



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **14q32 Noncoding RNAs in vascular remodelling**

Goossens, E.A.C.

### **Citation**

Goossens, E. A. C. (2020, April 9). *14q32 Noncoding RNAs in vascular remodelling*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/136916>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/136916>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/136916> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Goossens, E.A.C.

**Title:** 14q32 Noncoding RNAs in vascular remodelling

**Issue Date:** 2020-09-24

# Nederlandse Samenvatting

## Introductie

### *Cardiovasculaire ziekten*

Cardiovasculaire ziekten zijn vandaag de dag nog steeds de meest voorkomende oorzaak van mortaliteit en morbiditeit in de westerse wereld. Dit komt met name doordat risicofactoren voor het krijgen van cardiovasculaire ziekten, zoals inname van te veel vet en zout, een zittende leefstijl en te weinig fysieke activiteiten, in de hedendaagse maatschappij niet meer weg te denken zijn.

Bij hart- en vaatziekten is er een gemeenschappelijke factor, namelijk dat er in de bloedvatwand vasculaire remodelering plaatsvindt. Deze vasculaire remodelering kan onderverdeeld worden in positieve remodelering en negatieve remodelering. Onder negatieve remodelering vallen atherosclerose, restenose en de vorming van aneurysmata, allemaal processen die nadelig zijn voor gezondheid van vaten. Positieve remodelering omvat de vorming van nieuwe bloedvaten, bijvoorbeeld als natuurlijke bypass om een geoccludeerd bloedvat heen, en is in hart- en vaatziekten dus een gunstig proces.

Momenteel zijn preventie- en behandelopties voorhanden, maar deze zijn nog steeds ontoereikend om de ziektelast te verlagen. Daarom is verder onderzoek nodig naar nieuwe strategieën om positieve remodelering te stimuleren en negatieve remodelering te remmen. De laatste decennia is veel onderzoek gedaan naar de genetische componenten van vasculaire remodelering. Een van deze genetische componenten is het gebied van niet-coderende RNA's, maar ondanks het feit dat al vele studies op dit gebied zijn verricht, is nog veel onbekend.

### *Niet-coderende RNA's*

Een klein deel van het genoom codeert voor messenger RNA (mRNA) dat vervolgens wordt getransleerd tot proteïnen. Het grootste deel van het genomische materiaal (>95%) codeert niet voor eiwitten, maar heeft wel degelijk een functie. Deze RNA's worden niet-coderende RNA's genoemd. Nadat DNA is afgelezen, en het dus RNA wordt genoemd, hebben de gevormde moleculen een sturende functie op andere RNA's, waaronder mRNA. Hiermee kunnen niet-coderende RNA's dus de expressie van eiwitten reguleren. Een niet-coderend RNA kan meerdere target RNA's hebben en daarmee is een niet-coderend RNA dus in staat om complexe fysiologische processen te reguleren. Er bestaan heel veel verschillende niet-coderend RNA's, die onderverdeeld kunnen worden in grote- en kleine niet-coderende RNA's. MicroRNA's en small nucleolar RNAs (snoRNA's) die in dit proefschrift worden besproken vallen onder de kleine niet-coderende RNA's.

Niet-coderende RNA's, met name microRNA's, komen vaak voor in clusters of families. Het 14q32 niet-coderende RNA cluster is een voorbeeld hiervan. Het is gelegen op de lange arm

van het 14<sup>e</sup> chromosoom in de mens en bestaat uit 54 microRNA's, 41 snoRNA's en 3 lange niet-coderende RNA's. In de muis is het equivalent gelegen op het 12<sup>e</sup> chromosoom (12F1 locus) en bevat 61 microRNA's. Van enkele microRNA's van het 14q32 cluster is aangetoond dat remming hiervan positieve remodelering stimuleert en negatieve remodelering remt. Daarom zijn dit en mogelijk andere clusterleden ideale kandidaten om toekomstige therapeutische interventies op te baseren.

### *Regulatie van microRNA's*

MicroRNA's reguleren niet alleen andere RNA's, maar kunnen ook zelf gereguleerd worden. Dit betekent dat hiermee indirect de targetgenen van microRNA's gereguleerd worden. Regulatie kan op meerdere manieren plaatsvinden en de meest voorkomende vormen van regulatie zijn transcriptionele regulatie en posttranscriptionele regulatie. Bij de eerstgenoemde vorm van regulatie kunnen transcripten die coderen voor microRNA's, beter of juist minder goed afgelezen worden van het DNA. Bij posttranscriptionele regulatie van microRNA's is transcriptie onveranderd, maar grijpt de regulator aan tijdens de ontwikkeling van primair- naar precursor- en/of naar volwassen microRNA. Ook hierbij kan de regulator deze processen remmen of juist stimuleren.

