,04482	0,910
hsa-miR-221	4,98	4,61	1,29	0,04530	0,910

Tabel 4. Vergelijking van de gemiddelde expressie van verschillende miRNA's tussen de LDS en controle groep. miRNA's waarvan de gemiddelde relatieve expressie significant verschillend is tussen de LDS en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde. **Boven:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **downgereguleerd** zijn in de LDS-groep. **Onder:** miRNA's die, bovenop de globale downregulatie, **opgereguleerd** zijn in de LDS-groep.

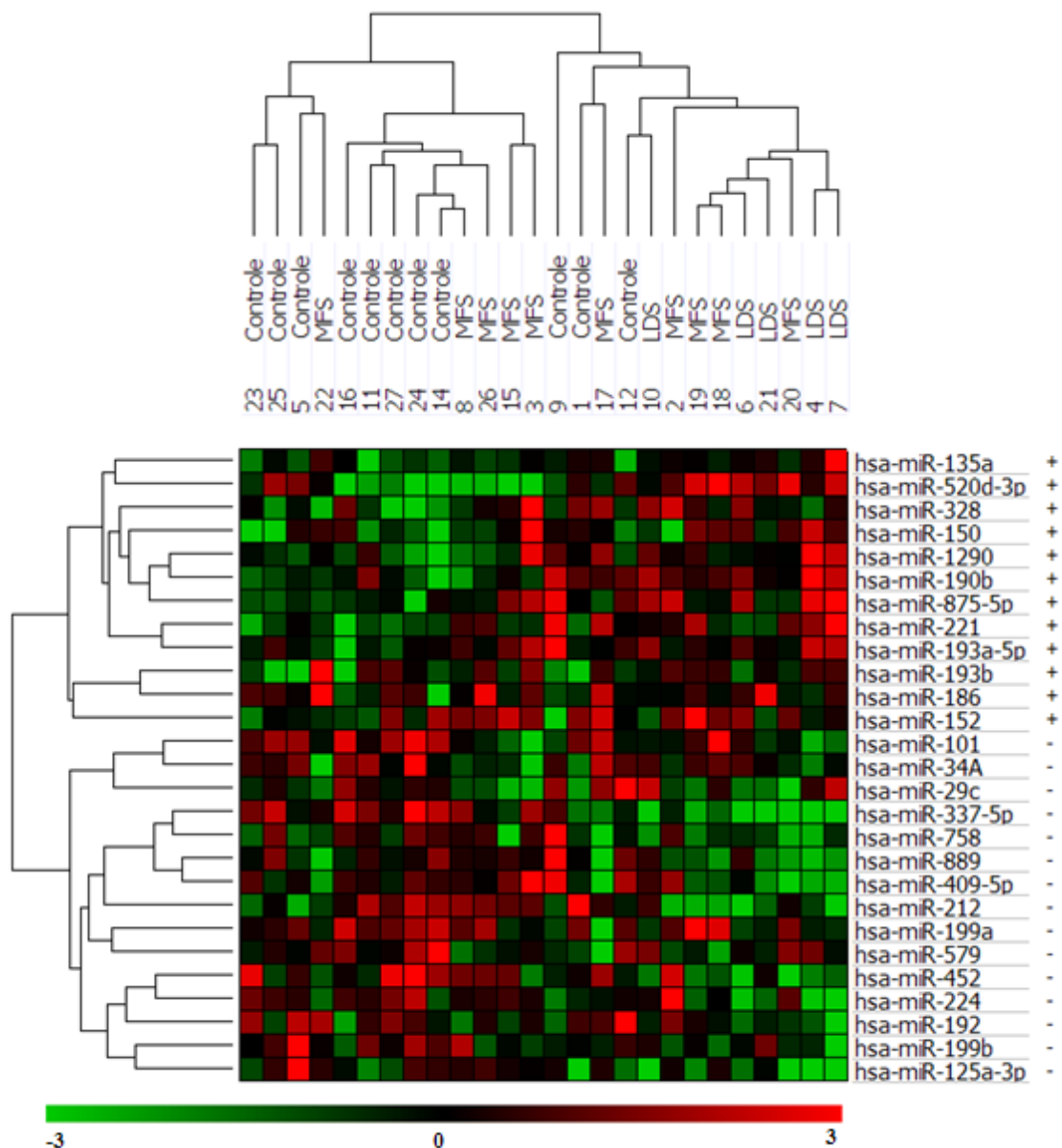


miRNA	LDS	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-337-5p	- 7,93	- 4,41	0,09	0,00001	0,004
hsa-miR-199a	- 1,82	- 1,18	0,64	0,00010	0,013
hsa-miR-452	- 2,38	- 1,72	0,63	0,00533	0,456
hsa-miR-758	- 6,71	- 5,61	0,46	0,01057	0,488
hsa-miR-224	0,34	1,54	0,43	0,01139	0,488
hsa-miR-192	- 3,93	- 3,32	0,65	0,02084	0,619
hsa-miR-101	- 3,46	- 2,52	0,52	0,02492	0,619
hsa-miR-125a-3p	- 7,85	- 6,88	0,51	0,02891	0,619
hsa-miR-409-5p	- 6,30	- 5,50	0,58	0,03495	0,638
hsa-miR-212	- 6,04	- 3,91	0,23	0,04271	0,638



miRNA	LDS	Controle	Fold change	p-waarde	q-waarde
hsa-miR-190b	- 3,01	- 4,86	3,59	0,00999	0,488
hsa-miR-520d-3p	- 5,31	- 7,09	3,43	0,01756	0,619
hsa-miR-193a-5p	2,86	2,07	1,73	0,02317	0,619
hsa-miR-1290	- 2,96	- 3,95	2,00	0,02650	0,619
hsa-miR-875-5p	- 3,79	- 5,06	2,40	0,03698	0,638

Wanneer de 27 significant verschillend geëxprimeerde miRNA's en alle stalen onderworpen werden aan een clustering algoritme, bleek dat de stalen op basis van hun expressieprofiel in twee grote groepen opgedeeld zijn. Deze verdeling reflecteert echter slechts deels het onderliggende genotype. Vijf MFS stalen werden in een "controle-tak" ondergebracht, terwijl drie controlestalen beter met de patiëntgroep correleren. Voor de overige zestien stalen leidde het expressieprofiel wel tot clustering met stalen van een gelijkaardig genotype. De miRNA's zelf clusteren eveneens in twee onderscheidbare groepen, waarbij miRNA species die upgereguleerd zijn in de patiëntgroep correleren en zich onderscheiden van deze die downgereguleerd zijn (Figuur 21).



Figuur 21. Hiërarchische clustering van de stalen en de 27 miRNA's die significante verschillen in expressie vertonen tussen de controle en patiënt groepen. miRNA expressiewaarden zijn voor elke rij genormaliseerd en gevisualiseerd door een kleurencode, waarbij groen staat voor relatief lage expressie en rood voor relatief hoge expressie t.o.v het gemiddelde per miRNA. **Bovenaan** een dendrogram die de correlatie van de stalen weergeeft. **Links** een dendrogram die de correlatie van de miRNA's weergeeft. **Rechts** de naam van elke miRNA, vergezeld van een symbool, waarbij "+" staat voor relatieve opregulatie in de TAA-groep en "-" voor relatieve downregulatie in de TAA-groep.

Tabel 5. Overzicht van miRNA's die significantie bereikten in één van de onderzochte patiëntgroepen, samen met hun voorspelde targets. miRNA's werden gerangschikt volgens p-waarde bij vergelijking tussen de controle- en TAA-groep. Doelwitgenen die in de miRDB database werden geïdentificeerd zijn eveneens weergegeven en gesorteerd volgens hun predictiescore. Bevestiging van predictie door overige databasen werd aangeduid met een ✓-symbool.

miRNA	miRDB		Score	overige db's							
	Doelwitgen	Beschrijving		Targetscan	Targetscan_cons	DIANA	PTA	MicroCosm	Tarbase	miRecords	RNA22 (3UTR)
hsa-miR-889	<i>EREG</i>	epiregulin	98	✓		✓	✓				
	<i>PHF6</i>	PHD finger protein 6	96	✓		✓	✓	✓			
	<i>MIPOL1</i>	mirror-image polydactyly 1	96	✓		✓	✓				
	<i>SMAD2</i>	SMAD family member 2	88	✓		✓	✓				
	<i>SMAD5</i>	SMAD family member 5	81	✓	✓	✓	✓				
hsa-miR-101	<i>TGFBR1</i>	transforming growth factor, beta receptor 1	98	✓		✓	✓				
	<i>FBN2</i>	fibrillin 2	75	✓		✓	✓	✓			✓
hsa-miR-135a	<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2	98	✓	✓	✓					
	<i>ENTPD7</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	97	✓		✓	✓				
	<i>GK5</i>	glycerol kinase 5 (putative)	95			✓					
hsa-miR-758	<i>FBN1</i>	fibrillin 1	76	✓	✓	✓	✓				
hsa-miR-452	<i>ANGPT2</i>	angiopoietin 2	92	✓		✓					
	<i>COL23A1</i>	collagen, type XXIII, $\alpha 1$	85	✓	✓	✓	✓				
	<i>SMAD2</i>	SMAD family member 2	84	✓		✓	✓				
	<i>TIMP2</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	82	✓	✓	✓	✓				
	<i>TET3</i>	tet oncogene family member 3	100			✓					
hsa-miR-29c	<i>COL3A1</i>	collagen, type III, $\alpha 1$	99	✓		✓	✓	✓	✓		
	<i>ATAD2B</i>	ATPase family, AAA domain containing 2B	99			✓	✓				
	<i>COL11A1</i>	collagen, type XI, $\alpha 1$	92			✓	✓	✓			✓
	<i>FBN1</i>	fibrillin 1	91			✓	✓	✓			
	<i>COL4A5</i>	collagen, type V, $\alpha 5$	88			✓	✓	✓			
	<i>COL4A4</i>	collagen, type IV, $\alpha 4$	88			✓	✓				
	<i>COL5A1</i>	collagen, type V, $\alpha 1$	80			✓	✓				
	<i>COL4A1</i>	collagen, type IV, $\alpha 1$	79			✓	✓	✓			✓
	<i>ELN</i>	elastin	78			✓	✓				

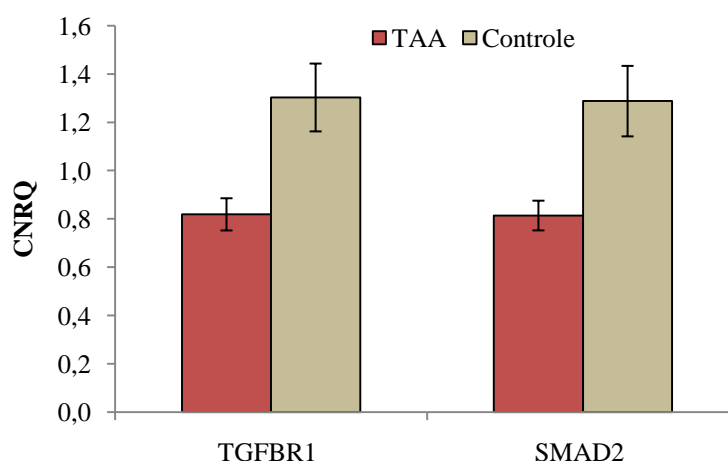
3.5.3. DOELWITGEN PREDICTIE

De 27 verschillend geëxprimeerde miRNA's werden onderworpen aan bio-informatische analyse, waarbij via verschillende algoritmes werd onderzocht welke doelwitgenen deze mogelijk beïnvloeden. Dit leidde tot een reeks doelwitgenen per miRNA, die op basis van het miRDB algoritme een bepaalde targetscore toegewezen kregen. Filtering van deze resultaten op basis van hoge targetscore en lage p-waarde, leverde een lijst op van zes miRNA's en hun respectievelijke targets (Tabel 5).

3.5.4. DOELWITGEN EXPRESSIE

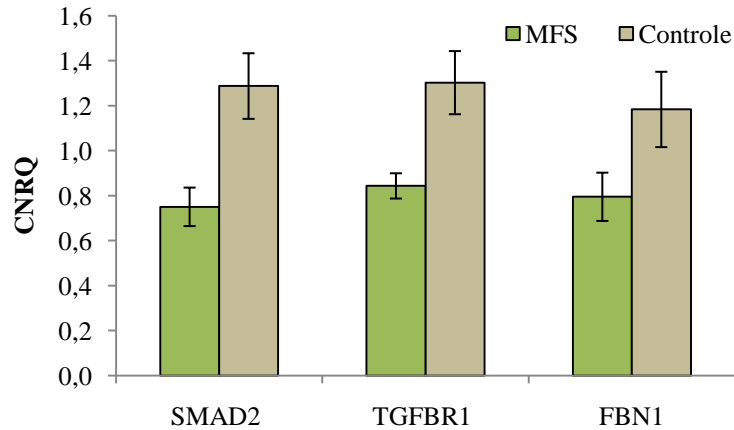
De expressie van de volgende potentiële doelwitgenen werd geanalyseerd met behulp van qPCR: SMAD2, TGFBR1, FBN1, CAPN2, COL1A2, COL5A1, TGFI2, SMAD5, TIMP2, PPM1A, FBN2, COL3A1, ELN en ITGA3. Na kwantificatie en vergelijking van de resultaten tussen de controle- en de patiëntgroepen (MFS, LDS, TAA), bleken enkele genen een significant verschil ($p < 0.05$) in expressie te vertonen naar gelang de beschouwde groep. Bij vergelijking van de controles met de volledige TAA-groep, gaat het hier om *TGFBR1* en *SMAD2* (Tabel 6), terwijl ook *FBN1* naar boven kwam wanneer enkel de MFS-groep werd beschouwd (Tabel 7). In de LDS-groep bleken dan weer *PPM1A* en *TGFBR1* een significant verschil ($p < 0.05$) in expressie te vertonen vergeleken met de controles (Tabel 8). Al deze genen zijn downgereguleerd in de patiëntengroepen, waarbij de fold change varieert tot 0,6891 (*SMAD2*, MFS). Gekalibreerde en genormaliseerde relatieve gemiddeldes (CNRQ, *Calibrated Normalized Relative Quantity*) voor elk staal kunnen teruggevonden worden in de bijlage (p110). In de nabije toekomst is ook kwantificatie van volgende genen gepland: EREG, PHF6, MIPOL1, TET3, ATAD2B, ANGPT2, ENTPD7 en GK5. Deze experimenten konden echter niet meer opgenomen worden in dit project.

Tabel 6. Vergelijking van de gemiddelde expressie van potentiële miRNA doelwitgenen tussen de controle en TAA groep. Genen waarvan de gemiddelde genormaliseerde expressie (CNRQ) significant verschillend is tussen de TAA en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde.



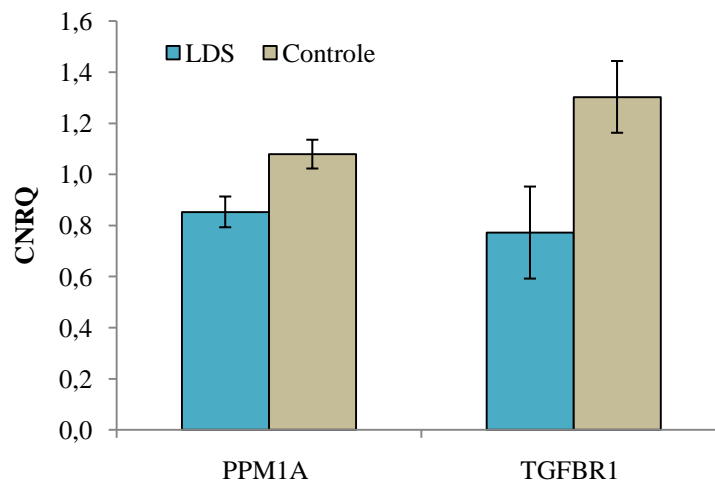
Gen	TAA	Controle	Fold change	p-waarde
TGFBR1	0,8189	1,3027	0,7151	0,0041
SMAD2	0,8140	1,2876	0,7201	0,0049

Tabel 7. Vergelijking van de gemiddelde expressie van potentiële miRNA doelwitgenen tussen de controle en MFS groep. Genen waarvan de gemiddelde genormaliseerde expressie (CNRQ) significant verschillend is tussen de MFS en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde



Gen	MFS	Controle	Fold change	p-waarde
SMAD2	0,7505	1,2876	0,6891	0,0031
TGFBR1	0,8435	1,3027	0,7274	0,0035
FBN1	0,7951	1,1836	0,7639	0,0395

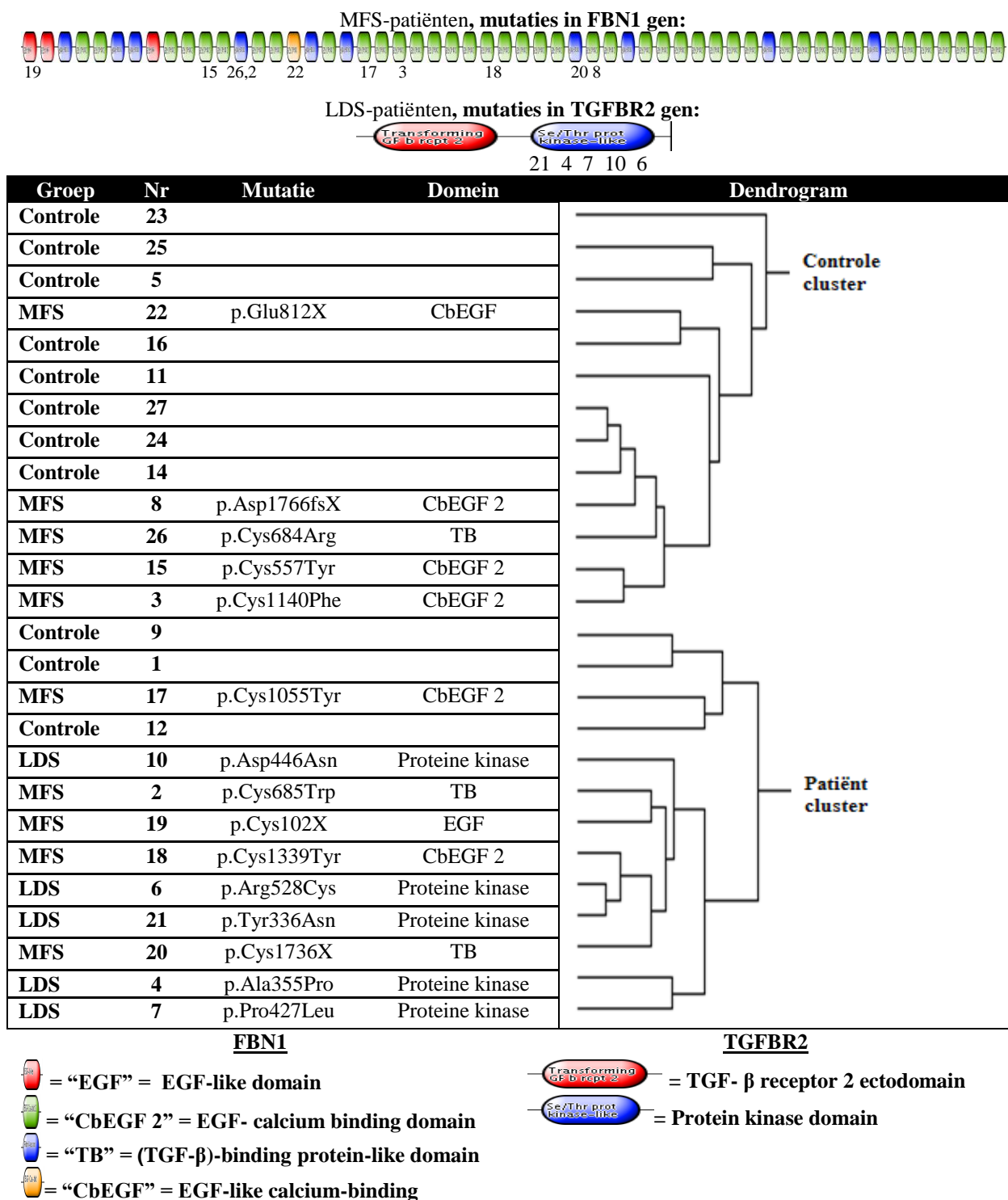
Tabel 8. Vergelijking van de gemiddelde expressie van potentiële miRNA doelwitgenen tussen de controle en LDS groep. Genen waarvan de gemiddelde genormaliseerde expressie (CNRQ) significant verschillend is tussen de LDS en controle groep, gerangschikt volgens p-waarde



Gen	LDS	Controle	Fold change	p-waarde
PPM1A	0,8527	1,0788	0,8550	0,0268
TGFBR1	0,7718	1,3027	0,6921	0,0431

3.6. GEÏNTEGREERDE RESULTATEN

Om het maken van conclusies op basis van alle resultaten te vergemakkelijken, werden enkele van de voorgaande resultaten samengezet en grafisch weergegeven. Zo geeft Figuur 22 een vergelijking weer tussen de resultaten van de clustering (Figuur 21) en het onderliggende genotype van de stalen, waarbij zowel het type mutatie als het soort domein zijn aangegeven.

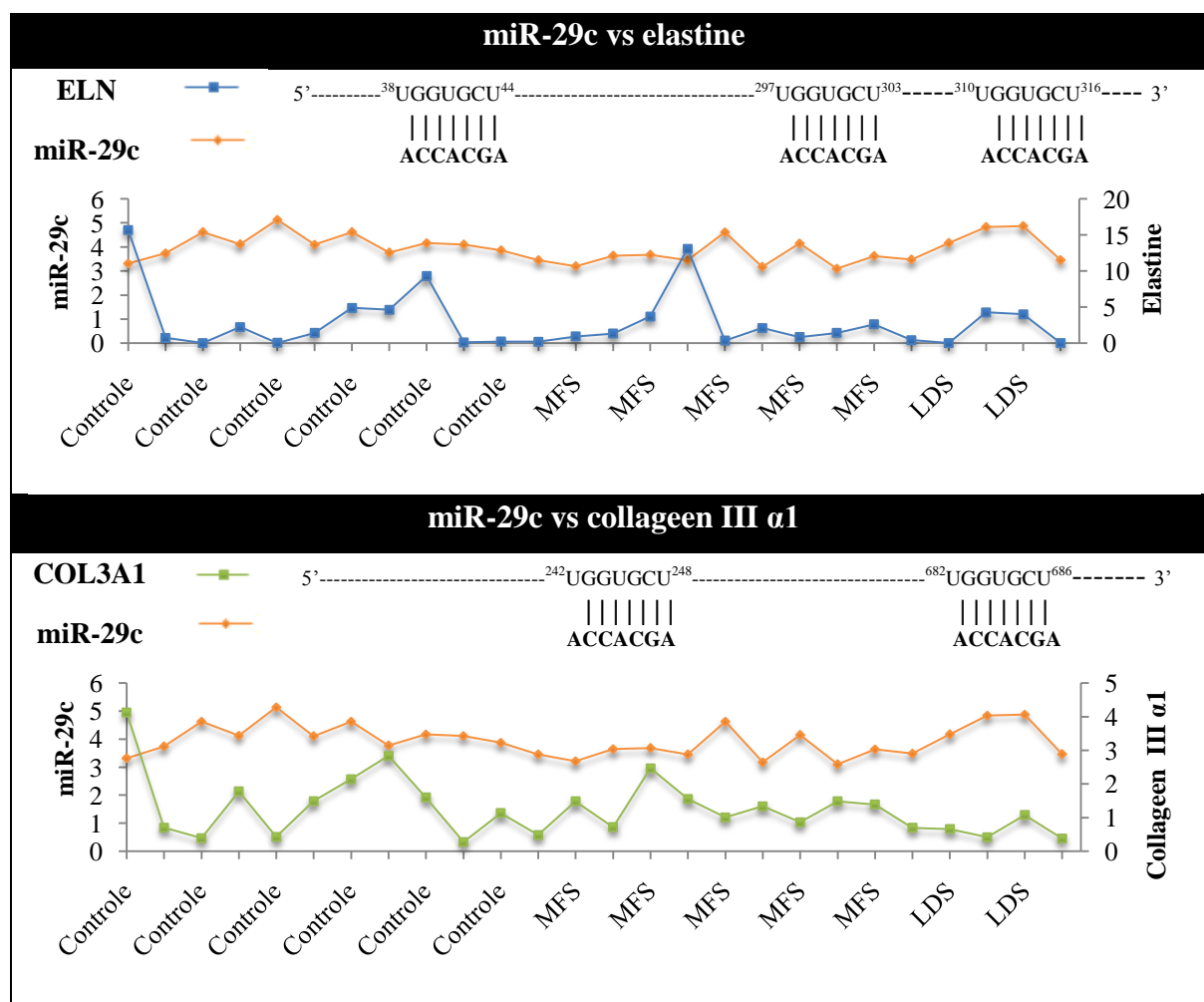


Figuur 22. Het verband tussen genotype en miRNA expressieprofiel. Stalen werden op basis van hun miRNA expressieprofiel in hiërarchische clusters onderverdeeld. Bovenstaande figuur linkt de positie in de cluster met het type mutatie en het domein waarin deze mutatie voorkomt. Bovenaan een schematische weergave van de FBN1 en TGFBR2 eiwitten, waarbij de gekleurde cirkels de verschillende structurele domeinen vertegenwoordigen (zie legende). Deze consensus structuur is afkomstig uit de InterPro database. De getallen onder de domeinen komen overeen met het staaln�, en tonen voor elk staal op welke positie de mutatie voorkomt.

Daarnaast werden voor enkele miRNA species ook de resultaten van de miRNA profilering, doelwitgen mRNA expressie en bio-informatische predictie geïntegreerd weergegeven. Dit laat toe een vergelijking te maken tussen de resultaten die *in silico* werden gegenereerd, met wat de *in vitro* experimenten opleverden. Deze samenvattende resultaten zijn weergegeven voor hsa-miR-29c (Figuur 23) en voor hsa-miR-889 (Figuur 24). Beide figuren tonen aan dat er nauwelijks correlatie is tussen miRNA expressie en de doelwitgen mRNA expressie, ondanks de voorspelde interactie tussen deze moleculen op basis van de aanwezige hybridisatiesites.

miR-29c

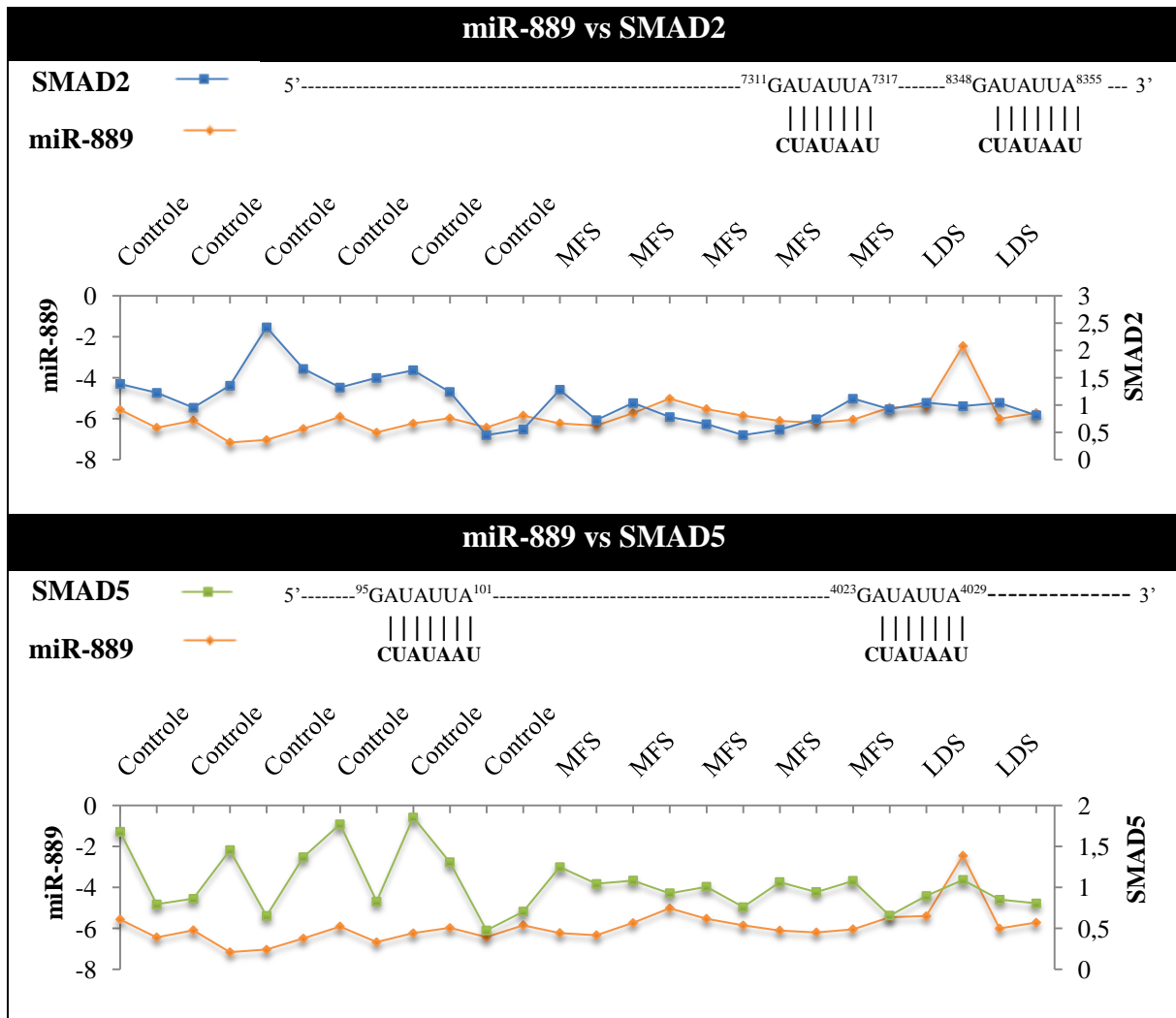
3'AUUGGCUAAAGUCU**ACCACGA**U 5'



Figuur 23. Het effect van miR-29c op *ELN* en *COL3A1*. Bovenaan: de mature sequentie van het hsa-miR-29c miRNA, waarbij de *seed* regio te herkennen is aan het grotere lettertype. Midden: het effect van miR-29c op *ELN*: 3'UTR van *ELN* en de *seed* regio van miR-29c zijn weergegeven, waarbij is ingezoomd op de hybridisatiesites. Op de grafiek is voor alle 26 stalen de gemiddelde miRNA expressie uitgezet op de linker y-as, terwijl de mRNA expressie is uitgezet op de rechter y-as. Onder: het effect van miR-29c op *COL3A1*: 3'UTR van *COL3A1* en de *seed* regio van miR-29c zijn weergegeven, waarbij is ingezoomd op de hybridisatiesites. Op de grafiek is voor voor alle 26 stalen de gemiddelde miRNA expressie uitgezet op de linker y-as, terwijl de mRNA expressie is uitgezet op de rechter y-as.

miR-889

3'UGUUACCAACAGGCUAUAAU_U 5'



Figuur 24. Het effect van miR-889 op SMAD2 en SMAD5. Bovenaan: de mature sequentie van het 889 miRNA, waarbij de *seed* regio te herkennen is aan het grotere lettertype. **Midden:** het effect van miR-889 op SMAD2: De 3'UTR van SMAD2 en de seed regio van miR-889 zijn weergegeven, waarbij is ingezoomd op de hybridisatiesites. Op de grafiek is voor alle 26 stalen de gemiddelde miRNA expressie uitgezet op de linker y-as, terwijl de mRNA expressie is uitgezet op de rechter y-as. **Onder:** het effect van miR-889 op SMAD5: De 3'UTR van SMAD5 en de seed regio van miR-889 zijn weergegeven, waarbij is ingezoomd op de hybridisatiesites. Op de grafiek is voor alle 26 stalen de gemiddelde miRNA expressie uitgezet op de linker y-as, terwijl de mRNA expressie is uitgezet op de rechter y-as.

Deel 4:DISCUSSIE

4.1.EXPRESSIE ANALYSE

Een TAA is het resultaat van een pathogene remodelering van de aorta vaatwand, die door een veelvoud aan factoren kan veroorzaakt worden. In 20 % van de gevallen ligt een genetische mutatie aan de basis van deze aandoening. MFS en LDS patiënten hebben door defecten in verschillende genproducten een sterk verhoogde predispositie tot het ontwikkelen van TAA's. Het moleculaire mechanisme waarop deze mutaties aanleiding geven tot aneurysma's is intussen deels opgehelderd. De pathogenese wordt gekenmerkt door een verzameling van structurele, cellulaire en regulatorische perturbaties, met als drijfveer een verhoogde TGF- β signalisatie. Gezien de grote impact van miRNA op genexpressie en het feit dat deze regulatorische moleculen reeds in verschillende aandoeningen zoals kanker of fibrose aan bod kwamen, werd vermoed dat miRNA's ook in de ontwikkeling van TAA's een belangrijke rol vertolken. Om deze hypothese te onderzoeken werd een grootschalige miRNA profilering uitgevoerd op miRNA afkomstig uit fibroblasten van MFS en LDS patiënten enerzijds, en gezonde controle individuen anderzijds. Kwantificatie van 754 humane miRNA's en vergelijking van deze aantallen tussen de vooropgestelde groepen, leidde tot twee belangrijke observaties. Eerst en vooral blijken er significante verschillen te zijn in miRNA abundantie naar gelang de onderzochte groep. Fibroblasten uit de TAA-groep lijken minder miRNA te expresseren dan deze afkomstig van gezonde individuen. Ten tweede zijn er, bovenop dit globale effect, ook specifiek miRNA's die relatieve verschillen in expressie vertonen tussen de groepen. Na opsplitsing van de patiëntenstalen in alle mogelijke groepen, blijkt dit voor in totaal 27 miRNA's het geval te zijn. Clustering van deze significante species en de stalen, reflecteerde slechts deels het onderliggende genotype. De reden voor de "foutieve" clustering van vijf MFS patiënten met de controlegroep, en drie controles met de patiëntengroep is niet duidelijk. Noch het type mutatie, noch het domein waarin deze mutatie voorkomt, konden deze observatie verklaren. Ook leeftijd en geslacht blijken niet verantwoordelijk te zijn voor het afwijkende expressieprofiel van deze stalen.

4.1.1.GLOBALE VERSCHILLEN IN MIRNA EXPRESSIE

Het is opmerkelijk dat ondanks de equilibratiestap, er toch globaal een verschil is in hoeveelheid miRNA tussen de controles en patiëntenstalen. Deze vermindering suggereert een algemene daling in miRNA expressie bij de fibroblasten afkomstig uit TAA patiënten. Over het hoe en waarom van deze verschillen kan uit deze experimenten geen conclusies getrokken worden. Wel is het zo dat een globale daling in miRNA expressie reeds in verschillende andere cellijnen geobserveerd werd. Zo toonden enkele groepen aan dat kankercellen doorgaans gekenmerkt worden door een verminderde productie van miRNA's. (Lu et al, 2005; Sassen *et al*, 2007) In het verlengde hiervan bewezen Kumar *et al* (2007) dat uitschakeling van onderdelen van de miRNA machinerie in tumorcellen gepaard gaat met een invasiever en minder gedifferentieerd fenotype. Algemeen lijkt de mate van miRNA expressie in verschillende cellen dus evenredig te zijn met de differentiatiestatus. Zo rapporteren ook Khodier *et al* (2010) dat tijdens neuronale differentiatie de miRNA expressie van de meeste species in stijgende lijn gaat. Het is daarom interessant te speculeren dat de lagere miRNA expressie in fibroblasten uit de patiëntgroep erop wijst dat deze cellen zich in een minder

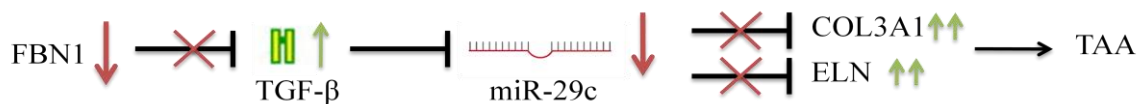
gedifferentieerde status bevinden dan deze uit de controle groep. Al moet gewaarschuwd worden voor het feit dat deze verschillen ook kunnen wijzen op een veranderend fenotype tijdens de celkweek. Niet alle cellen hebben immers eenzelfde passagenummer, of zijn afkomstig van verschillende centra, waardoor deze variatie mogelijk het gevolg is van secundaire factoren.

4.1.1. SPECIFIEKE VERSCHILLEN IN miRNA EXPRESSIE

Naast de globale variaties zijn er ook miRNA's die specifieke verschillen in expressie vertonen, bovenop het algemene effect. Dit was het geval voor 27 miRNA's, waarvan 15 wanneer de volledige TAA-groep werd beschouwd en resp. 3 en 9 specifiek voor de MFS- en de LDS-patiënten. Na deze eerste screening en bijkomende tests, werden enkele miRNA species geïdentificeerd die op basis van alle resultaten extra aandacht verdienen. De reden hiervoor is een significant verschillende expressie in één van de beschouwde patiëntengroepen, in combinatie met *in silico* predictie van relevante doelwitgenen. Hoewel slechts weinig miRNA's deze criteria konden overleven, zijn er toch enkele miRNA's die als potentieel belangrijk mogen beschouwd worden, met name hsa-miR-29c, hsa-miR-889 en hsa-miR-135a.

- HSA-MIR-29C

De detectie van hsa-miR-29c spreekt het meest tot de verbeelding. Dit miRNA bleek niet alleen significant ($p < 0.05$) verschillend geëxprimeerd in MFS-patiënten t.ov. de controles, maar werd ook voorspeld een verzameling ECM-gerelateerde eiwitten te targetten. Bewijs hiervan zijn de hoge predictiescores voor verschillende types collageen en elastine. Hoewel de effecten van dit miRNA niet experimenteel konden bevestigd worden, kan niet uitgesloten worden dat miR-29c wel degelijk voor een daling in doelwitgen expressie zorgt, maar dan op het niveau van translatie i.p.v. transcriptie. Bovendien identificeerden Liao *et al* (2011) miR-29c reeds in hun onderzoek naar TAD's, en stond de miR-29-familie ook in een studie naar fibrose centraal (van Rooij *et al.* 2008). Deze eerste groep postuleerde eveneens een mechanisme waarop miR-29c dysregulatie tot vasculaire aandoeningen leidt. Men gaat er vanuit dat de verminderde aanmaak van dit miRNA een extensieve productie van ECM eiwitten veroorzaakt, wat de pathogene remodeleringen in de hand werkt. Hoewel in aortaweefsel van TAA patiënten vooral afbraak van collageen gedetecteerd werd, blijkt overcompensatie onder de vorm van een verhoogde collageen afzetting ook een vaak terugkerende observatie. (Toumpoulis *et al.* 2009) Liao *et al* bieden zo een verklaring voor de manier waarop miR-29c kan bijdragen tot de pathogenese van vasculaire aandoeningen. De mogelijke oorzaak van de verhoogde expressie van dit miRNA species in TAA patiënten werd dan weer door andere groepen geleverd. Eerst van Rooij *et al* (2008), en later ook Roderburg *et al* (2011) en Winbanks *et al* (2011), toonden namelijk aan dat miR-29c expressie onder controle staat van TGF- β signalisatie. Dit cytokine blijkt een negatieve invloed te hebben op transcriptie van miR-29c. De TGF- β pathway vormt zo de brug tussen MFS en miR-29c en verklaart waarom dit miRNA minder geëxprimeerd wordt in de MFS patiënten. Een hypothetisch pathogenetisch mechanisme is weergegeven in Figuur 25. Hoewel deze hypothese aanvaardbaar klinkt, is het tegelijk ook vreemd dat miR-29c enkel bij de MFS patiënten significant verschillend geëxprimeerd was. LDS-patiënten vertonen immers evenzeer een overstimulatie van de TGF- β pathway. (Choo *et al.* 2009)



Figuur 25. Hypothetisch pathogenetisch mechanisme van TAA's bij MFS patiënten. Door getrunceerde FBN1-eiwitten verloopt de TGF- β sequestratie in de ECM van MFS patiënten niet optimaal, waardoor meer TGF- β -liganden vrijkomen en de TGF- β pathway in fibroblasten overgestimuleerd wordt. Dit leidt tot een verhoogde inhibitie van miR-29c expressie, wat voor een stijging in expressie van de doelwitgenen van miR-29c zorgt. Collageen en elastine worden zo meer geëxprimeerd, waarna extensieve depositie van deze moleculen tot een pathogene remodelering van de vaatwand leidt. Dit heeft dan een structurele verzwakking van de aorta en mogelijk de ontwikkeling van een TAA tot gevolg.

Naast genproducten uit de ECM, werd miR-29c ook voorspeld mRNA's te binden waarvoor een minder concrete link met TAA's bestaat. Het mRNA met de hoogste predictiescore was TET3 (tet oncogene family member 3), dat een rol speelt in het proces van DNA methylering. (Langemeijer *et al*, 2009) Het 3'UTR van dit mRNA bevat maar liefst tien potentiële bindingsplaatsen voor miR-29c (miRDB.org). Hoewel de expressie van TET3 experimenteel niet werd nagegaan en deze predictie dus nog validatie vereist, kan er vanuit de literatuur een hypothese worden opgesteld. Zo toonden Li *et al* (2009) in een onderzoek naar de ontwikkeling van skeletale spieren aan dat de miR-29 familie in staat is om ook te interageren met de 3' UTR van *HDAC4*, een histon deacetylase. Daarnaast bleek de miR-29 familie ook een grote affiniteit te hebben voor het mRNA van de *de novo* methyltransferases *DNMT3A* en *DNMT3B*. (Fabri *et al*. 2007) TET3 past perfect in dit lijstje van epigenetische regulatoren. Mogelijk zorgt de TGF- β -gedreven repressie van miR-29 ook in TAA patiënten voor een downregulatie van TET3 eiwit, waardoor via wijzigingen in de methylatiestatus de expressie van een verzameling genen drastisch gewijzigd wordt. Dit zou dan bepaalde differentiatieprogramma's kunnen activeren en de identiteit van de cel aanpassen. Hoewel wijzigingen in cellulaire opmaak tussen aneurysmaal en gezond aortaweefsel een vaststaand feit is (Jones *et al*, 2010), en het eveneens bewezen is dat het methylatiepatroon een invloed kan hebben op de cellulaire identiteit (Baylin & Bestor, 2002), moet gewaarschuwd worden dat het hier om een puur hypothetisch mechanisme gaat dat op slechts weinig data gebaseerd is. Uitvoerige experimentele verificatie is wat dit betreft een noodzaak.

- HSA-MIR-889

Hsa-miR-889 spijgt in het oog omwille van de lage p-waarde. Zowel in de MFS-groep als de volledige TAA-groep, is dit miRNA significant downgereguleerd t.o.v. de controles. Dit suggereert een rol voor miR-889 in de pathogenese van TAA's, zowel bij LDS als bij MFS. Deze hypothese wordt gevoed door de hoge predictiescores voor SMAD2 en SMAD5 als doelwitgenen. Net als bij miR-29c kon deze interactie echter experimenteel niet bevestigd worden. MiRNA en mRNA niveaus bleken nauwelijks te correleren, al moet ook hier gewezen worden op het feit dat mogelijk enkel translationele inhibitie plaatsvindt. Wat de literatuur betreft is miR-889 voorlopig nog een onbeschreven blad, waardoor het moeilijk is een hypothetisch pathogenetisch mechanisme op te stellen. We kunnen echter wel speculeren dat de downregulatie van dit miRNA, tot een verminderde inhibitie van SMAD2 en SMAD5 expressie leidt. Een verhoogde expressie van deze eiwitten, die downstream van resp. TGF- β en BMP liggen, zou het effect van deze cytokines kunnen verhogen, waardoor de pathogeniciteit van de TGF- β pathway in MFS en LDS patiënten ook toeneemt. (Riggins *et al*, 1996)

Naast de SMAD-genen waren er ook opvallend hoge targetscores voor het 3'UTR van *EREG*, *PHF6* en *MIPOL1* mRNA. Er is echter experimentele verificatie nodig van deze interacties vooraleer een relevante hypothese kan opgesteld worden. Vanuit de literatuur kan er namelijk geen concreet verband gelegd worden tussen deze genen of hun eiwitproduct en TAA's.

- HSA-MIR-135A

Hsa-miR-135a valt vooral op doordat het, in tegenstelling tot de algemene downregulatie, relatief hoger geëxprimeerd wordt in de TAA-groep. Dit miRNA is, na normalisatie, gemiddeld 1,7 keer meer aanwezig in de patiëntenstalen. In de zoektocht naar de oorzaak waarom miR-135a zo tegen de algemene trend ingaat, geven opnieuw de *in silico* voorspellingen een eerste aanzet. Zo is er een topscore voor het *ANGPT2* gen, dat codeert voor angiotensinogenase-2. Dit eiwit is een antagonist van angiotensinogenase-1 en de angiotensinogenase-receptor TIE-1, die in samenwerking met *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) betrokken zijn in vasculaire remodelering. (Maisonpierre *et al*, 1997) Doordat angiotensinogenase-2 de interactie tussen angiotensinogenase-2 en TIE-1 blokkeert, wordt vasculaire integriteit verminderd en wordt neoangiogenese mogelijk. (Yu & Stamenkovic, 2001) MiR-135 zou in dit verhaal kunnen fungeren als fijnregulator van het angiogene proces. Een verhoging van miR-135a, zoals geobserveerd bij de TAA-patiënten, zou namelijk via repressie van angiotensinogenase-2 de interactie tussen angiotensinogenase-1 en TIE-1 opnieuw kunnen bevorderen, wat de vasculaire integriteit ten goede komt. (Lee, 2004) De opregulatie van miR-135a zou in dit opzicht kunnen gezien worden als onderdeel van het herstelproces, waarbij de fibroblasten de integriteit van de beschadigde vaatwand trachten te behouden.

Experimentele verificatie van de targetting van *ANGPT2* en andere potentiële doelwitgenen van miR-135a werd niet uitgevoerd, maar is wel in de nabije toekomst gepland.

4.2. TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Deze eerste bevindingen tonen het belang aan van miRNA's in TAA's, wat toekomstperspectieven biedt voor verdere karakterisatie. Vooraleer definitieve conclusies getrokken kunnen worden, zijn echter nog heel wat bijkomende experimenten nodig. Eerst en vooral zou het fenotypisch effect van miRNA expressie op de cellen ook op het eiwitniveau geanalyseerd moeten worden. Daarnaast is het ook essentieel te verifiëren dat deze miRNA's effectief in het 3'-UTR van hun voorspelde doelwitgenen binden. Tevens zou het nuttig zijn om via transfectiestudies na te gaan wat het gevolg is van perturbatie van de gevonden miRNA's op het fenotype van cellen. We denken hierbij vooral aan miR-29c, miR-889 en miR-135a, die op basis van alle resultaten het grootste potentieel lijken te hebben om een rol te spelen in de pathogenese van TAA's.

Naast deze specifieke toevoegingen, zou ook een miRNA profilering van andere celpopulaties van groot nut kunnen zijn. We denken hierbij in de eerste plaats aan SMC's die afkomstig zijn uit het beschadigde aortaweefsel.

Ten slotte is het ook belangrijk te valideren dat de geobserveerde effecten niet het gevolg zijn van een verschil in experimentele behandeling, zoals door variaties in passagenummer tussen de cellijnen.

4.3.ALGEMEEN BESLUIT

Deze studie toonde aan dat miRNA's het potentieel hebben een rol te spelen in de pathogenese van TAA's. Hoewel de gedetecteerde miRNA's met de grenzen van de significantie flirten, en ook de vergelijking tussen de mRNA en de miRNA niveaus tot geen spectaculaire bevindingen leidde, suggereren de bio-informatische predicties toch dat veel van de gevonden miRNA's een relevante functie hebben in de vasculaire architectuur. Dit project kan daarom vooral gezien worden als een eerste screening, waarbij uit de grote pool miRNA's zich enkele interessante species onderscheiden en als startpunt kunnen fungeren voor volgende experimenten.