## **Proefschrift**

Het doel van dit proefschrift is om de expressie van 14q32 niet-coderende RNA's in het menselijke vaatbed te onderzoeken. Tevens worden mogelijke regulatoren van 14q32 microRNA expressie besproken en onderzocht in diverse vormen van vaatremodellering.

In **Hoofdstuk 2** is een overzicht gegeven van diverse microRNA's en microRNA clusters die in verschillende vormen van vasculaire remodelering (i.e. positieve en negatieve remodelering) een rol spelen. Hierbij wordt de multifactoriële aard van deze microRNA's benadrukt. De individuele microRNA's miR-126 en miR-155 en de microRNA clusters miR-17/92, miR-23-24-27 en 14q32 microRNA's werden besproken. In eerdere studies is gevonden dat miR-126 en de miR-23-24-27 familie positieve remodelering stimuleren en negatieve remodelering tegelijkertijd remmen. Deze microRNA's zouden daarom ideale targets zijn om te stimuleren in de strijd tegen cardiovasculaire ziekten. Het miR-17/92 cluster, het miR-143/145 cluster en het 14q32 microRNA cluster hebben tegenovergestelde effecten. Zij remmen juist positieve remodelering en stimuleren negatieve remodelering. Door het remmen van deze microRNA's is aangetoond dat neovascularisatie gestimuleerd kan worden, maar ook dat atherosclerose en restenose geremd kunnen worden. Juist de mogelijkheid om beide processen tegelijk te beïnvloeden in een gunstige richting, biedt

interessante therapeutische mogelijkheden. In het verleden is namelijk gebleken dat door andere targets te beïnvloeden, neovascularisatie werd gestimuleerd, maar atherosclerose tegelijk ook werd gestimuleerd. Dit is geen positieve ontwikkeling en daarom zijn de beschreven microRNA's en microRNA clusters idealere kandidaten in toekomstige behandelingen voor cardiovasculaire ziekten.

### **Differentiële expressie van 14q32 niet-coderende RNA's**

Zoals hierboven beschreven, hebben de 14q32 microRNA's diverse functies in vasculaire remodellering. De 14q32 locus in de mens bevat naast deze 54 microRNA's ook 41 snoRNA's. Echter, over snoRNA's is nog weinig bekend. Enkele eerdere studies hebben beschreven dat snoRNA's een functie kunnen hebben in vasculaire remodellering, maar van de 14q32 snoRNA's is nog niet bekend of zij een rol spelen in cardiovasculaire ziekten en, indien dit het geval is, hoe dit precies werkt. In **Hoofdstuk 3** worden meerdere onafhankelijke bewijzen gegeven die allemaal ondersteunen dat 14q32 snoRNA's belangrijke regulatoren zijn van cardiovasculaire ziekten. Als eerste is aangetoond dat Single Nucleotide Polymorphisms (SNP's) in het 14q32 snoRNA cluster significant geassocieerd zijn met hartfalen, onafhankelijk van SNP's in het microRNA cluster of MEG3, een lang niet-coderend RNA op de 14q32 locus. Daarnaast is gevonden dat 14q32 snoRNA expressie in de bloedvatwand erg bloedvat specifieke patronen laat zien. Hoge expressie is gemeten in hoofd-halsvaten en lage expressie was aanwezig in bloedvaten uit de onderste extremiteiten. Tevens werden snoRNA expressie levels van naïeve venen die erna gebruikt zouden worden als bypass, vergeleken met geoccludeerde, en dus gefaalde, bypass venen. De expressie van SNORD113.2 was significant hoger bij geoccludeerde vaten. Expressie van dit snoRNA was ook tweemaal zo hoog in het bloed direct na ST-elevatie myocard infarct (STEMI) vergeleken met 30 dagen na behandeling, maar de hoogste 14q32 snoRNA expressie werd gezien in hartsamples van patiënten met hartfalen. Al deze associaties laten dus zien dat snoRNA's daadwerkelijk een rol moeten spelen in cardiovasculaire ziekten, maar hoe snoRNA's precies een functie hebben of worden beïnvloedt in cardiovasculaire ziekten, is nog niet bekend. Veranderen zij als gevolg van de ziekte of treedt de ziekte op als gevolg van snoRNA veranderingen, zijn vragen die nog beantwoord moeten worden. Hiervoor is het nodig de exacte aangrijpingspunten van snoRNA's te achterhalen. Daarom zijn in deze studie reeds enkele functionele experimenten uitgevoerd die aantoonen dat opregulatie van twee snoRNA's in de muis leidde tot verbeterde cel migratie en dat methyltransferase Fibrillarine, dat niet-coderende RNA's kan methyleren als het is aangestuurd door snoRNA's, ook gebonden kan zijn aan 14q32 snoRNA's.