Deel 5: MATERIAAL EN METHODEN

5.1. MIRNA PROFILERING

5.1.1. STALEN

Fibroblasten, afkomstig van huidbiopsies afgenomen aan de binnenzijde van de bovenarm, werden ter beschikking gesteld voor onderzoek. Hierbij werden cellijnen van LDS (n=5) en MFS (n=10) patiënten bekomen, alsook van controles (n=11). De patiënten waren reeds gegenotypeerd. LDS patiënten vertoonden heterozygote mutaties in het TGFBR2 gen, meer specifiek in het proteïne kinase domein. MFS patiënten hadden heterozygote mutaties in het FBN1 gen. We onderscheiden hierbij zowel missense (n=6) als nonsense (n=4) mutaties. Een lijst met de stalen is terug te vinden op p69

5.1.2. CELCULTUUR

Cellen werden bewaard in vloeibare stikstof. Vervolgens werden ze opnieuw in cultuur gebracht en opgekweekt met oog op het isoleren van het totale RNA van de cellen. De cellen werden in cultuur bewaard in T25cm² flesjes, groeiend op DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) waaraan 10 % FCS (Fetal calf serum), NEAA (non-essential amino acids), streptomycine, penicilline en fungizone werden toegevoegd, in een 5 % CO₂ omgeving bij 37 °C. De cellen werden tweemaal per week van nieuw medium voorzien. Bij voldoende confluente werden de cellen getransfereerd naar grotere T75cm² flesjes en uiteindelijk confluent gegroeid in P60 petrischalen. Na één week confluent groei werden de cellen 24u gegroeid in serum-vrij DMEM, waarna deze werden geoogst. Hierbij werd d.m.v. 10' centrifugatie bij 1200 rpm een pellet bekomen waarin alle cellen zijn neergeslagen. Gedetailleerde protocols (p61) en recepten (p60) zijn terug te vinden in de bijlage.

5.1.3. RNA ISOLATIE, CONCENTRATIEBEPALING EN KWALITEITSCONTROLE

MiRNA werd geïsoleerd met behulp van de miRNeasy Mini Kit (Qiagen), volgens het protocol "Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology". Na isolatie werd de RNA concentratie in elk staal spectrofotometrisch bepaald m.b.v de Nanodrop 2000. Deze concentraties werden gebruikt om de stalen te verdunnen in RNase-vrij water tot een concentratie van 10 ng/μL. Voor de RNA kwaliteitscontrole werd gebruik gemaakt van de Experion™ RNA HighSens Analysis Kit. Gedetailleerde protocols: p62

5.1.4. MIRNA PROFILERING

Het miRNA werd gekwantificeerd met behulp van Multiplex RT TaqMan® MicroRNA Assay, waarbij gebruik werd gemaakt van een intermediaire pre-amplificatie stap. Voor de multiplex RT stap werd gebruik gemaakt van de Megaplex™ RT Primer mix van Applied Biosystems, die 754 humane miRNA's omvat. Deze mix is onderverdeeld in 2 primerpools (A2.1 en B3.0). Voor de pre-amplificatie werd de Megaplex™ PreAmp Primer mix van Applied Biosystems gebruikt, opnieuw specifiek voor 754 humane miRNA's. PCR amplificatie werd uitgevoerd met Taqman probe en Human Pools A v2.1 en Human Pools A B. 3.0 primermixen van Applied biosystems. Gedetailleerde protocols: p64

In de ruwe data werd eerst een onderscheid gemaakt tussen detectie en noise, door alle C_T -waarden hoger dan 32 als “niet gedetecteerd” te beschouwen. Stalen met grote hoeveelheden niet gedetecteerde miRNA’s of heel lage expressiewaarden werden vervolgens uit de dataset verwijderd, alsook miRNA’s waarvoor in meer dan 5 stalen geen expressie gedetecteerd werd. De overgebleven C_T -waarden werden genormaliseerd door van elke waarde de gemiddelde C_T per staal af te trekken, volgens de *global mean normalization method* (Mestdagh et al, 2009). Hierbij werden enkel die miRNA’s in rekening gebracht die in alle stalen tot expressie kwamen. Resterende *missing values* werden per staal geïmputeerd door er de laagst gedetecteerde expressiewaarde van dit miRNA aan toe te kennen. De relatieve expressie levels werden vervolgens gebruikt om de fold change te berekenen, volgens de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ methode. (Livak & Schmittgen, 2001). Een lijst met formules die gebruikt werden in Microsoft Excel is terug te vinden in de bijlage (p69)

5.1.5. STATISTISCHE ANALYSE

De normale verdeling van de resultaten werd nagegaan met een Kolmogorov–Smirnov test. Vervolgens werd een ongepaarde t-test uitgevoerd, waarbij de stalen initieel in twee groepen verdeeld werden (Controle en TAA). In een tweede fase werd de patiëntengroep onderverdeeld in een MFS en LDS groep. Zowel de globale als de specifieke miRNA expressie werd onderling vergeleken, waarbij werd nagegaan of de verdeling verschilt naar gelang de beschouwde groepen. Multiple testing correctie werd doorgevoerd door gebruik te maken van de Benjamini & Hochberg–procedure, die een False Discovery Rate (FDR) oplevert onder de vorm van een q-waarde. (Green & Diggle, 2007) Voor de hiërarchische clustering werd gebruik gemaakt van de GenePattern applicaties (Broad institute, IMT). Significant verschillend geëxprimeerde miRNA’s werden via Pearson correlation en pairwise average linkage geclusterd en gevisualiseerd als heatmap.

5.1.6. DOELWITGEN PREDICTIE

Voorspelling van de doelwitgenen gebeurde primair in de miRDB (mirdb.org), waarbij gekeken werd naar targets met een hoge predictiescore. Potentieel interessante miRNA’s werden eveneens gescreend met behulp van de *miRNA body map* (Ghent University). In deze overkoepelende zoekmachine werd de “miRNA2function” functie gebruikt, waarbij naast miRDB ook volgende databasen werden doorzocht:

- Targetscan en Targetscan_cons: <http://www.targetscan.org/>
- DIANA: <http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html>
- PITA: genie.weizmann.ac.il/pubs/.../mir07_data.html
- MicroCosm: www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/
- Tarbase: diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/
- miRecords: mirecords.biolead.org/
- RNA22 (3’UTR): cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html

5.2. TRANSFECTIE VAN FIBROBLAST CELLEN

5.2.1. VOORBEREIDING TRANSFECTIE

Voor de optimalisatie van de transfectie procedure werden controle fibroblast cellen gebruikt, die volgens methode 5.1.2 “Celcultuur” in cultuur werden gehouden. Na splitsing werden 2.5×10^6 cellen (0.5 mL geresuspendeerde celpellet van een T75 plaat) toegevoegd per well

van een 6-well plaat, waarin zich 1.5 mL DMEM + 10 % FCS medium bevindt. De cellen werden geïncubeerd bij 37°C, 5 % CO₂, en tot 50-60 % confluïentie gegroeid. Gedetailleerde protocols: p67.

5.2.2. TRANSFECTIE

De transfectie van fibroblast cellen met miRNA precursoren werd geoptimaliseerd, door drie methodes te testen. De cellen werden getransfecteerd met Pre-miR™ hsa-miR-1 miRNA Precursor (Ambion) of Pre-miR™ Negative Control #1 (Ambion). Voor de lipofectamine methode werd ook een fluorescent assay uitgevoerd, waarbij de cellen getransfecteerd werden met Cy™3 dye-labeled Anti-miR™ Negative Control #1 (Ambion) of Cy™3 dye-labeled Pre-miR™ Negative Control No. 1 (Ambion).

- XtremeGene premiR transfectie (Gedetailleerd protocol: p67)

Cellen werden gewassen met 2 mL Versene oplossing en voorzien van 2 mL DMEM zonder FCS en antibiotica per well. 200 µL Xtreme-Gene transfectiemix (recept, zie bijlage) werd toegevoegd aan de cellen (A), 4-5u incubatie bij 37°C, 5% CO₂. 200 µL 10 % FCS werd toegevoegd aan de cellen, 24u incubatie 37°C, 5% CO₂.

- Lipofectamine premiR transfectie (Gedetailleerd protocol: p67)

Het medium van de cellen werd verwijderd. 200 µL Lipofectamine transfectiemix (recept, zie bijlage) werd toegevoegd aan de cellen, 4-5u incubatie bij 37°C, 5% CO₂. 2 mL DMEM + 10 % FCS werd toegevoegd aan de cellen, 24u incubatie 37°C, 5% CO₂.

- Dharmafect premiR transfectie (Gedetailleerd protocol: p68)

Cellen werden gewassen met 2 mL Versene oplossing en voorzien van 2 mL DMEM zonder FCS en antibiotica per well. 200 µL Dharmafect transfectiemix (recept, zie bijlage) werd toegevoegd aan de cellen (A), 4-5u incubatie bij 37°C, 5% CO₂. 200 µL 10 % FCS werd toegevoegd aan de, 24u incubatie 37°C, 5% CO₂.

5.2.3. ANALYSE VAN TRANSFECTIE EFFICIËNTIE

Voor kwalitatieve analyse van fluorescentie, werd gebruik gemaakt van het Arcturus PixCell II Laser Capture Microdissection toestel (Molecular Devices). Cellen worden bekeken op verschillende vergrotingen (4x/10x/40x), voor en na excitatie bij 550 nm. Beelden werden geanalyseerd met behulp van de Arcturus software.

5.3. RNA KWANTIFICATIE

5.3.1. CDNA SYNTHESE

Met behulp van de iScript cDNA synthese kit (Bio-Rad #170-8891) werd het RNA omgezet in cDNA als voorbereiding op de RT-PCR reactie. Gedetailleerd protocol: p68.

5.3.2.CDNA EXPRESSIE ANALYSE

Het cDNA werd gekwantificeerd door middel van qPCR. De stalen werden geamplificeerd met behulp van de Roche 5x Mastermix. In een 384-well plaat werd 2 μ L cDNA toegevoegd aan 3 μ L Mastermix. De amplificatie gebeurde in het LightCycler® 480 Real-Time PCR System. Het resultaat werd geanalyseerd in qBase^{PLUS} (Biogazelle). Naast de genen van interesse werden telkens vier referentiegenen meegelopen: *HPRT1*, *YWHAZ*, *B2M* en *RPL13A*. Recept voor Roche 5x Mastermix: p60. Gedetailleerd protocol: p69. Primers: Tabel 9

Tabel 9. Overzicht van alle ontworpen primerparen en hun forward en reverse sequenties

Gen	Forward	Reverse
PTK9	TCTAGCTGCAAGAGCCGTCTGCT	TGCTTGTGTGCATGCTGCTTGG
EREG	CGTGTGGCTCAAGTGTCAAT	AGTG TTCACATCGGACACCA
PHF6	GAAATTTAAAAGAGGCACGAAGC	ATCATGCAATGCACAGTGGT
MIPOL1	TGCACTAATAGAAGAACGGGATG	CTCCTGCTCTAACCGTTTGC
TET3	CCCACAAGGACCAGCATAAC	CCATCTTGTACAGGGGGAGA
ATAD2B	TGCAAAGGATTTCTGAAAGA	GGTACAAGCCCTGTGCCTAA
ANGPT2	TCTTGGAACACTCCCTCTCG	TGATGTGCTTGTCTTCCATAGC
ENTPD7	GGCATTCTGGGACTCTTCT	TCCCCTACTCGAGCCAAATA
GK5	CACTTTCACAACCCAGCAGA	GTCCCAAAGCAGCAATTTTC
FBN1	GAACAGTGTCCCATCCCAAG	GGCCTTTGACTTCCACAGAG
CAPN2	TTCCTATGAAATGCGGAAGG	AAACCGAGCAACGATGACTT
SMAD5	AAAGCCGTTGGATATTTGTGA	GAAGGCTGTGTTGTGGATTG
TGIF2	TACCCCTCAGAGCAGGAGAA	GAAGCATGTCTGGGAGAAGC
PPM1A	TTTCCAAATGCACCCAAAGT	TTCCCCTGCTTCTTTATGA
TGFBR1	TTGCTCCAAACCACAGAGTG	AACATCGTCGAGCAATTTCC
TIMP2	CTGGACGTTGGAGGAAAGAA	AGGCTCTTCTTCTGGGTGGT
ACTN	CCTTCGCTTTGCTATTCAGG	ACACCAAAGCAGCAGACCTT

Deel 6:REFERENTIES

- Alberts B (2002) *Molecular biology of the cell* 4e ed. New York: Garland Science
- Annes JP (2003) Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science* **116**: 217-224
- Barbour JR, Spinale FG & Ikonomidis JS (2007) Proteinase systems and thoracic aortic aneurysm progression. *J. Surg. Res* **139**: 292-307
- Barcellos-Hoff MH & Dix TA (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol. Endocrinol* **10**: 1077-1083
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**: 281-297
- Baylin S & Bestor TH (2002) Altered methylation patterns in cancer cell genomes: Cause or consequence? *Cancer Cell* **1**: 299-305
- Behrendt D & Ganz P (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am. J. Cardiol* **90**: 40L-48L
- Beller CJ, Gebhard MM, Karck M & Labrosse MR (2010) Usefulness and limitations of computational models in aortic disease risk stratification. *J. Vasc. Surg* **52**: 1572-1579
- Bellingham CM, Woodhouse KA, Robson P, Rothstein SJ & Keeley FW (2001) Self-aggregation characteristics of recombinantly expressed human elastin polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* **1550**: 6-19
- Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L & Zagari A (2002) Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)(10)](3). *Protein Sci* **11**: 262-270
- Berk BC (2001) Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol. Rev* **81**: 999-1030
- Biddinger A, Rocklin M, Coselli J & Milewicz DM (1997) Familial thoracic aortic dilatations and dissections: a case control study. *J. Vasc. Surg* **25**: 506-511
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A & Engler JA (1993) Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med* **4**: 197-250
- Borges LF, Gomez D, Quintana M, Touat Z, Jondeau G, Leclercq A, Meilhac O, Jandrot-Perrus M, Gutierrez PS, Freymuller E, Vranckx R & Michel J-B (2010) Fibrinolytic activity is associated with presence of cystic medial degeneration in aneurysms of the ascending aorta. *Histopathology* **57**: 917-932
- Brennecke J, Stark A, Russell RB & Cohen SM (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* **3**: e85
- Cañadas V, Vilacosta I, Bruna I & Fuster V (2010) Marfan syndrome. Part 1: pathophysiology and diagnosis. *Nat Rev Cardiol* **7**: 256-265

- Chau BN & Brenner DA (2011) What goes up must come down: the emerging role of microRNA in fibrosis. *Hepatology* **53**: 4-6
- Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA & Kielty CM (2007) Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGF 1. *The Journal of Cell Biology* **176**: 355-367
- Choo JTL, Tan TH, Lai AHM & Wong KY (2009) Loeys-Dietz syndrome: a Marfan-like syndrome associated with aggressive vasculopathy. *Singapore Med J* **50**: e353-357
- Colombatti A, Doliana R, Bot S, Canton A, Mongiat M, Mungiguerra G, Paron-Cilli S & Spessotto P (2000) The EMILIN protein family. *Matrix Biol* **19**: 289-301
- Cooke P & Fay F (1972) Thick myofilaments in contracted and relaxed mammalian smooth muscle cells. *Experimental Cell Research* **71**: 265-272
- Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee T-H, Miano JM, Ivey KN & Srivastava D (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08195>
- Czirok A, Zach J, Kozel BA, Mecham RP, Davis EC & Rongish BJ (2006) Elastic fiber macro-assembly is a hierarchical, cell motion-mediated process. *J. Cell. Physiol* **207**: 97-106
- Dapunt OE, Galla JD, Sadeghi AM, Lansman SL, Mezrow CK, de Asla RA, Quintana C, Wallenstein S, Ergin AM & Griep RB (1994) The natural history of thoracic aortic aneurysms. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **107**: 1323-1332; discussion 1332-1333
- Defigueiredoborges L, Jaldin R, Dias R, Stolf N, Michel J & Gutierrez P (2008) Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta☆. *Human Pathology* **39**: 437-443
- Derynck R & Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577-584
- ten Dijke P & Arthur HM (2007) Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **8**: 857-869
- Dobrin PB (1978) Mechanical properties of arterises. *Physiol. Rev* **58**: 397-460
- Dubois CM, Laprise MH, Blanchette F, Gentry LE & Leduc R (1995) Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J. Biol. Chem* **270**: 10618-10624
- Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM & Creemers EE (2009) miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ. Res* **104**: 170-178, 6p following 178

- Elefteriades JA (2002) Natural history of thoracic aortic aneurysms: indications for surgery, and surgical versus nonsurgical risks. *Ann. Thorac. Surg* **74**: S1877-1880; discussion S1892-1898
- Elefteriades JA (2008) Thoracic aortic aneurysm: reading the enemy's playbook. *Curr Probl Cardiol* **33**: 203-277
- El-Hallous E, Sasaki T, Hubmacher D, Getie M, Tiedemann K, Brinckmann J, Bätge B, Davis EC & Reinhardt DP (2007) Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J. Biol. Chem* **282**: 8935-8946
- El-Hamamsy I & Yacoub MH (2009) Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat Rev Cardiol* **6**: 771-786
- Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanasi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K & Croce CM (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 15805-15810
- Faury G (2001) Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol. Biol* **49**: 310-325
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN & Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* **2008**: 102-114
- Gartel AL & Kandel ES (2008) miRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin. Cancer Biol* **18**: 103-110
- Gharaee-Kermani M, Hu B, Phan SH & Gyetko MR (2009) Recent advances in molecular targets and treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: focus on TGFbeta signaling and the myofibroblast. *Curr. Med. Chem* **16**: 1400-1417
- Gibson MA, Hughes JL, Fanning JC & Cleary EG (1986) The major antigen of elastin-associated microfibrils is a 31-kDa glycoprotein. *J. Biol. Chem* **261**: 11429-11436
- Goumans M-J, Liu Z & ten Dijke P (2009) TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res* **19**: 116-127
- Gray WR, Sandberg LB & Foster JA (1973) Molecular model for elastin structure and function. *Nature* **246**: 461-466
- Green GH & Diggle PJ (2007) On the operational characteristics of the Benjamini and Hochberg False Discovery Rate procedure. *Stat Appl Genet Mol Biol* **6**: Article27
- Guo D-C, Regalado ES, Minn C, Tran-Fadulu V, Coney J, Cao J, Wang M, Yu RK, Estrera AL, Safi HJ, Shete SS & Milewicz DM (2010) Familial Thoracic Aortic Aneurysms and Dissections: Identification of a Novel Locus for Stable Aneurysms With a Low Risk for Progression to Aortic Dissection. *Circulation: Cardiovascular Genetics* **4**: 36-42

- Guo D-C, Pannu H, Tran-Fadulu V, Papke CL, Yu RK, Avidan N, Bourgeois S, Estrera AL, Safi HJ, Sparks E, Amor D, Ades L, McConnell V, Willoughby CE, Abuelo D, Willing M, Lewis RA, Kim DH, Scherer S, Tung PP, e.a. (2007) Mutations in smooth muscle α -actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections. *Nat Genet* **39**: 1488-1493
- Guo D-C, Papke CL, Tran-Fadulu V, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, Kim DH, Pannu H, Willing MC, Sparks E, Pyeritz RE, Singh MN, Dalman RL, Grotta JC, Marian AJ, Boerwinkle EA, Frazier LQ, LeMaire SA, Coselli JS, Estrera AL, e.a. (2009) Mutations in smooth muscle alpha-actin (ACTA2) cause coronary artery disease, stroke, and Moyamoya disease, along with thoracic aortic disease. *Am. J. Hum. Genet* **84**: 617-627
- Habashi JP (2006) Losartan, an AT1 Antagonist, Prevents Aortic Aneurysm in a Mouse Model of Marfan Syndrome. *Science* **312**: 117-121
- Hager A, Kaemmerer H, Rapp-Bernhardt U, Blücher S, Rapp K, Bernhardt TM, Galanski M & Hess J (2002) Diameters of the thoracic aorta throughout life as measured with helical computed tomography. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **123**: 1060-1066
- Heldin CH, Miyazono K & ten Dijke P (1997a) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471
- Heldin CH, Miyazono K & ten Dijke P (1997b) TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* **390**: 465-471
- Van Hemelrijk C, Renard M & Loeys B (2010) The Loeys-Dietz syndrome: an update for the clinician. *Curr. Opin. Cardiol* **25**: 546-551
- Henderson EL, Geng YJ, Sukhova GK, Whittmore AD, Knox J & Libby P (1999) Death of smooth muscle cells and expression of mediators of apoptosis by T lymphocytes in human abdominal aortic aneurysms. *Circulation* **99**: 96-104
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L & Gabbiani G (2007) The Myofibroblast One Function, Multiple Origins. *The American Journal of Pathology* **170**: 1807-1816
- Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR & Weiss SJ (1998) Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* **95**: 365-377
- HUXLEY AF & NIEDERGERKE R (1954) Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature* **173**: 971-973
- Ignotz RA & Massagué J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J. Biol. Chem* **261**: 4337-4345
- Iozzo RV & Murdoch AD (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J* **10**: 598-614

- Isogai Z (2002) Latent Transforming Growth Factor beta -binding Protein 1 Interacts with Fibrillin and Is a Microfibril-associated Protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 2750-2757
- Isselbacher EM (2005) Thoracic and Abdominal Aortic Aneurysms. *Circulation* **111**: 816-828
- Jarvelainen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN & Penttinen R (2009) Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy. *Pharmacological Reviews* **61**: 198-223
- Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X, Li M, Wang G & Liu Y (2009) miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Research* **37**: D98-D104
- Johnson PT, Chen JK, Loeys BL, Dietz HC & Fishman EK (2007) Loeys-Dietz Syndrome: MDCT Angiography Findings. *American Journal of Roentgenology* **189**: W29-W35
- Jones JA, Spinale FG & Ikonomidis JS (2009) Transforming growth factor-beta signaling in thoracic aortic aneurysm development: a paradox in pathogenesis. *J. Vasc. Res* **46**: 119-137
- Jones JA, Zavadzkas JA, Chang EI, Sheats N, Koval C, Stroud RE, Spinale FG & Ikonomidis JS (2010) Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* **140**: 653-659
- Judge DP, Biery NJ, Keene DR, Geubtner J, Myers L, Huso DL, Sakai LY & Dietz HC (2004) Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J. Clin. Invest* **114**: 172-181
- Kadler KE, Baldock C, Bella J & Boot-Handford RP (2007) Collagens at a glance. *J. Cell. Sci* **120**: 1955-1958
- Kanzaki T, Olofsson A, Morén A, Wernstedt C, Hellman U, Miyazono K, Claesson-Welsh L & Heldin C-H (1990) TGF- β 1 binding protein: A component of the large latent complex of TGF- β 1 with multiple repeat sequences. *Cell* **61**: 1051-1061
- Keane MG & Pyeritz RE (2008) Medical management of Marfan syndrome. *Circulation* **117**: 2802-2813
- Khalil N (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect* **1**: 1255-1263
- Khodier (2010) MicroRNA dynamics in early neuronal differentiation with correlation to protein output and cell biology.
- Khvorova A, Reynolds A & Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* **115**: 209-216
- Kielty CM, Sherratt MJ & Shuttleworth CA (2002) Elastic fibres. *J. Cell. Sci* **115**: 2817-2828
- Kim DH, Saetrom P, Snove O & Rossi JJ (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 16230-16235

- Kim E-S, Kim M-S & Moon A (2004) TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int. J. Oncol* **25**: 1375-1382
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinaki S, De Planell-Sauger M, Nelson PT & Mourelatos Z (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* **129**: 1141-1151
- Kong W, Zhao J-J, He L & Cheng JQ (2009) Strategies for profiling MicroRNA expression. *J. Cell. Physiol.* **218**: 22-25
- Koullias GJ, Ravichandran P, Korkolis DP, Rimm DL & Elefteriades JA (2004) Increased tissue microarray matrix metalloproteinase expression favors proteolysis in thoracic aortic aneurysms and dissections. *Ann. Thorac. Surg* **78**: 2106-2110; discussion 2110-2111
- Kubota K (2003) TGF- β stimulates collagen (I) in vascular smooth muscle cells via a short element in the proximal collagen promoter. *Journal of Surgical Research* **109**: 43-50
- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR & Jacks T (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* **39**: 673-677
- van de Laar IMBH, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JMA, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen L-A, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collée M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IME, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, e.a. (2011) Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet* **43**: 121-126
- Laiho M, Saksela O & Keski-Oja J (1986) Transforming growth factor beta alters plasminogen activator activity in human skin fibroblasts. *Exp. Cell Res* **164**: 399-407
- Langemeijer SMC, Aslanyan MG & Jansen JH (2009) TET proteins in malignant hematopoiesis. *Cell Cycle* **8**: 4044-4048
- Lee KW (2004) Plasma Angiopoietin-1, Angiopoietin-2, Angiopoietin Receptor Tie-2, and Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Acute Coronary Syndromes. *Circulation* **110**: 2355-2360
- Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, Maegdefessel L, Kundu RK, Quertermous T, Tsao PS & Spin JM (2011) MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J. Cell. Physiol.* **226**: 1035-1043
- LeRoy EC, Trojanowska MI & Smith EA (1990) Cytokines and human fibrosis. *Eur. Cytokine Netw* **1**: 215-219
- Lewin B (2007) Cells Sudbury Mass.: Jones and Bartlett Publishers
- Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS & Lian JB (2009) Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem* **284**: 15676-15684