Samenvattend laat deze studie zien dat 14q32 snoRNA's een belangrijke rol spelen in cardiovasculaire ziekten en mogelijke werkingsmechanismen zijn onderzocht. Echter, hoe dit exact werkt, via welke mechanistische route en welke targets 14q32 snoRNA's precies hebben, zal moeten worden onderzocht in vervolgstudies.

Mechanistische werking van microRNA's is al veel meer bestudeerd. MicroRNA's worden afgeschreven van het DNA tot primair microRNA. Vervolgens wordt het omgezet tot precursor microRNA door het enzym Drosha. Als het precursor microRNA vanuit de nucleus naar het cytoplasma wordt getransporteerd komt het enzym Dicer dat zorgt voor de omzetting naar volwassen microRNA. De volwassen vorm wordt geladen in een zogenoemd RISC complex (RNA-Induced Silencing Complex) waarmee het de uiteindelijke functie kan gaan uitoefenen. Daarmee bindt het microRNA aan het 3'uiteinde (3'UTR) van zijn target mRNA en reguleert zo de expressie van zijn targetgenen. Omdat is aangetoond dat 14q32 microRNA's in diverse vormen van vasculaire remodellering een rol kunnen spelen en dat cardiovasculaire ziekten vaak op specifieke locaties in het menselijk lichaam voorkomen, kwam de vraag op of 14q32 microRNA's specifieke expressiepatronen hebben in de vaatboom. Daarom is het doel gesteld om de expressie van 14q32 microRNAs in de menselijke vasculatuur in kaart te brengen. **Hoofdstuk 4** beschrijft de resultaten van deze studie waarin vaatweefsel samples vanuit zoveel mogelijk verschillende locaties in de menselijke vaatboom zijn verzameld. In deze samples is de microRNA expressie van 17 van de 54 14q32 microRNA's gemeten. Deze microRNA's liggen verspreid over de locus en zij zijn in eerdere studies beschreven belangrijke functies te hebben in vasculaire remodellering. In deze studie zijn inderdaad bloedvat specifieke microRNA expressiepatronen gevonden. De bloedvaten in de benen lieten hoge expressie levels zien, waar de bloedvaten uit het hoofdhalsgebied een lage 14q32 microRNA expressie hadden. Dit was een interessante bevinding, omdat in beide bloedvaten atherosclerose kan voorkomen, maar de microRNA expressie dus duidelijk verschilt. Ook is gevonden dat voor elk microRNA de expressie in arteriële bloedvaten hoger is dan in veneuze bloedvaten. Daarnaast correleerde 14q32 microRNA expressie niet met leeftijd of geslacht, maar werd wel gezien dat de targetgenen lager tot expressie kwamen wanneer er hoge microRNA expressie was, en vice versa. Dit laatste werd ook verwacht op basis van het eerder beschreven werkingsmechanisme van microRNA's en dit impliceert dat de 14q32 microRNA's die aanwezig zijn ook daadwerkelijk een functie uitoefenen.

Samenvattend benadrukt het eerste deel van dit proefschrift dat 14q32 niet-coderend RNA expressie individueel gereguleerd is voor elk niet-coderend RNA en dat bloedvatlocatie- en vasculaire ziekte specifieke expressie aanwezig zijn.

## **Regulatoren van 14q32 microRNA expressie**

14q32 microRNA's komen differentieel tot expressie in de menselijke bloedvatwand en dit verschil uit zich in locatie en ziekte specifieke expressiepatronen. De vraag die hierbij opkomt is hoe deze regulatie precies verloopt en op welke verschillende manieren 14q32 microRNA expressie gereguleerd kan worden. Dit wordt in het tweede deel van dit proefschrift besproken.

Allereerst is in **Hoofdstuk 4** DNA methylatie besproken als mogelijke microRNA expressie regulator. DNA methylatie is de additie van een methylgroep aan een cytosine-guanosine dinucleotide, zogenoemde CpG's. Op het DNA zijn regio's waarin veel CpG's gelegen zijn en er dus veel methylatie plaats kan vinden. Deze regio's worden Differentially Methylated Regions (DMR's) genoemd. Ook op het 14q32 cluster zijn drie DMR's gelegen. Methylatie is niet een statisch proces, maar kan veranderen tijdens ziekte. Het is bekend dat DNA methylatie status verandert tijdens oncogene processen en enkele cytostatica grijpen dus aan op methylgroepen. In fysiologische omstandigheden verandert DNA methylatie niet zomaar. Dit gebeurt onder invloed van enzymen die DNA MethylTransferases (DNMT's) heten. In eerdere studies was aangetoond dat DNA methylatie omgekeerd evenredig is met de expressie van nabijgelegen genen. Dit kan verklaard worden doordat de methylgroep het onmogelijk maakt voor RNA polymerase om te binden en dus het DNA te transcriberen. In deze studie hebben wij echter gevonden dat op de 14q32 locus DNA methylatie levels en microRNA expressie levels niet correleren in de bloedvatweefsel. Ook DNA methylatie status en primair microRNA expressie of DNMT expressie en (primair) microRNA expressie tonen geen relatie in bloedvaten. Wel is aangetoond dat 14q32 DNA methylatie direct gerelateerd kan worden aan status van het bloedvat in vasculaire remodellering. Ook DNMT expressie liet dit zien. Deze bevindingen werden in menselijke zieke en gezonde bloedvaten gedaan, maar zijn ook in diverse diermodellen bevestigd. 14q32 DNA methylatie is dus geen 14q32 microRNA expressie regulator, maar een onafhankelijke factor die geassocieerd is met vasculaire remodellering. Hoe deze associatie precies werkt en of dit mogelijkheden biedt tot nieuwe therapeutische interventies, zal verder onderzocht moeten worden.

In **Hoofdstuk 5** is een andere 14q32 microRNA regulator bestudeerd, namelijk myostatine. Myostatine was reeds bekend als regulator van skeletspiercelgroei en -proliferatie. De



afwezigheid van myostatine leidt tot overmatige spiermassa in zowel mensen als dieren. In de veehouderij is dit een positief verschijnsel, maar in mensen veroorzaakt het ook overmatige groei van hartspiercellen. Dit kan leiden tot een verslechterde pompfunctie van het hart met ziekte en mogelijk de dood tot gevolg. Niet alleen skeletspiercellen en hartspiercellen, maar ook gladde spiercellen kunnen van fenotype veranderen door myostatine. Juist deze gladde spiercellen spelen in post-interventionele restenose een belangrijke rol. Normaal gesproken verblijven gladde spiercellen in de mediale laag van een bloedvat. Zij dragen bij aan de elasticiteit en compliantie van een bloedvat en daarmee kan een bloedvat hoge systolische drukken weerstaan, maar tegelijk ook rekbaar zijn. Als een bloedvat (kransslagader of beenslagader) occludeert door het ontstaan van een atherosclerotische plaque, moet deze met spoed behandeld worden om de bloedstroom door het vat te herstellen. Dit gebeurt door middel van een dotterprocedure. Ter plaatse van de vernauwing wordt een ballonnetje opgeblazen waardoor de plaque naar buiten geduwd wordt en het lumen weer groot genoeg is om voldoende bloed door te laten. Om snelle re-occlusie te voorkomen, wordt vaak een stent achtergelaten. Meest gebruikte stents geven ook medicijnen af die re-occlusie vertragen. Ondanks de medicijnen uit de stent en het feit dat de patiënt levenslang medicijnen moet slikken, komt het vaak voor dat er toch ter plaatse van de stent restenose optreedt. Dit komt doordat het opblazen van de ballon en het achterlaten van de stent reacties triggert in de bloedvatwand. Gladde spiercellen reageren door extra te prolifereren en van de media naar de intima te migreren. Daarbij vormen ze een dikke intima en dit wordt de neointima genoemd. Daarnaast wordt een ontstekingsreactie uitgelokt waarbij met name macrofagen geactiveerd worden en in de laesie migreren. Met het feit dat myostatine afwezigheid leidt tot verhoogde spiercel proliferatie, werd in deze studie verwacht dat de toediening van myostatine zou leiden tot minder gladde spiercelproliferatie, wat een gunstig effect zou hebben op post-interventionele restenose.