- Liao M, Zou S, Weng J, Hou L, Yang L, Zhao Z, Bao J & Jing Z (2011) A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis. *J Vasc Surg* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334170>
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS & Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**: 769-773
- Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N & Abraham E (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* **207**: 1589-1597
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**: 402-408
- Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, Backer JD, Hellems J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, e.a. (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet* **37**: 275-281
- Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, e.a. (2006) Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N. Engl. J. Med* **355**: 788-798
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR & Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**: 834-838
- Di Lullo GA (2001) Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 4223-4231
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN & Yancopoulos GD (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**: 55-60
- Maleszewski JJ, Miller DV, Lu J, Dietz HC & Halushka MK (2009) Histopathologic findings in ascending aortas from individuals with Loeys-Dietz syndrome (LDS). *Am. J. Surg. Pathol* **33**: 194-201
- MANLEY G (1964) HISTOLOGY OF THE AORTIC MEDIA IN DISSECTING ANEURYSMS. *J. Clin. Pathol* **17**: 220-224
- Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I & Petridou S (1996) Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**: 4219-4223

- Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JHW, Gay S & Distler O (2010) MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* **62**: 1733-1743
- Meilhac O, Ho-Tin-Noé B, Houard X, Philippe M, Michel J-B & Anglés-Cano E (2003) Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J* **17**: 1301-1303
- Mestdagh P, Boström A-K, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquièrre B, Schulte S & Dewes M (2010) The miR-17-92 MicroRNA Cluster Regulates Multiple Components of the TGF- β Pathway in Neuroblastoma. *Molecular Cell* **40**: 762-773
- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F & Vandesompele J (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* **10**: R64
- Mickley V, Mohr W, Orend KH & Sunder-Plassmann L (1995) [Aneurysm of the descending thoracic aorta in tertiary syphilis]. *VASA* **24**: 72-76
- Milewicz DM, Guo D-C, Tran-Fadulu V, Lafont AL, Papke CL, Inamoto S, Kwartler CS & Pannu H (2008) Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections: focus on smooth muscle cell contractile dysfunction. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**: 283-302
- Min H & Yoon S (2010) Got target?: computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med* **42**: 233
- Moussad EE & Brigstock DR (2000) Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol. Genet. Metab* **71**: 276-292
- Murata K, Motayama T & Kotake C (1986) Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis* **60**: 251-262
- Nagase H, Visse R & Murphy G (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res* **69**: 562-573
- Narayanan AS (1976) The smooth muscle cell. III. Elastin synthesis in arterial smooth muscle cell culture. *The Journal of Cell Biology* **68**: 411-419
- Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, Myers L, Bunton TE, Gayraud B, Ramirez F, Sakai LY & Dietz HC (2003) Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet* **33**: 407-411
- Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev* **75**: 487-517
- De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC & Pyeritz RE (1996) Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am. J. Med. Genet* **62**: 417-426
- Pappu S, Dardik A, Tagare H & Gusberg RJ (2008) Beyond fusiform and saccular: a novel quantitative tortuosity index may help classify aneurysm shape and predict aneurysm rupture potential. *Ann Vasc Surg* **22**: 88-97

- Parker R & Song H (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol* **11**: 121-127
- PARTRIDGE SM, ELSDEN DF & THOMAS J (1963) Constitution of the cross-linkages in elastin. *Nature* **197**: 1297-1298
- Pearson GD, Devereux R, Loeys B, Maslen C, Milewicz D, Pyeritz R, Ramirez F, Rifkin D, Sakai L, Svensson L, Wessels A, Van Eyk J & Dietz HC (2008) Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute and National Marfan Foundation Working Group on Research in Marfan Syndrome and Related Disorders. *Circulation* **118**: 785-791
- Radhakrishnamurthy B, Srinivasan SR, Vijayagopal P & Berenson GS (1990) Arterial wall proteoglycans--biological properties related to pathogenesis of atherosclerosis. *Eur. Heart J* **11 Suppl E**: 148-157
- Raffetto J & Khalil R (2008) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical Pharmacology* **75**: 346-359
- Rensen SSM, Doevendans PAFM & van Eys GJJM (2007) Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J* **15**: 100-108
- Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E, Weinstein CL, Kern SE, Hamilton SR, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW & Vogelstein B (1996) Mad-related genes in the human. *Nat Genet* **13**: 347-349
- Robinson PN, Arteaga-Solis E, Baldock C, Collod-Beroud G, Booms P, De Paepe A, Dietz HC, Guo G, Handford PA, Judge DP, Kielty CM, Loeys B, Milewicz DM, Ney A, Ramirez F, Reinhardt DP, Tiedemann K, Whiteman P & Godfrey M (2006) The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *Journal of Medical Genetics* **43**: 769-787
- Roderburg C, Urban G-W, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, Schmidt S, Janssen J, Koppe C, Knolle P, Castoldi M, Tacke F, Trautwein C & Luedde T (2011) MicroRNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* **53**: 209-218
- van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA & Olson EN (2008) Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**: 13027-13032
- Sakai LY, Keene DR & Engvall E (1986) Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol* **103**: 2499-2509
- Sassen S, Miska EA & Caldas C (2007) MicroRNA—implications for cancer. *Virchows Arch* **452**: 1-10
- Shan SW, Lee DY, Deng Z, Shatseva T, Jeyapalan Z, Du WW, Zhang Y, Xuan JW, Yee S-P, Siragam V & Yang BB (2009) MicroRNA MiR-17 retards tissue growth and represses fibronectin expression. *Nat Cell Biol* **11**: 1031-1038

- Shifren A & Mecham RP (2006) The stumbling block in lung repair of emphysema: elastic fiber assembly. *Proc Am Thorac Soc* **3**: 428-433
- Siegel RC (1974) Biosynthesis of collagen crosslinks: increased activity of purified lysyl oxidase with reconstituted collagen fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **71**: 4826-4830
- Silver FH, Christiansen DL & Buntin CM (1989) Mechanical properties of the aorta: a review. *Crit Rev Biomed Eng* **17**: 323-358
- STEINBERG I (1957) Chronic traumatic aneurysm of the thoracic aorta: report of five cases, with a plea for conservative treatment. *N. Engl. J. Med* **257**: 913-918
- Stenmark KR (2006) Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling. *Physiology* **21**: 134-145
- Taipale J, Miyazono K, Heldin CH & Keski-Oja J (1994) Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J. Cell Biol* **124**: 171-181
- Timpl R, Sasaki T, Kostka G & Chu M-L (2003) Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **4**: 479-489
- Toumpoulis IK, Oxford JT, Cowan DB, Anagnostopoulos CE, Rokkas CK, Chamogeorgakis TP, Angouras DC, Shemin RJ, Navab M, Ericsson M, Federman M, Levitsky S & McCully JD (2009) Differential expression of collagen type V and XI alpha-1 in human ascending thoracic aortic aneurysms. *Ann. Thorac. Surg* **88**: 506-513
- Tsarouhas K, Soufla G, Apostolakis S, Zaravinos A, Panagiotou M, Khoury M, Hassoulas JA, Tsatsakis AM & Spandidos DA (2010) Transcriptional regulation of TIMPs in ascending aorta aneurysms. *Thromb. Res* **126**: 399-405
- Valencia-Sanchez MA (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes & Development* **20**: 515-524
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034
- Di Wang H, Rätsep MT, Chapman A & Boyd R (2010) Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **88**: 177-186
- Wang L, Guo D-chuan, Cao J, Gong L, Kamm KE, Regalado E, Li L, Shete S, He W-Q & Zhu M-S (2010) Mutations in Myosin Light Chain Kinase Cause Familial Aortic Dissections. *The American Journal of Human Genetics* **87**: 701-707
- Wang X (2006) Increased Collagen Deposition and Elevated Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Thoracic Aortic Dissection. *Circulation* **114**: I-200-I-205
- Wang X (2008) miRDB: A microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA* **14**: 1012-1017

-
- Wang X & El Naqa IM (2008) Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* **24**: 325-332
- Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* **27**: 201-206
- Willis BC & Borok Z (2007) TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* **293**: L525-534
- Winbanks CE, Wang B, Beyer C, Koh P, White L, Kantharidis P & Gregorevic P (2011) TGF- Regulates miR-206 and miR-29 to Control Myogenic Differentiation through Regulation of HDAC4. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 13805-13814
- Yan C & Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Physiol* **211**: 19-26
- Younger ST & Corey DR (2011) Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Research* Available at: <http://www.nar.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/nar/gkr155> [Bezoct april 17, 2011]
- Yu Q & Stamenkovic I (2001) Angiopoietin-2 is implicated in the regulation of tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol* **158**: 563-570
- Zhu L, Vranckx R, Van Kien PK, Lalande A, Boisset N, Mathieu F, Wegman M, Glancy L, Gasc J-M, Brunotte F, Bruneval P, Wolf J-E, Michel J-B & Jeunemaitre X (2006) Mutations in myosin heavy chain 11 cause a syndrome associating thoracic aortic aneurysm/aortic dissection and patent ductus arteriosus. *Nat Genet* **38**: 343-349

Deel 7:BIJLAGEN

7.1.RECEPTEN

- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10 % FCS medium (DMEM +FCS)
 - o 500 ml DMEM
 - o 50 ml FCS
 - o 5 ml NEAA
 - o 5 ml kanamycine
 - o 5 ml streptomycine/penicilline
 - o 0,5 ml fungizone
- Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) zonder serum en antibiotica (DMEM -FCS -Ab)
 - o 500 mL DMEM
 - o 50 mL FCS
 - o 5 mL NEAA
- X-treme Gene siRNA transfectiemix (Roche)
 - o Oplossing A:
 - 99 µL Opti-MEM I
 - 11 µL X-treme Gene
 - o Oplossing B:
 - 107,69 µL Opti-MEM I
 - 13,31 µL miRNA 20µM stock
 - o 5' incuberen
 - o 110 µL B + A
 - o 20' incuberen
- Lipofectamine siRNA transfectiemix (Invitrogen)
 - o Oplossing A:
 - 100 µL Opti-MEM I
 - 4 µL X-treme Gene
 - o Oplossing B:
 - 107,69 µL Opti-MEM I
 - 13,31 µL miRNA 20µM stock
 - o 5' incuberen
 - o 110 µL B + A
 - o 20' incuberen
- Dharmafect siRNA transfectiemix (Thermo Scientific)
 - o Oplossing A:
 - 142,3 µL DMEM –FCS –Ab
 - 4,4 µL Dharmafect stock 11 µL X-treme Gene
 - o Oplossing B:
 - 68,57 µL Opti-MEM I
 - 12,1 µL miRNA 20µM stock
 - o 5' incuberen
 - o 73,33 µL A + B
 - o 20' incuberen
- 5x Roche Master mix
 - o 1 µL 5x mastermix Roche
 - o 0,25 µL FWD Primer (5 µM)
 - o 0,25 µL REV Primer (5 µM)
 - o 0,25 µL Resolight
 - o 1,25 µL H₂O

7.2.PROTOCOLS

7.2.1.CELCULTUUR

Evaluatie celgroei

- Indien cellen confluent groeien, dienen deze uitgesplitst worden
- Indien cellen nog niet confluent groeien, dient enkel het medium verversst te worden
- Flesjes die contaminatie vertonen dienen weggegooid te worden

Medium verversen

1. Neem met een pasteurpipet het medium van de cellen
2. Nieuw medium toevoegen met plasticen pipet: T25 en P60: 5mL, P75: 10 mL

Cellen splitsen

1. Neem met een Pasteur pipet het medium van de cellen
2. Voeg 1.5ml (T25) respectievelijk 2.5 ml (T75) EDTA/trypsine (Gibco®, Invitrogen™) toe
3. Incubeer de cellen 10 minuten bij 37 °C
4. Klop of schraap de cellen los

T25 flesjes : overbrengen naar P75 flesje

1. Breng 15 mL medium in T25 flesje
2. Breng 10 mL hiervan over naar een nieuw P75flesje

P75 flesjes: bewaren bij -80 °C of overbrengen naar P60 petrischaal

- bewaren bij -80 °C:
 1. Voeg 10 mL medium toe aan P75 flesje
 2. Pipetteer goed op en neer
 3. Breng alles over in een falcon
 4. Centrifugeer cellen 10' af bij 1200 rpm
 5. Verwijder met een pastuerpipet zo goed als al het medium van het pellet
 6. Bewaar bij -20 °C
- Transfer naar P60 petrischaal:
 1. Voeg 10 mL medium toe aan P75 flesjes
 2. Pipetteer goed op en neer
 3. Breng alles over in 2 P60 petrischalen (6 mL per petrischaal)

Cel oogsten van P60 platen

1. P60 platen hebben 1 week confluent laten groeien
2. Medium afzuigen met glaspipet
3. 2mL serumvrij medium toevoegen: zelfde recept als DMEM+FCS, maar dan zonder FCS
4. 24u incuberen bij 37 °C
5. Van elke P60 plaat wordt 1 staal ingevroren en 1 staal gebruikt voor RNA isolatie
6. Schraap cellen los met schrapertje
7. Breng cellen over in 15 ml falcon
8. Spoel na met 3 mL serumvrij medium en breng dit ook over in falcon
9. Centrifugeer 10' bij 12000 rpm
10. Verwijder medium met pasteurpipet
 - o Voor RNA isolatie: Verwijder zo veel mogelijk medium
 - o Voor invries: Verwijder zo goed als al het medium, bewaar bij -20°C

7.2.2.MIRNA ISOLATIE

“Purification of Total RNA, Including Small RNAs, from Animal Cells” (p19 van miRNeasy Mini Handbook)

1. Laat centrifuge afkoelen tot 4 °C
2. Breng 1 mL QIAzol over pellet
3. Zuig met naald en spuit 7 keer lyseoplossing op en neer
4. Pipetteer alles over naar nieuw epje
5. Incubeer 5' op kamer temperatuur
6. Voeg 140 µL chloroform toe,
7. Vortex oplossing in 15 korte pulsen
8. Incubeer 2'-3' op kamer temperatuur
9. Centrifugeer 15' centrifugeren bij 12000 rpm, 4 °C
10. Breng 350 µL uit bovenste fase over in nieuw epje
11. Voeg 1,5x het volume 100 % ethanol toe
12. Breng 700 µL van dit mengsel op spinkolom
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
13. Rest van het epje ook over filter brengen
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
14. 700 µL RWT buffer over filter brengen
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
15. 350 µL RWT buffer over filter brengen
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
16. Dnase buffer voorbereiden: 10 µL Dnase stock + 70 µL RDD buffer, zachtjes omkeren
17. Breng Dnase buffer op kolom (80µL)
18. 15' incuberen bij kamertemp
19. 350 µL RWT buffer over filter brengen
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
20. 500 µL RPE buffer over filter brengen
 - o Centrifugeer 15'', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
21. 500 µL RPE buffer over filter brengen
 - o Centrifugeer 2', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
22. Neem een nieuw Flow through buisje
 - o centrifugeer 1', 10 000 rpm
 - o Verwijder de Flow through
23. Breng spinkolom op nieuw epje
24. Voeg 30 µL RNase vrij water toe
25. Incubeer 1' bij kamer temperatuur
26. Centrifugeer 1' bij 10 000 rpm
27. Bewaar de flow through bij -80 °C

7.2.3.CONCENTRATIE BEPALING RNA

Nanodrop 2000 UV-VIS spectrofotometrie

1. Initialiseren: laadt RNase vrij water als blanco
2. Laadt Referentie oplossing
3. Breng 1,5 µL van elk staal op het oogje aan
4. Lees concentratie af in in ng/µl
5. Verdun naar 10 ng/µL (totaalvolume 10 µL)

7.2.4.KWALITEITSCONTROLE MIRNA

Experion™ RNA HighSens Analysis Kit Quick Guide

Temperature Equilibratie

- Verwijder een epje van elke kit reagentia uit de opslagplaats.
- Plaats de RNA ladder (rode kap) op ijs en laat alle andere reagentia opwarmen op kamertemperatuur gedurende 15 min.
- Vortex kort en centrifugeer de epjes voor gebruik, houdt de kleurstof uit het licht

Elektrodes reinigen

- Plaats de reinigingschip gevuld met 800 µL Experion electrode cleaner in de elektroforese oplossing
- Sluit het deksel voor 2 minuten, verwijder de reinigingschip
- Plaats een nieuwe reinigingschip gevuld met 800 µL DEPC-behandeld water in het elektroforese station
- Sluit het deksel voor 5 minuten. Vervang het water in de chip en herhaal deze stappen
- Verwijder de chip en laat het deksel open voor 1 minuut, zodat de elektrodes kunnen drogen

Prepare the Gel and Gel-Stain Solution

- Centrifugeer 600 µL RNA gel (groene deksel) in een spin kolom voor 10 minuten op 1500 g
- Let op: Ongebruikte RNA gel mag gedurende 1 maand bewaard worden bij 4 °C
- Pipetteer 85 µL gefiltreerde gel in een RNase vrij microcentrifuge epje, voeg 1 µL RNA kleurstof toe
- Zet het blauwe deksel op de gefiltreerde gel en vertex
- Centrifugeer de geloplossing op 13000 g voor 10 minuten

Bereid de stalen en de RNA ladder voor

- Pipetteer ten minste 5 µL RNA ladder (rode deksel) en ten minste 2 µL van elk RNA staal in RNase-vrije microcentrifuge epjes: denatureer de stalen en de ladder voor 2 minuten op 70 °C.
- Let op: Voor de RNA ladder, gebruik 1,5 mL epjes
- Let op: al seen aliquot van gedenuateerd RNA ladder bestaat, ontdooi op ijs en ga door naar stap 5. Warm GEEN verdunde RNA ladder opnieuw op
- Plaats de samples en de ladder onmiddellijk op ijs en laat staan voor 5 min
- Spin de tubes kort en mix, bewaar op ijs
- Voeg 795 µL DEPC-behandeld water toe aan het epje van 5 µL gedenuateerd RNA ladder en vortex kort.
- Aliquoteer gedenuateerde en verdunde RNA ladder. Bewaar een epje op ijs en vries onmiddellijk de overblijvende aliqots in op -70 °C

Bereid de chip voor

- Verwijder een RNA HighSens chip uit de verpakking en plaats het op het platform in het Experion priming station.
- Voeg 9 µL kleurstof toe aan de priming well
- Sluit het deksel van het priming station, stel de druk in op B en de tijd op 1
- Druk op start
- Wanneer de priming klaar is, verwijder de geprimede chip van het priming station
- Draai de chip om, kijk de microkanaaltjes goed na voor luchtballen of onvolledige priming

Laad de stalen en de RNA ladder op de chip

- Pipetteer 9 µL kleurstof in de GS-gelabelde well
- Pipetteer 9µL gefiltreerde gel in de G-gelabelde well
- Pipetteer voorzichtig enhancer oplossing in de SE-gelabelde well
- Pipetteer laadbuffer (geel capje) in de sample well (1-11) en in de L-gelabelde well (ladder well) Laat geen enkele well leeg
- Pipetteer 1 µL gedenuateerde, verdunde RNA ladder in de L-gelabelde well
- Pipetteer 1 µL gedenuateerd staal in elk van de 11 staaltjes-welletjes, pipetteer DEPC-behandeld water in alle ongebruikte stalen wells
- Plaats de chip in het experion vortex station en vortex gedurende 1 minuut.
- Laat de chip lopen in het experion elektroforese station voor 5 minuten

Loop de RNA highsense analyse

- Schakel het Experion elektroforese station uit en start de Experion software
- Plaats de chip op het platform van het elektroforese station en sluit het deksel
- Selecteer een nieuwe run en het gewenste RNA Highsens Assay (Eukaryotic, Prokaryotic Total RNA, of Eukaryotic mRNA)
- Klik op start om de run te beginnen
- Wanneer de run voltooid is, verwijder de gebruikte chip en gooi hem weg

Reinig de elektrodes

- Plaats een reinigingschip gevuld met 800 µL DEPC-behandeld water op het elektroforese station
- Sluit het deksel gedurende 1 minuut om de elektroden te reinigen, open opnieuw voor 1 minuut om de elektroden te laten drogen
- Verwijder de chip

7.2.5.MIRNA PROFILERING

1. Reverse transcriptase: RNA → cDNA

- Alles in tweevoud: pool A en pool B
- Mastermix per staal, per pool: (fout: 0,5 staal bijtellen)
 - o Voor alle stalen: in 1 epje

Megaplex RT Primers (10x)	0,8 µl
dNTPs with dTTP (100mM)	0,2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	1,5 µl
10X RT Buffer	0,8 µl
MgCl ₂ (25mM)	0,9 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,1 µl
Nuclease-free H ₂ O	0,2 µl
Totaalvolume	4,5 µl

- o 4,5 µl uitverdelen in strips
- Mastermix + staal

Mastermix	4,5 µl
RNA (10 ng/µl)	3 µl
• Totaalvolume	7,5 µl

- MyCycler: programma Megaplex RT

Stage	Temp (°C)	Time
40 cycli	16	2 min
	42	1 min
	50	1 sec
Hold	85	5 min
Hold	4	∞

- Materiaal:
 - o Epje (mastermix)
 - o 2 strips van 8 wells (1 well per staal) (pool A en pool B)
 - o Megaplex RT primers Human Pool A v2.1
 - o Megaplex RT primers Human Pool B v3.0
 - o TaqMan Micro RNA reverse Transcription Kit
 - o Nucleasevrij water

2. Pre-amplificatie: cDNA

- Alles in tweevoud: pool A en pool B
- Mastermix per staal, per pool: (fout: 1 staal bijtellen)
 - o Voor alle stalen: in 1 epje

TaqMan PreAmp Master Mix (2x)	12,5 μ l
Megaplex PreAmp Primers (10x)	2,5 μ l
Nuclease-free H ₂ O	7,5 μ l
<i>totaalvolume</i>	<i>22,5 μl</i>

- o 22,5 μ l uitverdelen in strips
- Mastermix + staal
- MyCycler: programma pre-amp 12 cycli nieuw

Stage	Temp (°C)	Time
Hold	95	10 min
Hold	55	2 min
Hold	72	2 min
12 cycli	95	15 sec
	60	4 min
Hold	99,9	10 min
Hold	4	∞

- o Reactievolume 25 μ l

Mastermix	22,5 μ l
RT-product	2,5 μ l
<i>Totaalvolume</i>	<i>25 μl</i>

- Materiaal:
 - o Epje (mastermix)
 - o 2 strips van 8 wells (1 well per staal) (pool A en pool B)
 - o Megaplex PreAmp Primers Human Pool Av2.1
 - o Megaplex PreAmp Primers Human Pool Bv3.0
 - o Taqman PreAmp MM (2x)
 - o Nucleasevrij water

3. Verdunning pre-amplificatieproduct

- cDNA preamp Pool A (25µl) + 75µl Nuclease-free H₂O
- cDNA preamp Pool B (25µl) + 75µl Nuclease-free H₂O

4. qPCR

a. aanmaak gespotte 384 well platen

Scripts TECAN (user defined, c:\progr.files\tecan\evoware\database\scripts\pdmestda)

Per staal: 2 volledige 384 well platen

Plaat 1: primerplaat A – D

Plaat 2: primerplaat E – H

- 17x verdunnen stockprimers (bv 10 µl primers + 160 µl H₂O)
(2008_06_12_miRNAverdunning_water, 2008_06_12_miRNAverdunning_primers)
- Spotten 1,5 µl primers in 384 well plaat (2010_11_19_spotten)

b. aanmaak sample mix (1 staal)

	1 plaat	2 platen
AB 2x mix	1182 µl (= 2 x 591 µl)	2362,5 µl (=3 x 787,5 µl)
Nucleasevrij H ₂ O	142 µl	283,5
cDNA pool A ^(*)	14 µl	27 µl
cDNA pool B ^(*)	14 µl	27 µl
<u>Totaalvolume</u>	<u>1352 µl</u>	<u>2700 µl</u>

^(*)Verdund pre-ampproduct

- 1 plaat: 85 µl sample mix uitverdelen in eerste 16 wells (2 strips van 8 wells)
- 2 platen: 160 µl sample mix uitverdelen in eerste 16 wells (2 strips van 8 wells)
- Materiaal:
 - o Epje (1 plaat) of Falcon 15 (2 platen) voor sample mix
 - o AB 2x mix (afschermen van licht!+ langzaam pipeteren)
 - o Nucleasevrij water

c. toevoegen sample mix aan primers (Innovadyne Nanodispenser)

- Programma: DPCR-384_modified washing_STRIP.seq (c://prog.files/ITI/nanobuilder/sequences)
- Protocol: 384_6M_8st_-1 (pcr pattern viewer)
- Parameters:

Tabblad experiment	# primers	6
	# samples	8
	Pattern opt.	-1
	Dispens order	1 ^(*)
Tabblad samples	Disp. Vol (nl)	2000
	Asp. Overfill	1,5
	Asp. Overfill constante (nl)	8000

	Asp. Height	800
--	-------------	-----

(*) 1 = sample plaat eerst dispensen

Vervolgens 2x op "OK"

Bij wissel naar primers: "cancel"

- Samples dispensen: bleech in wasbakje
- Primers dispensen: water in wasbakje
- Platen sealen m.b.v. e-seal toestel

d. Runnen platen op Abi7900HT, LC480 of CFX toestel

- Programma:

Pré-incubatie	50°C	2:00		
Incubatie	95°C	10:00		
Cooling step (40x)	95°C	0:15	60°C	1:00

7.2.6. VOORBEREIDING TRANSFECTIE

- Voeg 2 mL trypsine toe aan T75 flesje
- Incueer 10' bij 37 °C
- Breng alles over in een falcon
- Spoel het T75 flesje na met 1 ml medium, breng over in een falcon
- Centrifugeer 10' afdraaien, 10 000 rpm
- Verwijder het supernatans en resuspendeer in 3 ml medium
- Voeg aan elke well van een 6-well plaat 0.5 mL mengsel toe
- Voeg aan elke well 1.5 ml medium toe
- Laat cellen groeien tot 50-60 % confluente

7.2.7. TRANSFECTIE

● X-TREME GENE siRNA TRANSFECTION PROTOCOL

- Neem met een pasteur pipet het medium van de cellen
- Voeg 2 mL Versene toe en neem dit onmiddellijk weer weg met een pasteurpipet
- Voeg 2ml DMEM zonder FCS en antibiotica toe
- Bereid oplossingen a en b, zowel voor premiR als antimiR:
 - o A: 99 µL Opti-MEM I + 11 µL X-treme Gene
 - o B: 107,69 µL Opti-MEM I + 13,31 µL miRNA 20µM stock (premiR of antimiR)
- Incubeer 5' bij kamer temperatuur
- Bereid premiR en antimiR transfectiemix: 110 µL van B toevoegen aan A en op en neer pipetteren
- Incubeer 20' bij kamer temperatuur
- Neem met een pasteur pipet het medium van de cellen
- Voeg toe aan de cellen:
 - o + controle: 200 µL van premiR transfectiemix
 - o - controle: 200 µL van antimiR transfectiemix
 - o Blanco: 200 µL van oplossing A
- Incubeer 4-5u bij 37°C, 5% CO₂
- Voeg 200 µL 10 % FCS toe aan elke well

● LIPOFECTAMINE siRNA TRANSFECTION PROTOCOL

- Bereid oplossingen A en B, zowel voor premiR als antimiR:
 - o A: 100 µL Opti-MEM I + 4 µL Lipofectamine
 - o B: 107,69 µL Opti-MEM I + 13,31 µL miRNA 20µM stock (premiR of antimiR)
- Incubeer 5' bij kamer temperatuur
- Bereid premiR en antimiR transfectiemix: 110 µL van B toevoegen aan A en op en neer pipetteren
- Incubeer 20' bij kamer temperatuur
- Verwijder het medium van alle cellen
- Voeg toe aan de cellen:
 - o + controle: 200 µL van premiR transfectiemix
 - o - controle: 200 µL van antimiR transfectiemix

- Blanco: 200 μ L van oplossing A
- Incubeer 4-5u bij 37°C, 5% CO₂
- Voeg 2000 μ L DMEM + 10 % FCS toe aan elke well

● DHARMAFECT siRNA TRANSFECTION PROTOCOL

- Neem met een pasteur pipet het medium van de cellen
- Voeg 2 mL Versene toe en neem dit onmiddellijk weer weg met een pasteurpipet
- Voeg 2ml DMEM zonder FCS en antibiotica toe
- Bereid oplossingen a en b, zowel voor premiR als anti-miR:
 - A: 142.3 μ L DMEM –FCS – antibiotica + 4.4 μ L Dharmafect stock
 - B: 68.57 μ L Opti-MEM I + 12,1 μ L miRNA 20 μ M stock (premiR of anti-miR)
- Incubeer 5' bij kamer temperatuur
- Bereid transfectiemix: 73.33 μ L van A toevoegen aan B en op en neer pipetteren
- Incubeer 20' bij kamer temperatuur
- Neem met een pasteur pipet het medium van de cellen
- Voeg toe aan de cellen:
 - + controle: 200 μ L van premiR transfectiemix
 - – controle: 200 μ L van anti-miR transfectiemix
 - Blanco: 200 μ L van oplossing B
- Incubeer 4-5u bij 37°C, 5% CO₂
- Voeg 200 μ L 10 % FCS toe aan elke well

7.2.8.RNA ISOLATIE

- Bereid de lyse oplossing: 1ml RLT buffer + 10 μ L β mercaptoethanol. -> 600 μ L/staal nodig
- Breng 600 μ L lysebuffer op celpellet
- Zuig met naald en spuit 7 keer lyseoplossing op en neer
- Voeg 600 μ L 70 % ethanol toe en pipetteer goed op en neer
- Breng 700 μ L hiervan op een spinkolom
 - Centrifugeer 15", 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Breng de rest van het epje ook op de spinkolom
 - Centrifugeer 15", 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Breng 350 μ L RW1 buffer op de spinkolom
 - Centrifugeer 15", 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Bereid Dnase buffer: 10 μ L Dnase stock + 70 μ L RDD buffer, zachtjes omkeren
- Breng 80 μ L Dnase buffer op de spinkolom
- Incubeer 15' bij kamertemp
- Breng 350 μ L RW1 buffer op spinkolom
 - Centrifugeer 15", 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Breng 500 μ L RPE buffer op spinkolom
 - Centrifugeer 15", 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Breng 500 μ L RPE buffer op spinkolom
 - Centrifugeer 2', 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Neem een nieuw Flow through buisje
 - Centrifugeer 1', 10 000 rpm
 - Verwijder de Flow through
- Breng spinkolom op nieuw epje
- Voeg 50 μ L RNase vrij water toe
- Incubeer 1' bij kamer temperatuur
- Centrifugeer 1' bij 10 000 rpm
- Bewaar de flow through bij -80 °C

7.2.9.cDNA SYNTHESE

- startmateriaal: 2 μ g van totaal RNA in Rnase vrije 0,2 ml tube
- alles overbrengen van in een 0,2 mL PCR strip
- Voeg 4 μ L iScript reactie mix toe
- Voeg 1 μ L iScript reverse transcriptase toe
- Vul aan met nuclease vrij water tot 20 μ L
- Thermocycler: 5': 25°C, 30': 42 °C, 5': 85 °C
- Verdun 10x (voeg 180 μ L nuclease vrij water toe)
- Aliquoteer in 50 μ L volumes en vries in bij -20 °C

7.2.10. EXPRESSIE ANALYSE RNA

- Bereid de Roche 5x Mastermix:

Product (volumes in μl / sample)	Volume
5x mastermix Roche	1
FWD Primer (5 μM)	0,25
REV primer (5 μM)	0,25
Resolight	0,25
H ₂ O	1,25

- Voeg 3 μL mastermix toe per well van een 384 well plaat
- Voeg 2 μL cDNA toe per well
- Sluit de plaat af met folie
- Centrifugeer de plaat kort gedurende 30"
- Breng de plaat in het LC 480 en start de run:

1	Pre-incubatie	1' bij 95 °C (4.8°C/s)		
2-46	amplificatie	3" bij 95 °C (4.8 °C/s)	30" bij 60 °C (2.5 °C/s)	10" bij 72 °C (4.8°C/s) -> single detection
47	Smeltcurve	5" bij 95 °C (4.8 °C/s)	1' bij 60 °C (2.5 °C/s)	T verhogen met 0.11 °C/s tot 97 °C -> continuous detection
48	Cooling	T verlagen met stappen van 2 °C/s tot 40 °C (30")		

- Analyseer het resultaat in qBaseplus

7.2.11. DATA VERWERKING

- Alle waarden > 32 worden "NA" : =IF(> 32_alles!B8="NA";32;> 32_alles!B8)
- Bereken het totale aantal NA's en het gemiddelde per staal: =COUNTIF(B9:AA9;"NA")
- Verwijder stalen die mislukt zijn (hoog gemiddelde Cq en veel NA's)
- Bereken het totale aantal NA's per miRNA: =COUNTIF(B9:AA9;"NA")
- Verwijder miRNA's met meer dan 5 NA's per staal, met de filterfunctie
- Normaliseren: Trek van elke waarde het gemiddelde van het staal af en wissel van teken: =IF(> 32_zonder controles!B9="NA";"NA";(> 32_zonder controles!B9-B\$7)*-1)
- Bereken het minimum van elke miRNA: =MIN(B9:AA9)
- Imputeren: ken aan elke NA de minimumwaarde van het miRNA toe: =IF('NA > 5 eruit!B9="NA";'NA > 5 eruit!\$AF9;'NA > 5 eruit!B9)

7.3.STALEN

Tabel 10. Lijst met stalen die gegroeid werden in celcultuur, samen met aandoening, gen en mutatie van de patiënt.

	Naam staal	Fibroblast nr	Aandoening	Gen	Mutatie	RNA conc (ng/µl)
1	VLL	F0900663	Controle			90,9
2	VS	00K1242	MFS	FBN1	p.Cys685Trp	119,8
3	SMJR	02K1577	MFS	FBN1	p.Cys1140Phe	253,8
4	BG	F0900482	LDS	TGFBR2	p.Ala355Pro	182,4
5	DBS	F0900555	Controle			144,3
6	VC	F0800385	LDS	TGFBR2	p.Arg528Cys	182,9
7	CB	F0900481	LDS	TGFBR2	p.Pro427Leu	238,2
8	MS	03K1769	MFS	FBN1	p.Asp1766fsX	104,4
9	DL	F0800710	Controle			155,4
10	WL	F0800362	LDS	TGFBR2	p.Asp446Asn	124,9
11	BC	F070359	Controle			248,9
12	Larbi	F070497	Controle			120,1
13	AE	F0900014	Controle			178,3
14	SL	F060093	Controle			148,8
15	MG	02K1539	MFS	FBN1	p.Cys557Tyr	79,3
16	BE	F070519	Controle			153,5
17	DJ	99K1106	MFS	FBN1	p.Cys1055Tyr	134,5
18	SM	99K1136	MFS	FBN1	p.Cys1339Tyr	141,7
19	FP	02K1740	MFS	FBN1	p.Cys102X	146,1
20	TSV	02K1544	MFS	FBN1	p.Cys1736X	168,6
21	CO	99K1127	LDS	TGFBR2	p.Tyr336Asn	177,2
22	NB	01K1453	MFS	FBN1	p.Glu812X	115,8
23	PC	F0900554	Controle			87,3
24	DS (115)	F070115	Controle			227,3
25	DS (39)	F0900039	Controle			245
26	PA	03K1846	MFS	FBN1	p.Cys684Arg	78,4
27	PV	F0900558	Controle			94,8

7.4.RESULTATEN

7.4.1.TESTEXPERIMENT

Om het optimale tijdstip van miRNA isolatie te bepalen, werd een testexperiment opgesteld. Hierbij werden cellen van 2 MFS patiënten en 2 controles in cultuur gehouden. Op een verschillend tijdstip werden de cellen geoogst voor miRNA isolatie, bij 80 % confluentie, en na één week conflente groei. Het miRNA werd geprofileerd en de resultaten onderling vergeleken. (Tabel 11) Deze wijzen op een relevanter resultaat wanneer de cellen nog één week confluent gegroeid worden.

Tabel 11. Resultaat van het testexperiment. De genormaliseerde expressieniveaus van miRNA's is weergegeven. miRNA's die zowel op tijdstip 1 als op tijdstip 2 als significant geïdentificeerd werden, werden met kleur aangeduid.

Tijdstip 1		Tijdstip 2	
miRNA	expressie	miRNA	expressie
hsa-miR-146a	3,492431204	hsa-miR-135b	4,18924987
hsa-miR-135b	3,476459704	hsa-miR-146a	3,10043087
hsa-miR-488	2,925300438	hsa-miR-203	2,950558685
hsa-miR-1274B	2,364923704	hsa-miR-886-5p	2,85501487
hsa-miR-629_TM1562	2,355372704	hsa-miR-146b	2,83664887
hsa-miR-329	2,354233704	hsa-miR-215	2,694091056
hsa-miR-335	-2,4818003	hsa-miR-483-5p	2,34110816
hsa-miR-489	-2,5808278	hsa-miR-302a	2,263670056
hsa-miR-204	-4,3995213	hsa-miR-204	-2,71372763
		hsa-miR-133a	-5,521804606

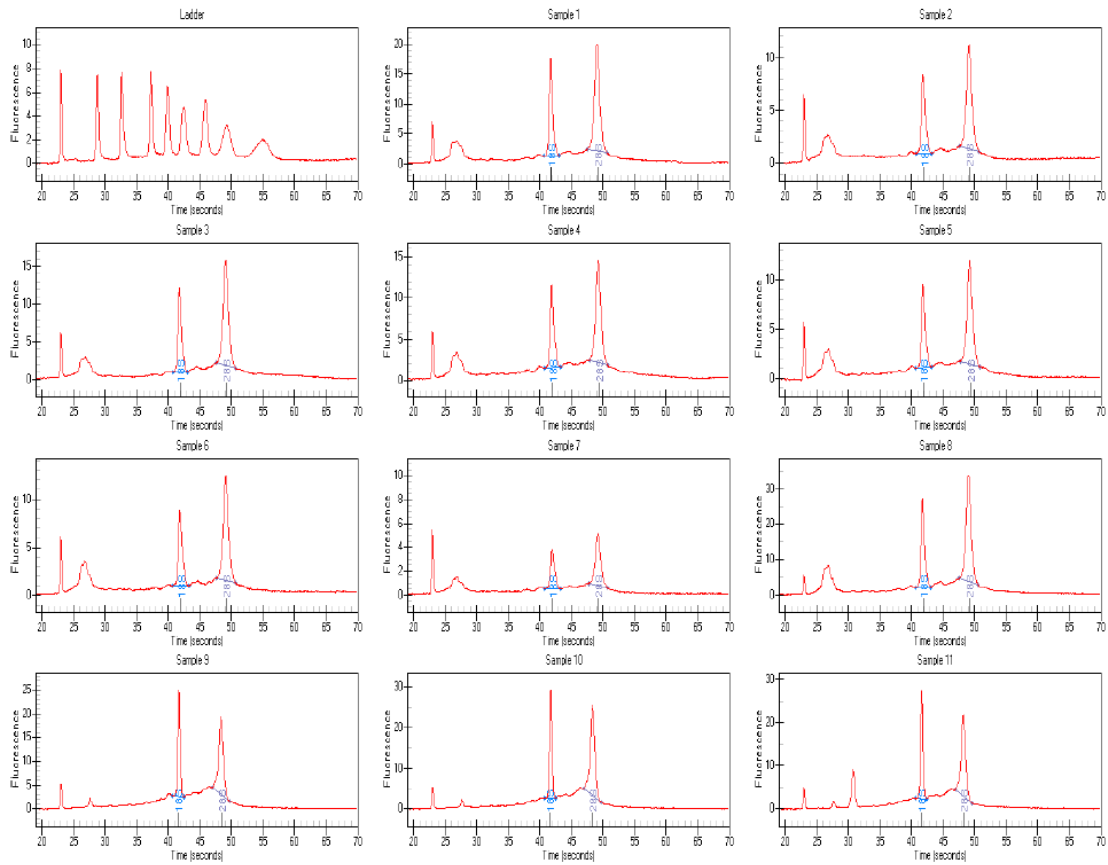
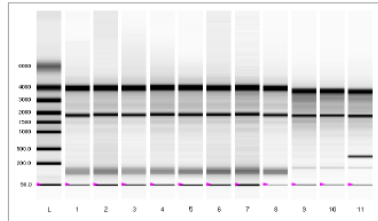
7.4.2.MiRNA KWALITEITSCONTROLE

Run Overview Report

Page 1 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

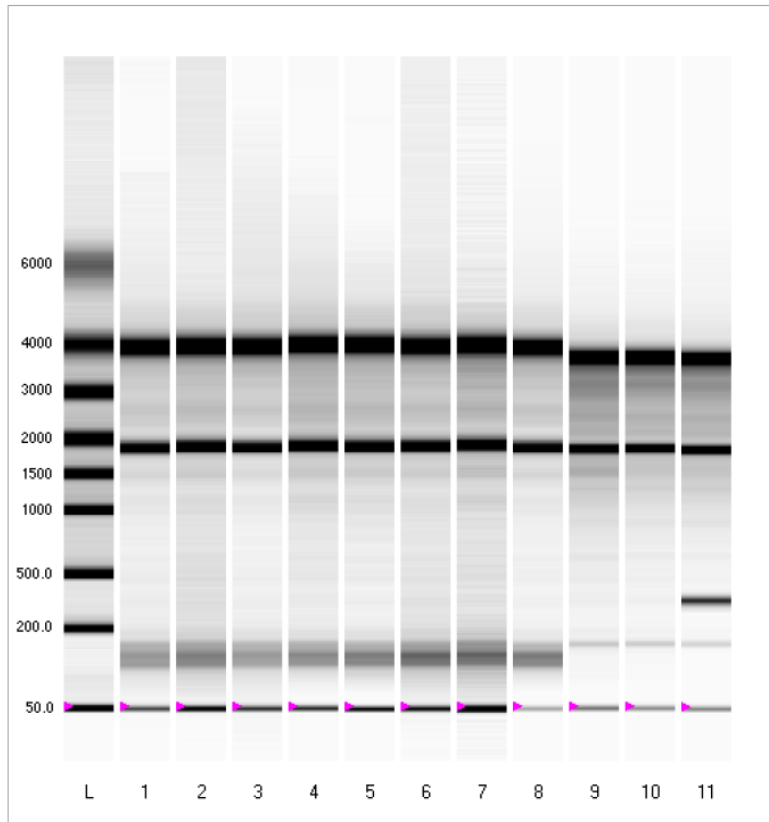
Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A



Virtual Gel Report

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

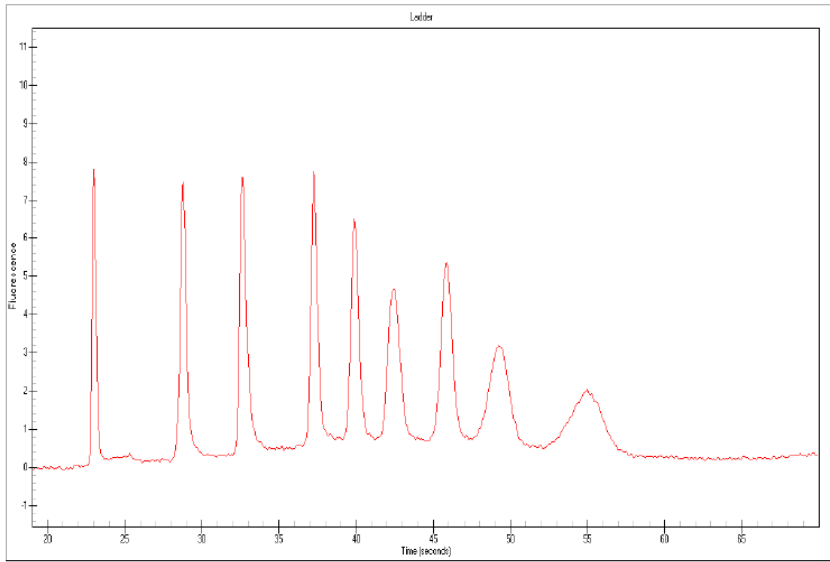


Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# Ladder



Well# Ladder

RNA Area: 107.21
 RNA Concentration: 1,000.00 pg/μl

Well# Ladder

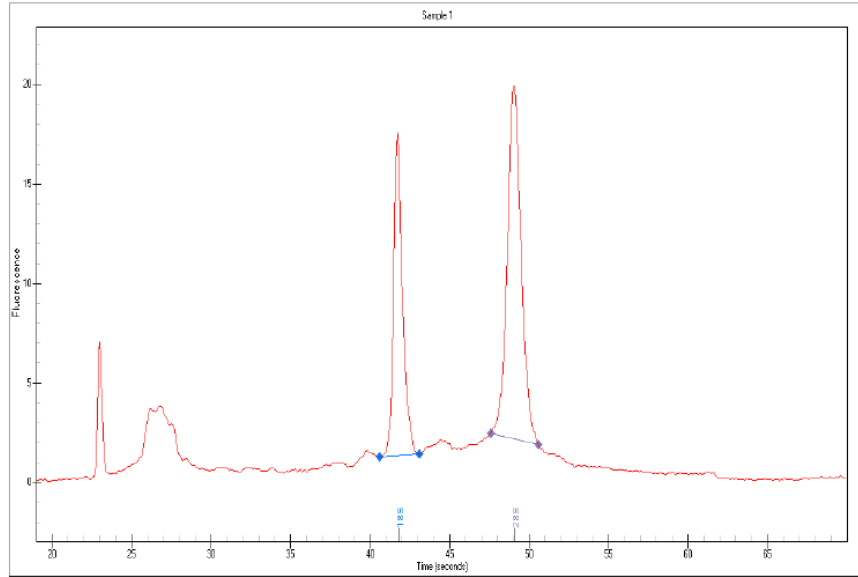
Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	10.76	
	2	28.80	13.50	
	3	32.60	14.35	
	4	37.25	11.99	
	5	39.90	11.10	
	6	42.45	11.43	
	7	44.00	0.99	
	8	45.85	11.37	
	9	49.25	10.85	
	10	55.00	8.06	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 1 Sample 1



Well# 1 Sample 1

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.60	43.10	25.11	15.66
2	28S	47.65	50.60	36.41	22.71

RNA Area: 160.35
 RNA Concentration: 1,495.66 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.45
 RQI: 9.3 ■

Well# 1 Sample 1

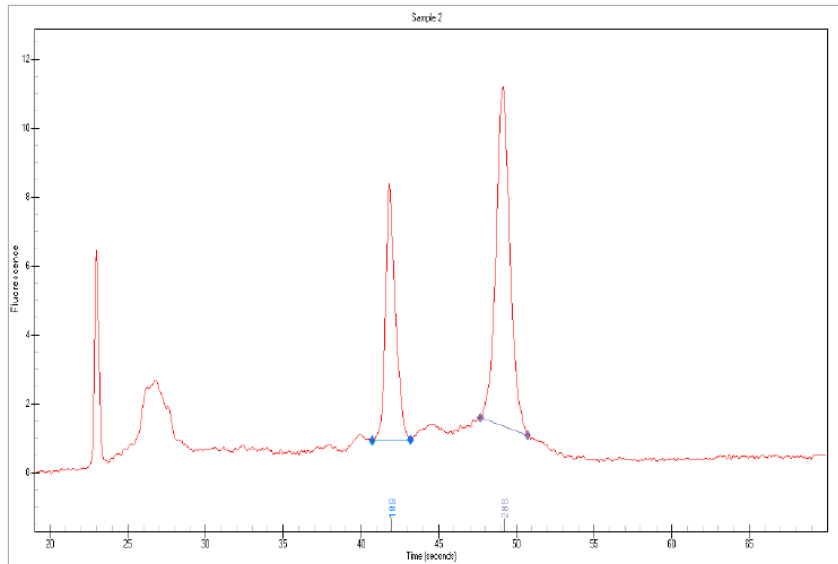
Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	9.33	
	2	26.19	10.14	
	3	26.79	11.48	
	4	27.54	5.59	
	5	28.39	2.98	
	6	29.44	1.07	
	7	32.43	1.86	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 2 Sample 2



2

Well# 2 Sample 2

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.75	43.20	12.99	13.21
2	28S	47.70	50.70	20.90	21.25