Daarnaast is in eerdere studies beschreven dat myostatine de callipyge locus, een andere naam voor de 14q32 locus, beïnvloedt en microRNA expressie van de locus verandert. Myostatine knock-out muizen hebben naast grote spiermassa ook een verhoogde 14q32 microRNA expressie. Andersom wordt dus verwacht dat myostatine aanwezigheid leidt tot een verlaging van 14q32 microRNA expressie. Ook dit zou een positieve invloed moeten hebben op post-interventionele restenose, omdat eerder onderzoek heeft aangetoond dat directe remming van 14q32 microRNA miR-495 restenose vermindert en ook de macrofageninflux verlaagd. Dit effect op macrofagen door myostatine is ook onderzocht.

Zowel *in vitro* als in een *in vivo* model voor post-interventionele restenose werd de functie van myostatine op restenose en 14q32 microRNA's onderzocht. De resultaten van deze

studie lieten zien dat myostatine inderdaad gladde spiercel proliferatie remt en microRNA's in gladde spiercellen lager tot expressie brengt. We zagen echter niet dat myostatine een effect had op macrofaagactivatie of de microRNA's in macrofagen. Dit verklaart ook waarom restenose niet afnam in de myostatine behandelde groepen vergeleken met de controle groep. Myostatine alleen zal dus niet de nieuwe remedie zijn tegen restenose, ondanks dat het een sterke 14q32 microRNA regulator is in gladde spiercellen. Deze bevindingen benadrukken dat voor de behandeling van post-interventionele restenose niet slechts een component getarget moet worden, maar dat therapieën zowel gladde spiercelproliferatie als macrofaagactivatie moeten kunnen remmen om succesvol te zijn in de strijd tegen restenose.

De laatste regulator van 14q32 microRNA's die in dit proefschrift (**Hoofdstuk 6**) besproken wordt, is CIRBP. Dit is de afkorting van Cold-Inducible RNA Binding Protein. Zoals de naam suggereert, staat dit proteïne bekend om de eigenschappen om RNA te binden, en dus te beïnvloeden, en om geïnduceerd te worden door kou. Dit zijn twee interessante eigenschappen. Allereerst kan CIRBP diverse soorten RNA binden, zowel mRNA's als niet-coderende RNA's. Onder deze niet-coderende RNA's die target zijn van CIRBP vallen ook twee 14q32 microRNA's. In een eerdere studie is aangetoond dat CIRBP de omzetting van precursor microRNA naar volwassen microRNA beïnvloedt voor 14q32 microRNA's miR-329 en miR-495. Daarnaast wordt CIRBP geïnduceerd door lage temperatuur. Juist dit is een belangrijk kenmerk van perifeer vaatlijden. Wanneer in het been door een arteriële occlusie de bloedstroom naar lager gelegen weefsels wordt afgesloten, zullen verschijnselen als polsloosheid, pijn, paresthesie, pallor (bleekheid), paralyse en poikilothermie (onmogelijkheid om lichaamstemperatuur te behouden) optreden, samen de 6 P's. Door het tekort aan bloedtoevoer, en dus zuurstof en voedingsstoffen, naar de perifere weefsels, worden deze ischemisch en sterven af. Daarom moet een arteriële occlusie behandeld worden. Dit kan, zoals ook in **Hoofdstuk 5** beschreven is, door middel van een dotterprocedure met of zonder plaatsing van een stent, maar ook door middel van een bypass. Deze omleiding om de occlusie heen kan chirurgisch worden aangelegd met behulp van een ander lichaamseigen bloedvat, maar het lichaam heeft ook zelf een manier om een bypass te vormen. Dit heet neovascularisatie en omvat de vorming van nieuwe bloedvaten ófwel uit bestaande onrijpe bloedvaten door toename in druk en shear stress (arteriogenese) ófwel de vorming van volledig nieuwe bloedvaten naar ischemisch weefsel (angiogenese). Hoewel het lichaam zelf in staat is tot neovascularisatie, is dit in omstandigheden zoals perifeer arterieel vaatlijden niet voldoende om de bloedstroom naar lager gelegen gebieden volledig te herstellen. Daarom moeten strategieën gevonden