RNA Area: 98.34
 RNA Concentration: 917.29 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.61
 RQI: 8.8 ■

Well# 2 Sample 2

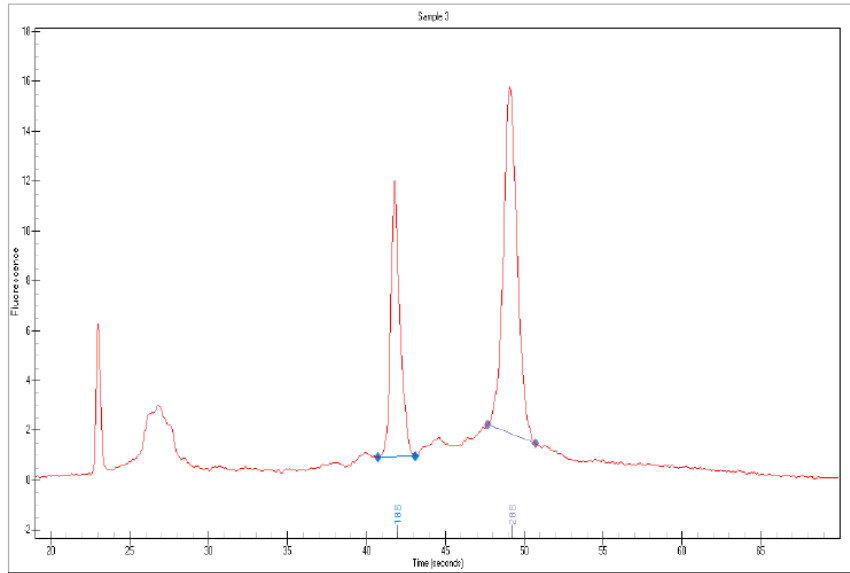
Peak State	Peak Number	Mir. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	8.40	
	2	26.26	4.78	
	3	26.76	9.78	
	4	40.02	0.75	
	5	41.85	15.10	
	6	49.12	25.79	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 3 Sample 3



Well# 3 Sample 3

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.75	43.10	17.63	14.04
2	28S	47.70	50.70	28.94	23.04

RNA Area: 125.59
 RNA Concentration: 1,171.44 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.64
 RQI: 9.5

Well# 3 Sample 3

Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	9.12	
	2	26.44	6.71	
	3	26.83	12.78	
	4	28.41	1.38	
	5	38.19	0.76	
	6	39.96	3.06	
	7	41.77	21.92	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 8 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

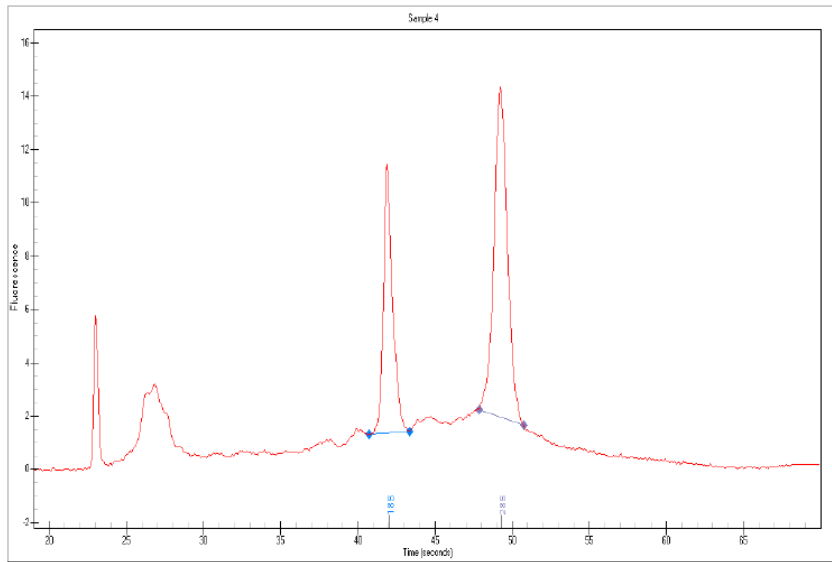
Well# 3 Sample 3				
Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comment:
	8	44.57	2.89	
	9	45.16	2.10	
	10	47.38	2.57	
	11	49.10	41.29	
	12	51.31	4.12	
	13	54.99	0.60	
	14	57.35	0.54	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 4 Sample 4



4

Well# 4 Sample 4

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.75	43.35	16.35	11.89
2	28S	47.85	50.80	25.56	18.57

RNA Area: 137.59
 RNA Concentration: 1,283.37 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.56
 RQI: 9.0 ■

Well# 4 Sample 4

Peak State	Peak Number	Min. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	8.54	
	2	26.36	7.35	
	3	26.85	14.11	
	4	28.31	2.28	
	5	29.38	1.11	
	6	30.65	1.74	
	7	32.79	1.42	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 10 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

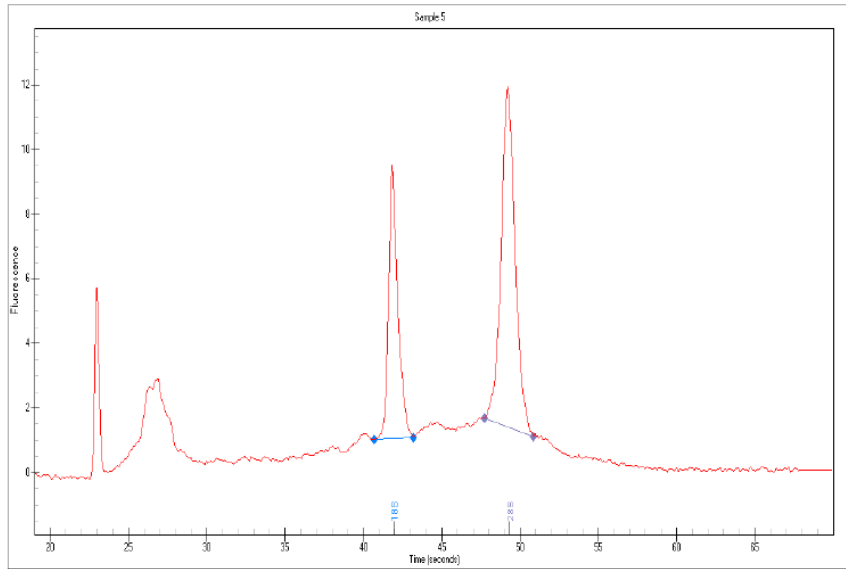
Well# 4 Sample 4				
Peak State	Peak Number	Mid. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	35.38	1.79	
	9	38.25	1.75	
	10	39.91	2.11	
	11	40.20	1.78	
	12	41.91	23.21	
	13	43.86	2.51	
	14	44.73	3.28	
	15	49.26	40.03	
	16	52.72	0.87	
	17	53.36	1.06	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 5 Sample 5



5

Well# 5 Sample 5

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.70	43.20	13.73	11.43
2	28S	47.80	50.85	22.06	18.37

RNA Area: 120.09
 RNA Concentration: 1,120.16 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.61
 RQI: 9.2 ■

Well# 5 Sample 5

Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	7.95	
	2	26.35	6.79	
	3	26.88	11.84	
	4	28.34	1.41	
	5	32.41	0.83	
	6	38.04	1.50	
	7	41.83	19.48	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 12 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

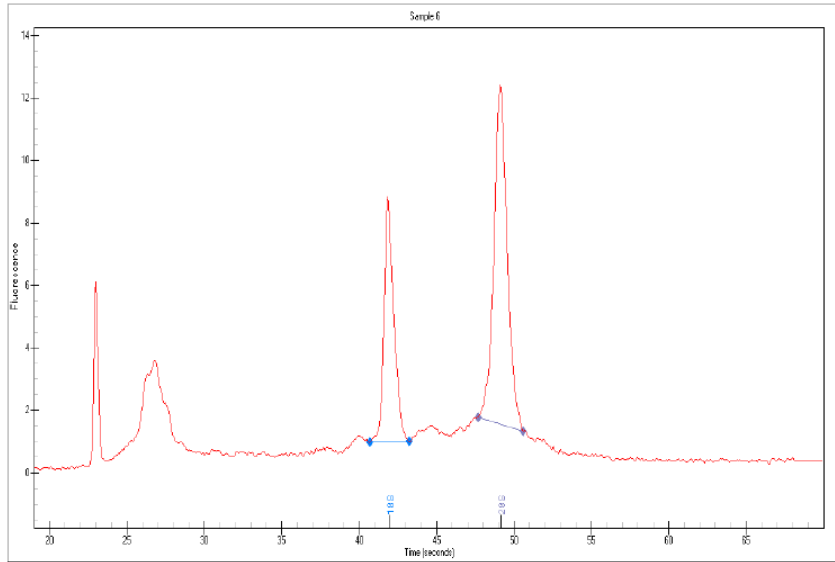
Well# 5 Sample 5				
Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	44.69	2.54	
	9	45.37	1.70	
	10	49.20	30.86	
	11	51.63	2.17	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 6 Sample 6



6

Well# 6 Sample 6

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.70	43.25	13.66	12.72
2	28S	47.70	50.65	21.91	20.39

RNA Area: 107.44
 RNA Concentration: 1,002.15 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.60
 RQI: 8.9 ■

Well# 6 Sample 6

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	8.89	
	2	26.38	7.43	
	3	26.82	15.16	
	4	28.48	2.60	
	5	33.08	0.75	
	6	40.03	2.06	
	7	41.84	17.06	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 14 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

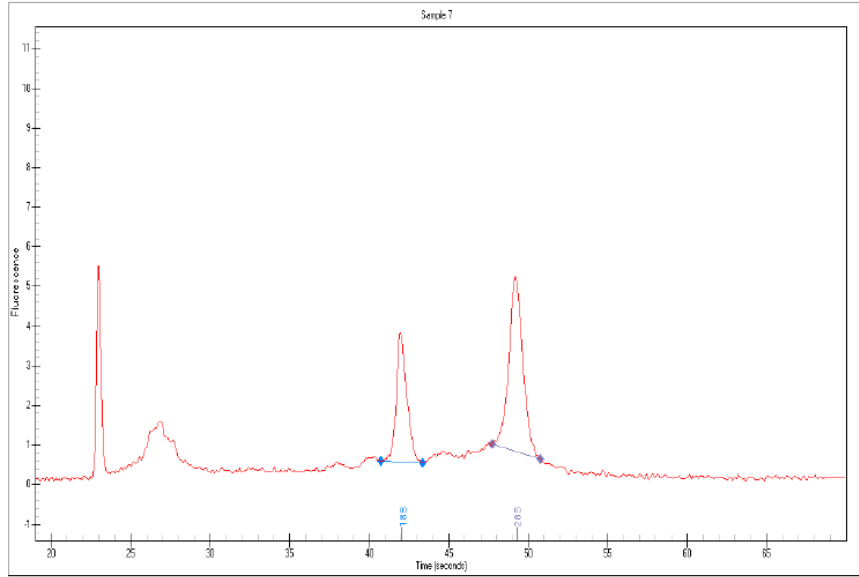
Well# 6 Sample 6				
Peak State	Peak Number	Mid. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	44.68	2.51	
	9	45.27	1.21	
	10	49.13	31.06	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 7 Sample 7



7

Well# 7 Sample 7

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.75	43.40	5.91	11.51
2	28S	47.80	50.80	9.00	17.53

RNA Area: 51.33
 RNA Concentration: 478.78 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.52
 RQI: 8.7 ■

Well# 7 Sample 7

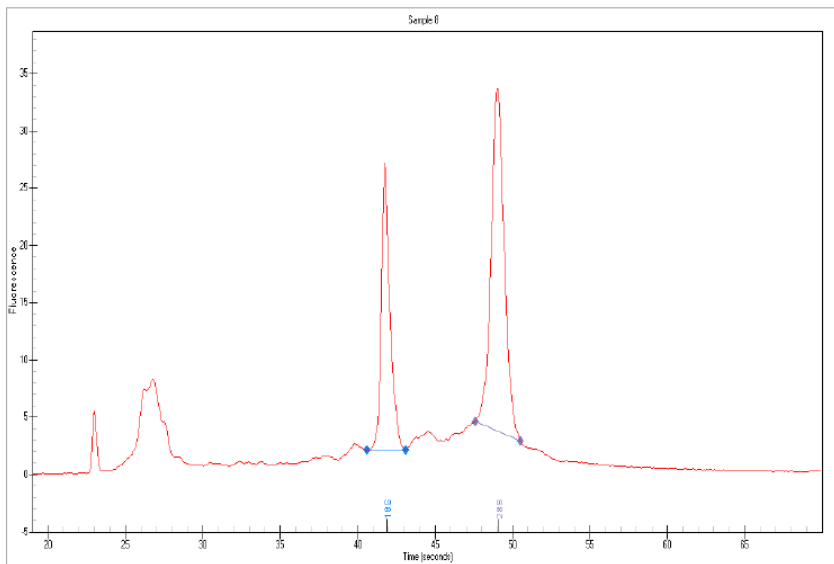
Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	7.78	
	2	26.24	1.97	
	3	26.93	2.99	
	4	27.62	1.29	
	5	41.97	6.31	
	6	49.19	11.57	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 8 Sample 8



8

Well# 8 Sample 8

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.65	43.10	38.22	13.83
2	28S	47.65	50.55	60.29	21.82

RNA Area: 276.31
 RNA Concentration: 2,577.27 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.58
 RQI: 9.4

Well# 8 Sample 8

Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	6.96	
	2	26.27	20.58	
	3	26.77	25.30	
	4	27.51	13.47	
	5	30.48	3.53	
	6	36.58	1.58	
	7	37.33	2.52	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 17 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

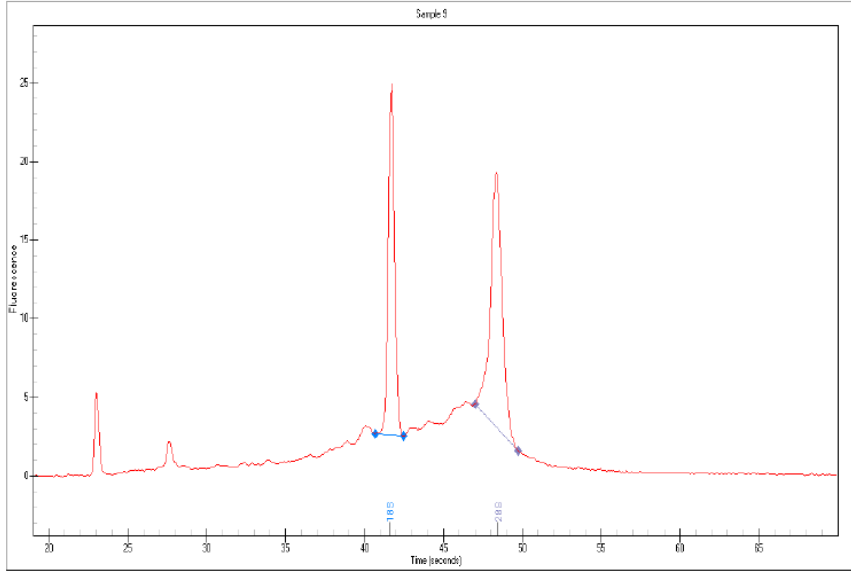
Well# 8 Sample 8				
Peak State	Peak Number	Mig. Time (sec)	Corrected Area	Comments
	8	38.07	4.02	
	9	39.80	9.14	
	10	41.74	49.26	
	11	43.77	5.05	
	12	44.56	10.21	
	13	46.45	4.82	
	14	49.02	86.18	
	15	51.40	5.02	
	16	55.47	1.02	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 9 Sample 9



Well# 9 Sample 9

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.70	42.45	24.46	14.00
2	28S	47.05	49.80	28.83	16.49

RNA Area: 174.79
 RNA Concentration: 1,630.33 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.18
 RQI: 9.0 ■

Well# 9 Sample 9

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	7.58	
	2	27.63	3.76	
	3	28.58	1.37	
	4	30.67	1.53	
	5	32.41	1.54	
	6	33.95	2.46	
	7	36.59	3.14	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 19 of 23

Project: Imported Runs Acq. Analyst: DefaultUser
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM Signature: N/A
Run Version: N/A

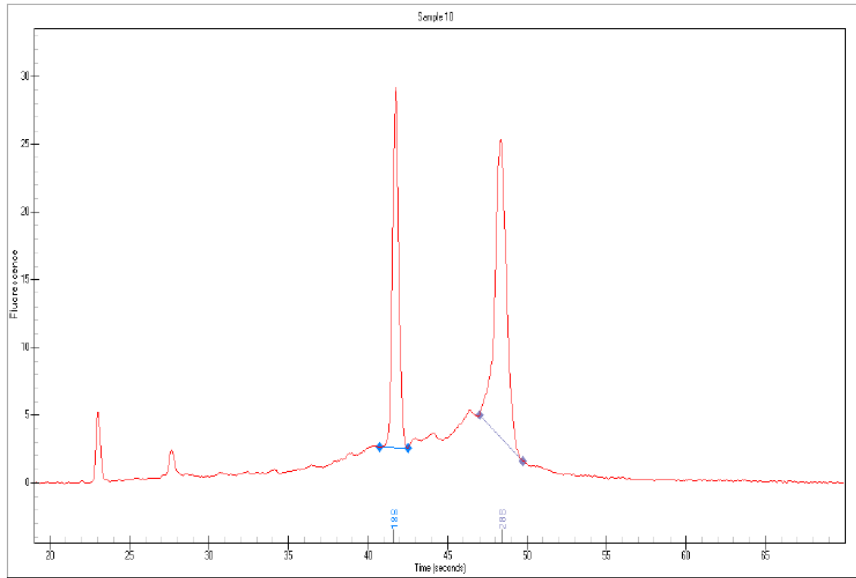
Well# 9 Sample 9				
Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	38.88	4.32	
	9	40.08	8.82	
	10	41.72	34.88	
	11	42.91	5.65	
	12	44.11	8.18	
	13	46.40	8.26	
	14	48.34	51.77	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 10 Sample 10



10

Well# 10 Sample 10

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.75	42.50	28.34	14.79
2	28S	47.05	49.75	38.23	19.94

RNA Area: 191.67
 RNA Concentration: 1,787.73 pg/ul
 Ratio[28S/18S]: 1.35
 RQI: 9.2



Well# 10 Sample 10

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	7.13	
	2	27.65	4.47	
	3	30.65	1.70	
	4	32.40	1.44	
	5	36.45	4.35	
	6	37.90	2.84	
	7	39.00	4.62	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Page 21 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

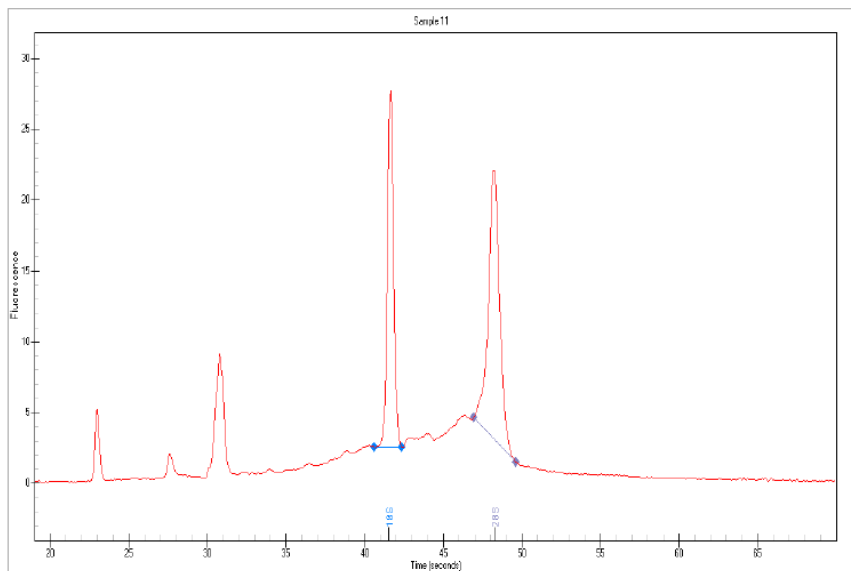
Well# 10 Sample 10				
Peak State	Peak Number	Min. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	41.75	37.02	
	9	43.00	6.01	
	10	44.15	9.86	
	11	46.40	15.63	
	12	48.35	59.42	
	13	50.35	3.67	
	14	52.55	0.87	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

Project: Imported Runs
 Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
 Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
 Run Version: N/A

Acq. Analyst: DefaultUser
 Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
 Signature: N/A

Well# 11 Sample 11



11

Well# 11 Sample 11

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	40.65	42.40	27.28	14.45
2	28S	46.95	49.60	32.95	17.45

RNA Area: 188.83
 RNA Concentration: 1,761.27 pg/μl
 Ratio[28S/18S]: 1.21
 RQI: 9.2

Well# 11 Sample 11

Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	1	23.00	7.23	
	2	27.61	3.55	
	3	30.77	19.03	
	4	32.27	1.22	
	5	36.48	2.98	
	6	38.88	4.11	
	7	41.64	36.23	

Egram, Gel Lane and Result Table Report

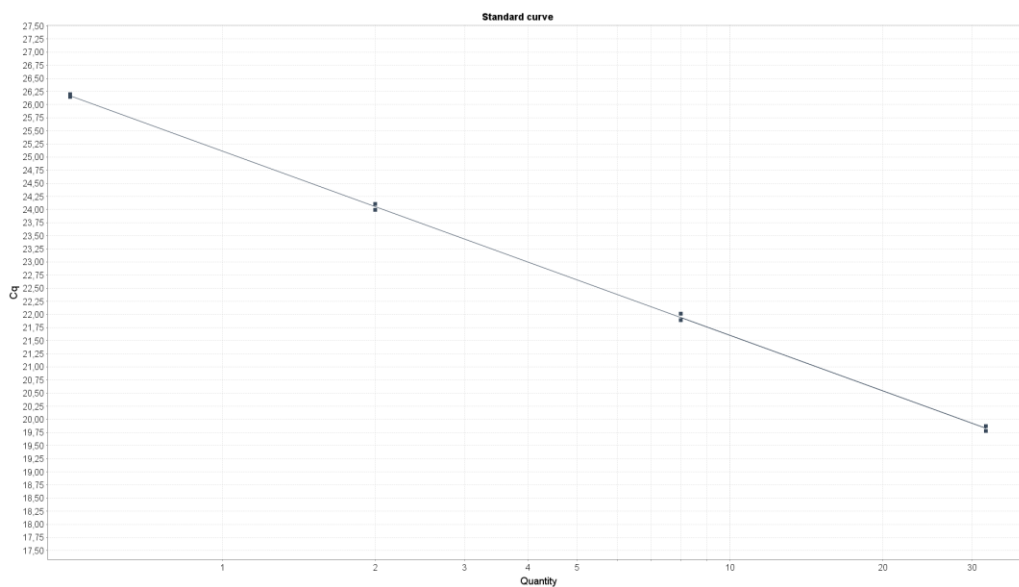
Page 23 of 23

Project: Imported Runs
Assay: Eukaryote Total RNA HighSens
Run: 15022011_2-15-2011_10-22-58 AM
Run Version: N/A

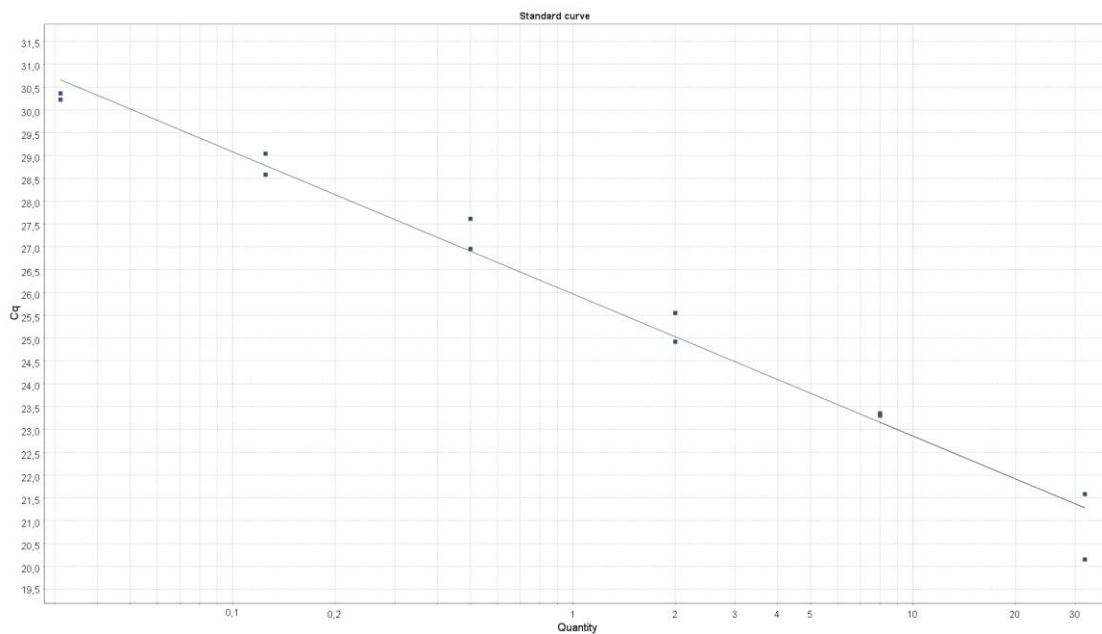
Acq. Analyst: DefaultUser
Acq. Time: 2/15/2011 10:22:59 AM
Signature: N/A