worden waarbij neovascularisatie ondersteund en versterkt wordt. In eerdere studies is gevonden dat directe remming van 14q32 microRNA's, waaronder miR-329 en miR-495, leidt tot betere neovascularisatie in een diermodel voor achterpootischemie. Tevens is gevonden dat remming van een ander RNA bindingsproteïne, MEF2A, leidt tot lagere 14q32 microRNA expressie met als gevolg betere post-ischemische neovascularisatie. Voortbordurend op deze studies, is in **Hoofdstuk 6** onderzocht of door het targetten van CIRBP 14q32 microRNA's gereguleerd worden en dus neovascularisatie gestimuleerd wordt. Daarnaast is gekeken naar het effect van hypothermie op CIRBP, verschillende splice varianten van CIRBP en het antisense long noncoding RNA CIRBP-AS1. Ook is het effect van CIRBP op 14q32 microRNA expressie onderzocht. Vervolgens is gekeken naar het effect van CIRBP- en CIRBP-AS1 remming op de 14q32 microRNA's en ook is onderzocht of dit angiogenese stimuleert *in vitro*. CIRBP werd in endotheelcellen geïnduceerd door koude stress, met name CIRBP-SV1, maar een duidelijk effect op CIRBP-AS1 en de 14q32 target microRNA's bleef uit. CIRBP remming leidde tot downregulatie van volwassen miR-495, maar niet van miR-329, en zorgde voor verbeterde *in vitro* angiogenese. Ook bewerkstelligde deze CIRBP remming een lagere CIRBP-AS1 expressie. Andersom zorgde CIRBP-AS1 remming ook voor een lagere CIRBP expressie en tevens een verbetering van *in vitro* angiogenese. Hoe deze interactie tussen CIRBP en CIRBP-AS1 precies werkt en welke van de twee de hoofdverantwoordelijke factor is van de proangiogene eigenschappen, moet nog onderzocht worden.

Deze bevindingen samen impliceren dat CIRBP en CIRBP-AS1 zeer interessante mogelijke targets zijn in neovascularisatie en verder onderzoek zal moeten uitwijzen of dit daadwerkelijk in een levend organisme ook werkzaam is. Daartoe is de volgende stap om in CIRBP knock-out muizen een achterpootischemie model te verrichten. Hierbij wordt de arteria femoralis geligeerd en vervolgens gekeken naar het herstel in de bloedtoevoer naar de poot via neovascularisatie. Normaal gesproken zal dit in 7-10 dagen hersteld zijn, maar de verwachting is dat in muizen die geen CIRBP hebben, 14q32 microRNA's veel lager tot expressie komen en er dus meer en snellere neovascularisatie plaatsvindt.

Samenvattend bespreekt het tweede deel van dit proefschrift drie verschillende mogelijke regulatoren van 14q32 microRNA expressie. 14q32 DNA methylatie bleek geen regulator van 14q32 microRNA expressie te zijn, maar is een onafhankelijke factor die geassocieerd is met vasculaire remodelerings status. Myostatine daarentegen is wel een duidelijke regulator van 14q32 microRNA expressie, maar alleen in spiercellen, dus in VSMCs in de bloedvatwand. Myostatine heeft geen duidelijk effect op andere cellen in restenose zoals macrofagen. Daarom is het geen potente regulator van post-interventionele vasculaire

remodellering, omdat dit een proces is waarin meerdere factoren tegelijk getarget moeten worden om een klinisch effect te bereiken. De laatste regulator van 14q32 microRNA expressie die in dit proefschrift is besproken, is CIRBP. Bij remming van CIRBP in endotheelcellen wordt miR-495 eveneens geremd zoals verwacht. MiR-329 werd niet beïnvloed. Tevens liet remming van CIRBP een duidelijk positief effect zien op *in vitro* angiogenese. Of deze effecten *in vivo* ook aanwezig zijn, zal onderzocht moeten worden, maar *in vitro* data zijn zeer veelbelovend.

## **Conclusie**

Dit proefschrift geeft nieuwe inzichten in de differentiële expressie van 14q32 niet-coderende RNA's in het menselijke vaatbed. Experimentele studies hebben enkele mogelijke regulatoren van 14q32 microRNA expressie in vasculaire remodelleringsprocessen, zoals post-interventionele restenose en post-ischemische neovascularisatie. Veel stappen moeten nog gezet worden en therapieën met 14q32 niet-coderende RNA's of regulatoren van 14q32 microRNA's zijn nog ver weg, maar hopelijk is het in de toekomst mogelijk om deze therapieën aan patiënten voor te schrijven die vandaag de dag nog suboptimaal behandeld worden.