Well# 11 Sample 11				
Peak State	Peak Number	Mig. Time (secs)	Corrected Area	Comments
	8	42.84	6.94	
	9	43.95	6.69	
	10	46.35	12.60	
	11	48.20	50.18	
	12	50.91	1.11	

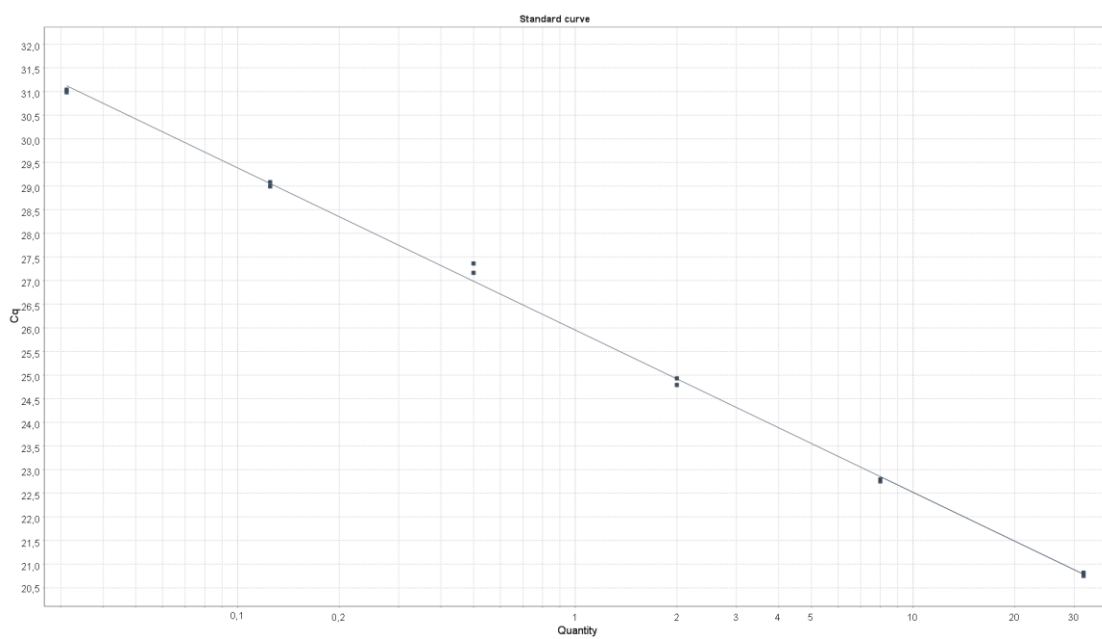
7.4.3. PRIMER OPTIMALISATIE

PTK9: $E = 1,926$, $R^2 = 0,999$ 

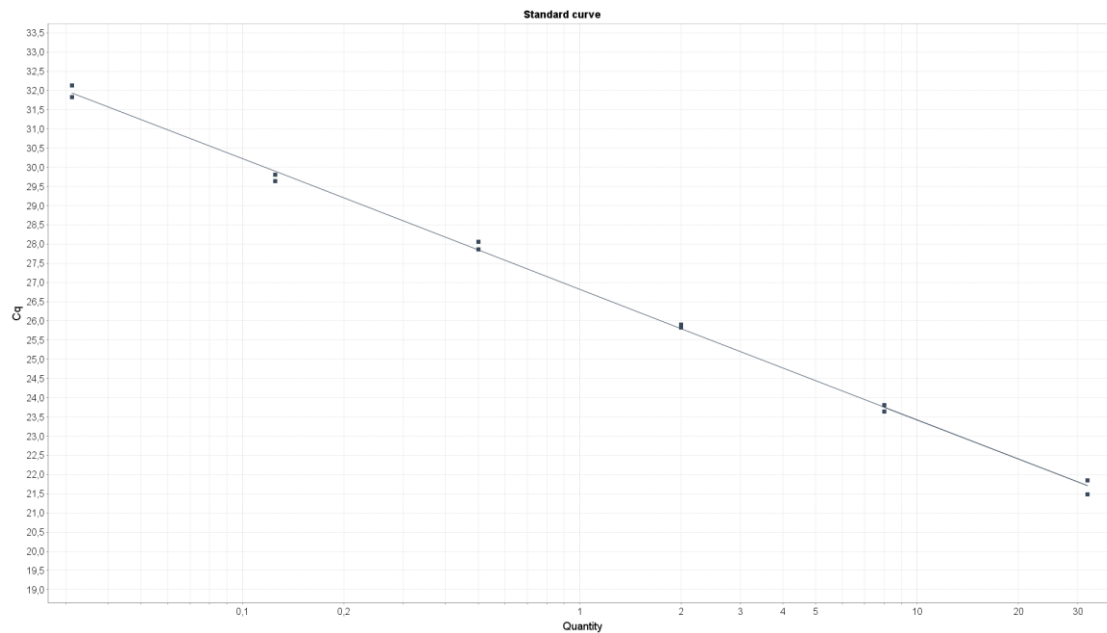
PPM1A: $E = 2.095$, $R^2 = 0.977$



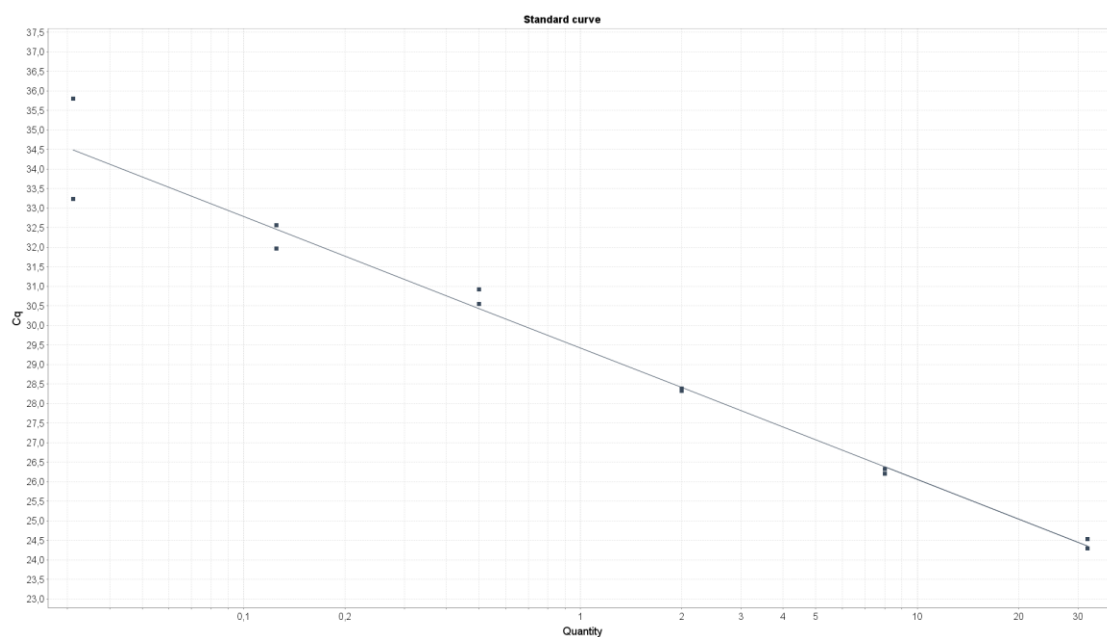
SMAD5: $E = 1.956$, $R^2 = 0.998$



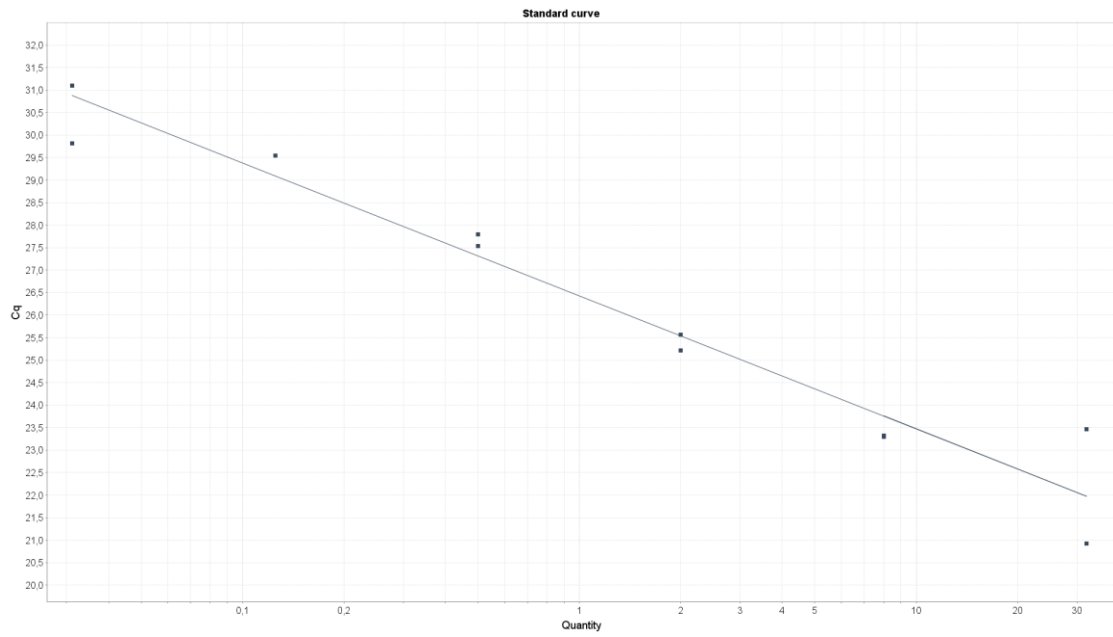
TGFBR1: $E = 1.969$, $R^2 = 0.998$



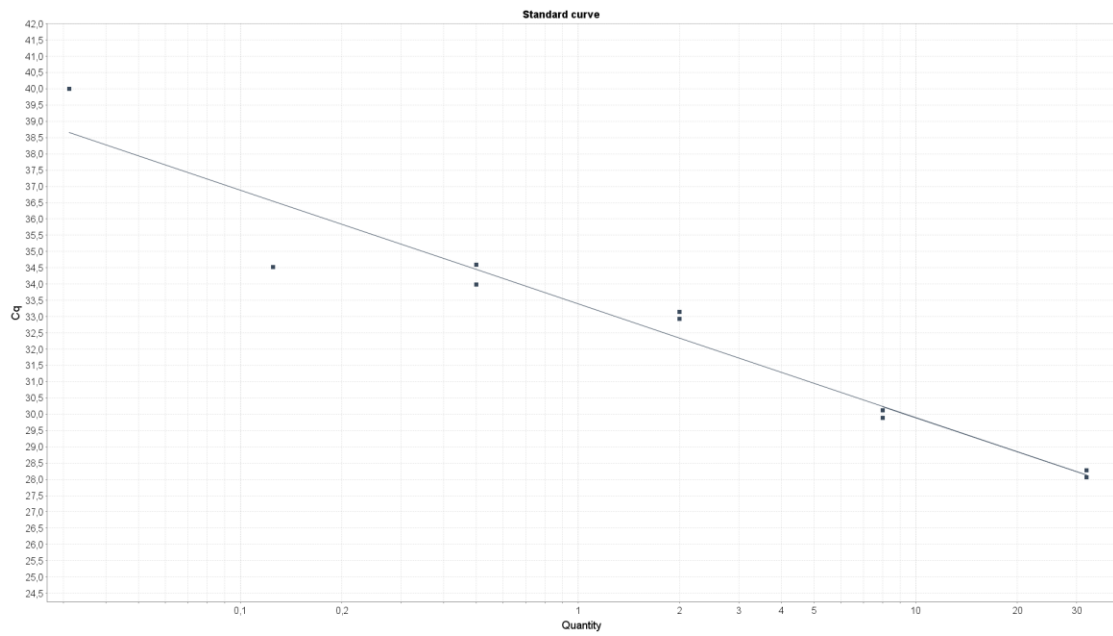
TGIF2: $E = 1.982$, $R^2 = 0.971$



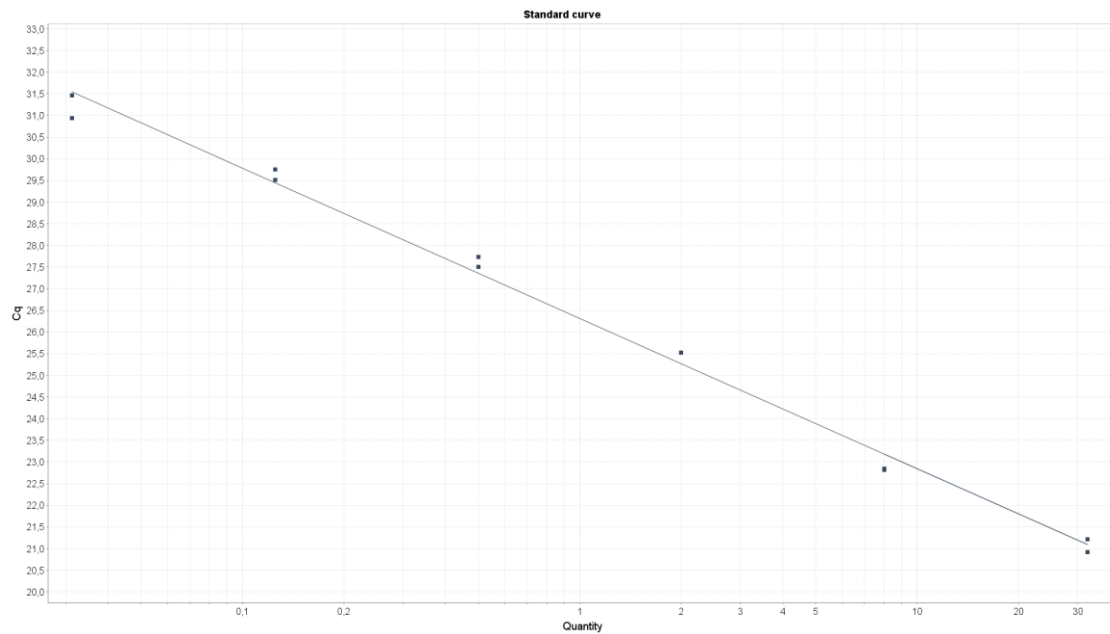
TIMP2: $E = 2.179$, $R^2 = 0.946$



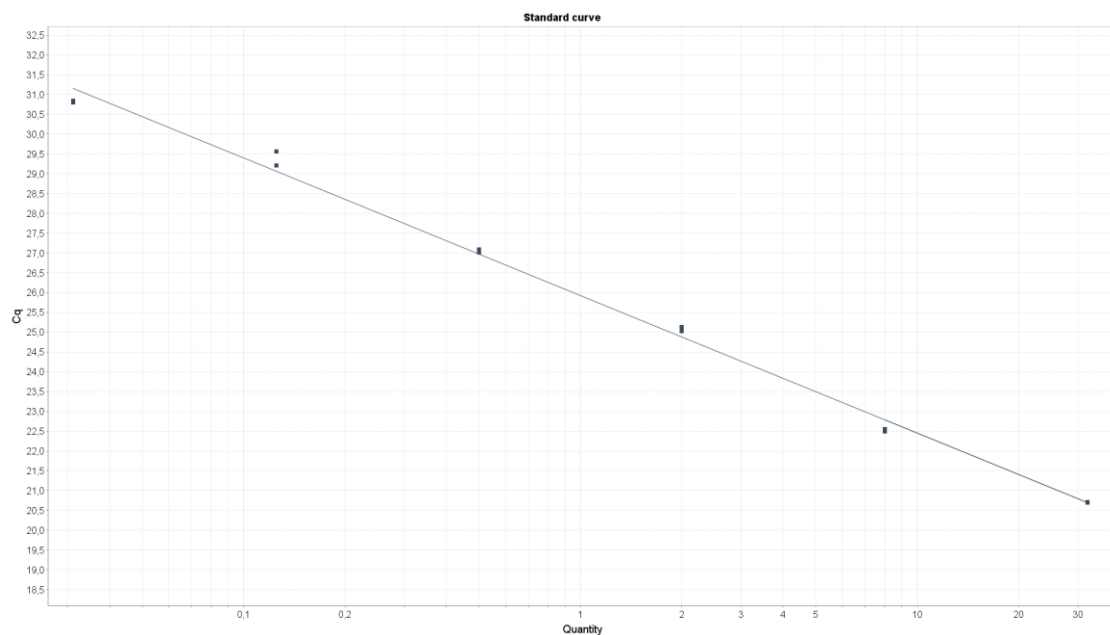
ACTN: $E = 1.932$, $R^2 = 0.931$



FBN1: $E = 1.941$, $R^2 = 0.993$



CAPN2: $E = 1.941$, $R^2 = 0.995$



Figuur 26. Resultaat van qPCR assay ter optimalisatie van *PTK9*, *PPM1A*, *SMAD5*, *TGIF2*, *TGFBRI*, *TIMP2*, *ACTN*, *FBN1* en *CAPN* primers. Een human QPCR reference Total RNA verdunningsreeks werd geamplificeerd en gekwantificeerd zoals beschreven. De relatie tussen de threshold cycle (y-as, aantal cycli) en de concentratie RNA (x-as, ng/ μ L) is grafisch weergegeven. Voor alle onderzochte primerparen zijn zowel de E-waarde als de R^2 boven de grafiek weergegeven.

hsa-miR-26a	18,87	19,19	21,35	20,11	20,44	19,54	20,12	19,92	18,45	18,73	19,16	21,04	19,92	20,71	20,80	20,13	19,63	21,25	19,49	19,65	18,15	19,46	20,72	21,20	19,93	19,58
hsa-miR-26A-1#	NA	NA	31,60	31,20	NA	31,56	NA	NA	28,40	31,37	NA	NA	NA	NA	31,39	27,47	NA	31,86	NA	NA	31,07	NA	NA	NA	NA	
hsa-miR-26a-2#	NA	NA	NA	30,45	NA	31,30	30,82	29,69	NA	NA	31,74	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,62	NA	NA	31,83	NA	NA	NA	31,31	
hsa-miR-26b	21,91	23,01	23,69	23,23	24,29	25,26	23,06	23,34	22,04	22,01	22,56	23,02	24,43	22,78	24,18	23,01	23,84	25,66	22,69	22,82	23,71	22,32	24,18	24,50	23,28	24,27
hsa-miR-26b#	29,82	29,31	29,93	29,90	30,33	29,58	29,69	30,49	29,15	28,92	30,21	30,27	30,53	29,95	31,12	30,54	30,31	30,83	29,48	29,76	28,48	30,35	30,79	30,94	30,15	30,43
hsa-miR-27a	20,04	20,90	21,63	20,36	20,93	21,07	23,43	20,23	19,69	19,88	19,62	21,07	22,09	20,08	21,79	21,54	21,63	22,98	20,53	21,07	20,53	21,03	22,03	21,83	21,40	21,27
hsa-miR-27a#	26,39	26,36	27,56	25,95	26,38	25,77	26,05	26,48	25,77	25,62	26,20	27,18	27,39	26,23	28,32	26,07	25,91	28,48	25,67	25,94	26,11	25,93	26,97	27,74	26,77	26,75
hsa-miR-27b	20,85	22,64	22,03	22,02	22,04	23,45	22,86	22,14	20,63	20,99	22,73	22,13	23,20	21,63	22,97	22,30	22,69	23,35	20,81	22,49	21,27	22,87	22,30	22,05	22,56	22,43
hsa-miR-27b#	28,79	28,77	29,53	29,49	31,88	30,78	30,46	30,71	29,67	31,66	NA	30,57	29,38	28,80	NA	NA	31,40	29,55	29,02	31,23	NA	NA	29,36	29,31	30,97	30,38
hsa-miR-28	22,18	24,51	22,94	23,20	22,86	24,49	24,30	22,67	22,20	21,06	22,60	23,73	23,90	23,48	24,39	22,67	23,36	24,44	21,89	23,17	21,54	23,21	23,04	23,62	23,28	23,51
hsa-miR-28-3p	22,43	23,15	23,42	22,79	23,20	23,23	23,38	23,10	22,19	21,70	23,07	23,56	23,89	22,86	24,10	22,66	22,59	24,50	23,28	23,56	21,66	22,83	23,08	23,52	23,04	23,41
hsa-miR-296	24,39	25,36	26,13	25,90	25,56	26,39	26,05	25,52	23,98	26,22	25,54	26,10	25,72	24,83	27,02	26,39	25,13	27,29	25,87	26,10	24,24	25,13	26,26	27,18	25,08	25,58
hsa-miR-296-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-298	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-299-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	28,03	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-299-5p	31,69	NA	28,49	28,73	29,16	28,76	30,85	30,79	27,19	27,72	30,03	NA	30,59	30,37	31,31	31,94	31,39	31,67	29,79	NA	27,45	31,34	NA	NA	30,55	NA
hsa-miR-29a	18,59	17,52	17,93	17,42	16,68	17,43	18,42	17,51	16,74	16,12	17,13	18,10	19,12	18,07	18,55	17,69	17,06	19,38	17,48	18,10	16,46	17,32	17,89	18,24	17,48	18,36
hsa-miR-29a#	25,68	25,06	26,12	25,09	25,87	24,79	25,13	24,48	NA	24,29	24,14	26,23	25,77	26,02	27,25	26,17	26,20	28,69	25,19	26,23	24,35	24,94	26,79	26,33	25,21	25,75
hsa-miR-29b	24,01	24,52	24,10	22,40	21,89	23,25	23,51	23,18	22,45	24,10	25,04	25,85	26,55	23,22	26,37	25,30	26,11	26,92	25,57	25,85	24,51	26,23	26,01	26,54	25,30	26,59
hsa-miR-29b-1#	27,87	28,90	30,72	29,85	31,03	NA	29,63	29,07	NA	28,31	28,18	29,99	30,30	NA	NA	28,48	31,81	31,52	30,14	29,99	26,74	28,98	30,80	31,21	29,36	30,59
hsa-miR-29b-2#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-29c	19,66	19,85	19,44	19,23	18,49	19,45	19,48	19,58	18,60	18,26	19,14	20,74	20,95	19,78	20,80	20,22	19,44	21,78	19,34	20,74	18,81	20,01	19,99	19,81	18,90	20,14
hsa-miR-301	24,64	25,48	25,62	24,55	25,31	25,17	27,10	25,41	24,45	24,10	25,04	25,85	26,55	25,22	26,37	25,30	26,11	26,92	25,57	25,85	24,51	26,23	26,01	26,54	25,30	26,69
hsa-miR-301b	26,95	28,16	28,39	27,72	28,23	28,57	28,81	29,04	27,06	26,73	28,59	28,99	28,41	28,50	28,58	28,31	28,89	29,14	28,29	28,99	27,62	28,12	29,43	28,53	28,79	28,56
hsa-miR-302a	NA	NA	32,00	NA	29,19	28,38	NA	NA	NA	30,74	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,54
hsa-miR-302a#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-302b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	30,05	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-302b#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-302c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-302c#	NA	NA	NA	NA	NA	30,86	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-302d	NA	NA	NA	31,73	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	32,00	NA	NA	NA
hsa-miR-302d#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-30a-3p	20,09	20,61	21,46	21,13	20,34	20,72	21,15	20,66	21,20	20,14	20,64	21,43	22,52	21,04	22,44	20,76	23,54	23,14	20,95	21,43	19,70	21,03	20,49	21,44	21,22	21,36
hsa-miR-30a-5p	19,57	20,03	21,40	20,11	20,27	21,38	19,54	20,06	24,62	19,36	19,86	20,66	20,40	20,68	21,29	20,63	21,24	22,63	20,01	20,66	19,69	20,64	21,37	21,44	20,83	20,87
hsa-miR-30b	17,99	18,42	19,68	18,76	18,41	18,48	19,36	18,44	17,82	18,09	18,59	19,52	19,39	18,20	19,72	19,21	18,82	20,65	18,40	19,52	17,72	18,95	18,95	19,52	19,10	18,98
hsa-miR-30b#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-30c	17,05	18,15	18,50	18,33	18,02	19,29	19,63	18,35	17,72	17,17	18,00	18,67	19,09	18,04	19,58	18,68	19,30	19,86	18,01	18,67	17,19	18,42	18,54	19,30	18,19	18,20
hsa-miR-30c-1#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-30c-2#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-30d	23,66	24,06	30,60	23,19	24,36	23,47	24,19	24,14	27,39	23,18	23,24	25,09	25,26	24,42	25,34	24,46	26,83	26,31	24,35	25,09	23,00	24,39	24,85	25,53	24,67	24,14
hsa-miR-30d#	NA	30,08	NA	27,83	31,83	31,46	NA	29,41	NA	29,92	30,56	NA	NA	30,60	31,93	29,25	31,71	NA	30,28	NA	31,34	NA	27,02	NA	17,24	NA
hsa-miR-30e-3p	19,90	20,30	21,53	20,64	20,36	20,37	23,04	21,17	21,35	20,26	20,87	21,06	22,02	21,36	22,16	21,16	22,34	23,00	20,88	21,06	20,03	20,98	20,93	21,33	21,07	21,44
hsa-miR-31	17,91	18,25	20,57	18,61	20,03	17,99	19,21	18,24	16,87	18,09	17,16	19,26	19,52	18,20	19,72	19,15	19,26	19,51	18,85	19,26	17,22	18,04	19,31	21,30	17,74	18,51
hsa-miR-31#	20,36	21,77	23,87	21,90	23,11	20,97	20,57	21,34	23,13	21,39	20,56	22,28	22,30	20,88	21,87	21,64	22,64	23,11	22,18	21,95	20,49	21,27	22,96	24,47	20,65	20,76
hsa-miR-32	30,36	31,86	31,97	31,21	31,26	31,39	30,43	30,43	28,54	28,29	29,66	30,92	NA	30,19	NA	29,51	31,43	NA	30,79	30,92	31,14	30,91	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-32#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-320	20,32	20,65	20,86	20,66	21,87	20,36	20,68	20,80	19,39	19,52	20,21	21,13	21,28	20,38	21,23	20,67	22,64	21,94	20,34	21,13	19,32	20,58	20,58	21,38	20,58	20,87
hsa-miR-320B	23,32	23,47	24,49	23,82	24,80	23,63	24,00	24,18	NA	23,70	24,14	24,74	24,41	24,97	24,83	25,37	25,29	25,05	23,78	24,74	23,06	24,63	23,72	25,65	24,01	23,96
hsa-miR-323-3p	28,34	29,38	26,31	27,55	28,84	28,30	28,87	29,32	26,42	27,14	27,17	31,13	27,89	28,49	29,02	29,49	29,81	28,25	31,51	31,13	26,56	29,14	29,08	NA	28,24	27,96
hsa-miR-324-3p	24,29	25,08	25,49	24,49	24,41	26,14	26,20	24,47	23,71	23,12	23,95	24,64	26,21	24,46	26,25	24,81	24,11	27,07	24,37	24,64	24,31	24,92	26,15	26,43	25,13	25,13
hsa-miR-324-5p	23,46	23,98	24,80	23,35	24,09	25,87	24,93	23,25	22,48	22,15	22,84	23,98	26,00	23,29	25,38	24,27	23,48	26,32	23,40	23,98						

hsa-miR-340	26,57	26,55	28,98	26,73	26,82	27,07	27,21	27,02	25,14	25,31	27,35	28,64	28,65	26,94	28,10	27,40	28,82	29,68	25,68	26,69	26,05	26,51	28,49	28,41	27,19	27,18
hsa-miR-340#	26,74	27,27	29,35	27,91	27,69	27,35	27,62	27,59	31,23	27,19	27,19	28,60	28,28	29,12	28,96	28,44	29,06	29,53	28,09	27,76	26,31	27,54	28,74	28,90	28,02	27,38
hsa-miR-342-3p	23,33	22,53	24,10	26,57	23,71	23,36	24,22	23,11	21,28	22,34	22,96	25,33	27,09	22,52	24,15	23,25	23,32	25,64	22,27	22,77	21,87	23,11	25,62	24,59	24,22	22,95
hsa-miR-342-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-345	23,73	24,05	25,25	24,85	24,87	26,09	25,95	24,11	23,62	23,50	23,90	24,93	25,70	24,21	25,34	25,03	25,67	26,80	25,17	23,61	23,66	23,43	25,13	26,33	23,78	24,51
hsa-miR-346	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-34A	19,97	19,72	20,36	19,38	19,86	20,04	20,19	19,64	18,51	18,71	19,49	20,49	20,81	20,03	21,16	21,02	19,99	22,28	19,69	20,49	19,22	19,92	21,17	21,15	20,04	19,85
hsa-miR-34A#	22,45	22,80	24,03	22,48	22,96	22,92	23,48	22,61	23,26	22,21	22,29	23,14	23,09	23,31	24,19	22,88	23,66	25,29	22,56	23,14	22,51	22,99	24,51	23,89	23,45	23,17
hsa-miR-34B	23,02	22,74	24,33	23,23	23,00	22,86	23,43	23,61	22,52	22,86	23,92	24,07	23,40	23,72	25,85	24,00	24,10	24,88	23,36	24,07	22,25	22,96	23,46	25,05	23,49	24,12
hsa-miR-34b_TM427	27,66	27,13	28,82	27,57	27,18	28,01	27,73	26,85	31,21	28,27	27,45	28,08	28,18	28,08	30,04	27,84	29,30	30,85	27,36	28,07	27,16	28,08	28,40	30,07	27,89	29,54
hsa-miR-34C	24,30	24,06	25,64	24,94	23,78	25,37	24,62	25,13	23,86	23,80	24,47	25,04	25,58	24,38	26,69	25,49	24,68	27,19	24,73	25,04	24,21	25,13	25,76	26,29	24,88	25,50
hsa-miR-361	23,66	24,29	25,26	24,47	24,62	24,52	26,96	24,83	23,48	23,75	24,47	26,06	26,22	24,75	25,91	25,43	26,07	26,08	24,98	26,06	23,54	25,00	25,32	25,87	25,10	24,60
hsa-miR-361-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-362	26,18	26,29	27,10	26,03	26,23	26,06	29,37	27,11	25,69	24,67	26,67	27,01	27,40	26,71	27,40	26,61	27,07	28,28	26,53	27,01	25,65	25,54	27,22	27,25	26,78	27,08
hsa-miR-362-3p	26,64	27,66	28,92	26,39	26,52	26,68	27,04	27,49	26,15	25,07	26,96	27,09	28,73	26,92	28,88	27,48	25,99	29,96	26,83	27,09	26,56	27,04	28,57	29,74	27,08	27,20
hsa-miR-363	NA	31,36	NA	29,16	31,25	NA	NA	NA	NA	NA	30,34	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,23	NA	NA	NA	31,85	NA	NA	NA
hsa-miR-363#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-365	20,54	21,43	21,43	21,02	20,60	20,61	21,05	20,57	19,77	20,11	20,56	21,10	21,01	21,20	21,90	21,51	20,91	21,56	20,94	21,10	19,61	21,10	21,19	21,67	20,87	21,59
hsa-miR-367	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-367#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-369-3p	28,42	31,57	28,46	28,49	29,09	27,38	28,43	28,61	28,59	28,25	29,28	NA	29,97	28,77	29,56	30,03	29,25	30,62	30,31	29,49	28,34	29,35	NA	28,89	29,33	28,54
hsa-miR-369-5p	31,81	NA	29,83	30,42	29,48	29,69	30,35	31,20	29,39	29,69	27,12	NA	30,72	29,81	31,11	NA	NA	31,13	30,01	NA	28,78	NA	31,87	NA	30,94	30,48
hsa-miR-370	25,38	27,23	24,74	25,79	25,26	24,62	24,62	26,69	24,87	24,07	24,86	28,14	26,38	26,32	26,73	25,67	26,33	26,57	26,20	27,00	23,80	26,70	28,69	2,98	25,80	24,34
hsa-miR-371-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-372	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-373	30,58	30,90	NA	NA	30,92	NA	30,84	30,97	31,61	NA	NA	NA	NA	31,19	NA	NA	NA	31,00	NA	NA	31,82	31,44	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-374	20,63	21,02	21,86	21,72	21,45	21,00	21,38	20,99	19,51	20,04	20,67	21,83	22,59	21,33	23,00	21,38	20,60	23,51	21,23	20,32	20,17	20,50	22,27	22,23	21,73	21,18
hsa-miR-374a#	30,23	30,93	NA	29,47	30,44	30,54	30,66	29,67	NA	29,44	29,36	30,00	NA	31,50	NA	31,85	NA	NA	31,49	30,52	30,43	30,23	NA	NA	31,57	30,45
hsa-miR-374b#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-375	30,76	31,44	31,60	31,35	29,23	31,21	NA	29,76	30,29	31,25	31,81	NA	28,91	NA	30,08	NA	NA	30,86	30,47	NA	30,59	NA	30,65	31,15	28,52	30,04
hsa-miR-376a	24,15	24,61	23,04	24,20	23,98	25,04	22,82	24,17	23,39	22,26	22,99	25,29	24,10	23,96	24,45	24,65	24,57	24,91	24,20	24,60	23,03	24,70	25,14	25,45	24,18	23,82
hsa-miR-376a#	29,23	30,04	29,68	30,21	30,47	29,85	30,49	31,81	NA	29,62	30,21	NA	31,66	30,12	30,60	30,85	NA	NA	31,22	NA	28,69	30,19	NA	31,92	30,63	30,81
hsa-miR-376b	31,98	31,45	30,38	30,65	29,93	30,03	30,36	29,53	29,86	29,12	28,97	31,95	31,30	30,18	NA	30,59	NA	NA	30,83	31,22	31,36	NA	NA	NA	30,73	30,83
hsa-miR-376C	23,86	24,93	23,69	24,12	24,54	24,06	23,93	23,87	22,59	22,28	23,65	25,53	24,48	24,44	24,76	24,58	25,39	25,57	23,72	30,18	23,08	24,71	25,35	25,07	24,31	24,19
hsa-miR-377#	30,60	NA	29,69	31,13	NA	30,05	NA	NA	NA	30,09	31,38	NA	31,73	30,94	NA	NA	NA	NA	NA	NA	30,24	NA	NA	NA	31,85	30,44
hsa-miR-378	NA	NA	NA	30,30	NA	31,01	NA	NA	NA	17,04	30,71	NA	31,99	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	30,71	NA	31,42	NA	NA	30,64
hsa-miR-378_TM2243	26,13	26,88	29,97	27,69	28,00	27,96	27,49	27,09	28,11	25,98	29,16	27,01	NA	NA	28,06	29,53	28,18	NA	26,25	27,77	NA	26,37	29,15	26,60	29,03	28,48
hsa-miR-380-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-380-5p	NA	NA	30,60	NA	NA	31,44	NA	NA	30,15	30,06	NA	NA	31,57	NA	NA	NA	NA	31,72	NA	NA	30,50	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-381	29,45	31,12	29,98	29,48	29,91	29,37	28,15	30,06	28,48	27,79	30,39	31,30	30,30	29,55	31,30	30,76	29,16	30,93	30,10	31,45	29,72	31,38	31,22	31,09	30,16	30,12
hsa-miR-382	22,33	24,78	22,23	23,87	23,19	23,06	24,97	23,12	23,08	22,45	23,42	25,98	24,00	23,79	23,07	24,84	26,67	24,89	23,14	24,07	21,64	25,09	24,60	24,55	23,53	23,06
hsa-miR-383	26,63	21,93	NA	25,56	22,82	24,81	25,13	24,52	24,10	30,44	22,11	24,38	27,52	30,04	26,78	30,16	30,27	29,40	26,58	22,61	22,45	22,75	NA	NA	29,73	26,42
hsa-miR-384	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-409-3p	20,66	22,09	20,45	21,40	21,44	20,60	22,15	21,86	20,85	20,16	21,18	22,76	21,25	21,97	21,50	21,56	23,24	21,69	21,65	22,05	20,10	21,63	22,27	22,58	21,62	21,06
hsa-miR-409-5p	28,99	29,30	28,58	28,99	28,53	29,09	29,60	28,73	28,07	28,46	28,98	30,52	29,39	29,21	29,50	30,36	NA	29,41	29,76	30,78	28,02	30,10	30,91	31,45	29,28	29,45
hsa-miR-410	26,93	27,11	25,55	25,55	26,49	27,40	27,93	25,85	24,98	25,18	25,80	28,04	26,65	26,41	26,05	26,55	28,00	27,01	26,23	27,10	24,65	27,30	27,52	26,49	26,70	26,23
hsa-miR-411	24,92	24,69	23,11	23,86	23,81	24,56	22,36	24,16	23,12	21,82	24,03	25,75	24,16	24,23	24,77	24,53	24,35	25,52	23,30	24,96	23,07	24,32	25,28	24,84	23,95	24,15
hsa-miR-411#	NA	NA	28,68	31,86	NA	29,64	29,81	NA	31,53	28,31	NA	NA	30,02	NA	NA	31,49	31,82	30,60	31,28	NA	29,36	NA	NA	NA	31,96	NA
hsa-miR-412	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-422a	27,09	30,40	29,00	28,24	28,10	30,11	29,90	NA	28,64	28,04	29,23	28,77	30,82	29,82	30,27	NA	30,34	NA	28,23	28,77	30,76	29,64	27,54	29,92	27,68	29,50
hsa-miR-423-5p	25,50	25,64	26,30	26,24	26,12	25,51	25,47	26,13	24,35	24,61	24,97	26,22	2													

hsa-miR-454	24,34	25,21	25,30	24,69	24,68	24,45	25,36	24,73	23,51	23,34	24,56	24,92	25,07	24,37	26,09	24,21	24,48	26,83	24,82	24,92	24,10	24,74	25,23	25,47	24,99	25,11
hsa-miR-454#	NA	NA	NA	3,32	NA	NA	29,52	NA	31,74	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-455	25,20	26,32	25,59	24,54	24,70	25,20	24,42	25,39	23,80	23,59	24,95	25,59	26,42	25,03	26,89	25,62	24,69	27,06	24,44	25,59	24,18	25,74	26,26	25,92	25,61	26,44
hsa-miR-455-3p	24,08	25,63	24,16	23,75	23,36	NA	24,65	24,45	22,68	22,78	24,26	24,71	24,58	24,14	25,90	25,24	23,45	25,62	23,54	24,71	22,97	24,80	24,51	24,58	24,90	25,48
hsa-miR-483-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-483-5p	26,37	29,33	30,01	29,86	31,07	30,20	30,82	27,11	28,04	30,11	29,40	NA	30,44	29,35	NA	28,02	29,77	28,39	27,14	NA	26,22	29,00	30,00	30,82	31,04	26,54
hsa-miR-484	19,47	20,14	22,03	20,57	20,60	20,26	20,13	19,89	18,87	18,66	19,67	20,59	20,54	19,63	21,07	19,53	20,04	22,30	19,58	20,59	19,91	19,59	21,79	21,62	20,51	20,85
hsa-miR-485-3p	25,92	27,67	26,28	26,70	26,75	27,11	27,09	27,66	26,25	25,23	26,89	28,12	27,77	25,85	27,48	27,35	27,94	27,05	26,94	28,12	25,18	27,56	27,43	27,97	27,18	27,17
hsa-miR-485-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-486	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-486-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,68	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-487a	NA	31,65	30,74	NA	18,56	NA	31,65	31,58	31,02	29,51	31,29	NA	NA	NA	NA	NA	28,97	NA	NA	NA	30,41	NA	NA	NA	25,40	28,35
hsa-miR-487b	26,51	27,86	26,34	26,09	27,18	27,00	25,98	26,99	25,56	25,31	26,26	28,45	26,48	27,00	27,62	27,06	27,76	27,43	28,02	28,45	24,76	26,90	28,79	27,65	27,18	26,42
hsa-miR-488	NA	NA	NA	31,80	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-488_TM1106	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-489	26,41	28,18	27,66	27,43	28,02	29,61	29,09	31,36	28,01	27,38	27,31	27,44	28,13	27,58	28,93	29,00	29,04	30,43	27,74	27,44	30,47	27,36	26,92	27,51	28,29	28,42
hsa-miR-490	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-491-3p	NA	NA	NA	31,12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-492	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-493	29,02	NA	28,71	30,72	NA	28,39	29,21	28,27	27,95	27,55	28,24	NA	31,26	29,74	29,64	28,84	31,44	29,72	NA	NA	26,71	NA	NA	NA	NA	29,19
hsa-miR-494	24,97	25,62	24,51	24,88	25,06	24,16	24,56	26,03	24,24	23,76	25,29	26,49	25,43	25,49	25,15	26,09	25,79	25,90	25,29	26,49	23,97	26,17	26,10	26,31	25,11	25,39
hsa-miR-497	31,47	30,86	NA	30,13	31,62	28,50	30,00	27,48	NA	29,42	28,58	NA	NA	NA	NA	31,28	NA	NA	30,17	NA	26,81	31,30	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-497#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-499-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	15,64	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	15,64	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-500	30,02	28,27	29,00	30,83	28,91	27,64	30,10	28,99	27,31	27,96	29,89	29,85	30,18	29,33	30,45	29,75	29,85	31,16	30,03	29,85	27,24	29,72	31,21	30,49	29,36	31,17
hsa-miR-500_TM1046	29,26	30,92	NA	NA	NA	NA	24,60	29,80	NA	NA	31,57	29,02	30,46	NA	31,64	31,28	NA	NA	31,96	29,89	30,70	29,44	NA	31,44	30,33	
hsa-miR-501	NA	31,08	NA	31,49	NA	30,37	NA	27,98	NA	31,16	NA	NA	NA	NA	NA	28,87	NA	NA	NA	NA	28,46	31,32	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-501-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-502	30,04	31,79	30,06	28,79	29,37	29,09	NA	NA	27,67	31,23	29,44	NA	30,21	29,80	NA	3,45	31,38	30,86	30,85	NA	28,90	NA	30,72	NA	29,87	30,40
hsa-miR-502-3p	27,18	27,69	28,78	27,80	28,19	27,39	30,98	27,86	26,52	27,07	27,57	28,24	28,10	28,25	28,66	29,24	28,44	30,03	28,14	27,63	26,80	28,47	28,26	29,06	27,90	28,18
hsa-miR-503	29,90	NA	30,68	29,30	NA	29,74	30,46	30,30	27,92	28,30	30,68	30,89	NA	30,89	26,60	30,45	30,93	NA	NA	NA	30,95	NA	NA	NA	31,35	29,89
hsa-miR-504	29,94	NA	NA	30,00	NA	31,10	NA	NA	NA	30,43	NA	NA	NA	30,94	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-505	31,53	29,24	NA	29,84	NA	29,03	NA	31,97	28,58	NA	31,11	NA	31,28	30,53	NA	NA	NA	30,84	NA	NA	28,94	24,70	30,95	NA	30,09	31,16
hsa-miR-505#	26,95	27,72	28,49	28,02	27,75	27,64	29,54	27,73	28,01	26,84	27,32	29,40	27,75	28,44	28,65	28,17	28,71	29,06	28,02	27,47	26,23	27,27	27,59	29,79	27,72	27,40
hsa-miR-506	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-507	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-508	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-508-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-509-3-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-509-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	31,49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-510	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-511	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-512-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-512-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-513-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-513B	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-513c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-515-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-515-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-516-3p	28,31	27,41	30,58	31,09	28,38	31,50	30,51	27,37	30,44	26,52	30,97	27,30	31,32	31,13	27,10	28,28	27,97	NA	25,97	26,45	30,29	26,77	29,15	27,67	29,92	30,39
hsa-miR-516a-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-516b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-517#	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-517a	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-517b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-517c	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-518a-3p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-518a-5p	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-518b	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
hsa-miR-518c	NA	NA	NA	NA	NA																					

7.4.5.QPCR VAN POTENTIËLE TARGETGENEN

Tabel 13. Resultaten van de qPCR op potentiële doelwitgenen van miRNA. Weergegeven zijn de CNRQ waarden van de onderzochte genen. Bovenaan het staalnummer.

	1	5	9	11	12	14	16	23	24	25	27	19	15	26	2	22	17	3	18	20	8	21	4	7	10	6
PPM1A	1,52	1,02	0,88	1,24	1,13	1,06	0,98	1,26	1,02	0,90	0,99	0,81	1,03	0,87	1,15	1,12	0,79	0,67	0,95	1,33	1,40	0,83	0,77	1,07	0,90	0,74
SMAD2	1,39	1,23	0,95	1,36	2,42	1,66	1,32	1,50	1,64	1,24	0,45	0,56	1,28	0,73	1,04	0,78	0,65	0,45	0,55	0,74	1,12	0,93	1,04	0,98	1,04	0,81
COL3A1	4,13	0,70	0,39	1,78	0,42	1,49	2,14	2,83	1,60	0,27	1,13	0,48	1,48	0,72	2,47	1,55	1,00	1,33	0,86	1,48	1,39	0,70	0,66	0,42	1,07	0,38
COL5A1	3,13	0,51	0,52	2,01	0,31	2,28	3,13	4,57	5,38	0,49	0,16	0,48	0,97	0,53	3,25	1,94	1,00	1,05	0,79	0,73	1,41	0,67	0,80	0,70	1,24	0,18
TGFBR1	1,19	1,46	0,86	2,30	1,51	1,80	1,67	1,10	1,40	1,32	0,58	0,81	1,31	0,86	0,99	0,78	0,79	0,81	0,75	0,69	0,79	0,60	1,07	1,44	0,66	0,45
FBN2	2,62	0,46	1,69	4,98	0,17	3,57	1,55	2,55	3,02	1,70	0,42	0,20	2,85	0,18	2,52	2,90	0,63	2,85	2,87	1,06	0,50	0,80	0,02	0,57	1,68	1,48
SMAD5	1,68	0,79	0,86	1,46	0,65	1,37	1,77	0,83	1,85	1,31	0,48	0,71	1,25	1,04	1,08	0,93	1,01	0,76	1,07	0,94	1,08	0,66	0,90	1,09	0,85	0,81
ELN	15,67	0,76	0,05	2,25	0,09	1,45	4,92	4,66	9,33	0,14	0,25	0,24	0,95	1,35	3,73	13,10	0,37	2,14	0,86	1,45	2,64	0,44	0,05	4,30	4,04	0,05
ITGA3	1,54	0,35	2,90	0,83	0,94	1,71	2,23	1,64	1,03	1,35	0,32	0,66	0,92	1,34	0,74	3,94	1,15	1,19	0,95	0,52	0,30	0,23	4,10	7,54	0,31	0,30
COL1A2	1,56	0,59	0,74	1,39	0,53	1,86	3,00	1,41	2,06	1,42	0,35	0,54	0,88	0,69	1,83	1,13	1,34	0,68	0,89	0,79	1,05	0,62	1,20	2,44	1,10	0,25
TGFI2	2,06	0,77	0,97	1,06	0,59	1,57	2,23	0,95	1,72	2,37	0,24	0,47	0,77	1,10	1,43	1,11	1,29	0,85	1,19	1,22	0,76	0,66	1,14	2,77	0,67	0,32
TIMP2	1,44	1,08	0,76	1,14	1,39	1,77	1,37	1,38	0,93	1,08	0,42	0,70	0,52	0,59	1,47	2,02	0,93	0,39	0,90	0,78	1,04	1,31	1,19	2,50	1,12	0,38
FBN1	1,36	1,95	0,97	1,83	0,77	1,35	2,28	0,88	1,44	1,00	0,44	0,49	0,97	0,79	1,63	0,71	0,59	0,95	0,93	0,46	0,98	0,87	0,88	2,61	0,44	2,17
CAPN2	1,41	1,37	1,59	1,36	1,13	1,10	1,08	0,75	0,95	1,02	0,57	0,72	0,73	0,77	0,99	1,07	1,00	0,70	0,73	0,86	1,53	0,85	0,90	1,75	0,96	1,19