



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Small regulatory RNAs in vascular remodeling and atherosclerosis

Ingen, E. van

### Citation

Ingen, E. van. (2022, June 9). *Small regulatory RNAs in vascular remodeling and atherosclerosis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3307861>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3307861>

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

# Appendix

Nederlandse Samenvatting

## Introductie

### *Hart- en vaatziekten*

Hart- en vaatziekten zijn wereldwijd één van de meest voorkomende doodsoorzaken en vertegenwoordigen 31% van alle sterfgevallen ter wereld. Het hart en de bloedvaten, die het cardiovasculaire systeem worden genoemd, circuleren bloed door het lichaam om zuurstof en voedingsstoffen af te geven en afvalstoffen te verwijderen. ‘Hart- en vaatziekten’ is een verzamelnaam voor verschillende ziektes die het cardiovasculaire systeem aantasten. Hieronder vallen een hartinfarct, beroerte en perifeer vaatlijden.

### *Atherosclerose*

De onderliggende oorzaak van de meeste hart- en vaatziekten is atherosclerose. Atherosclerose is een chronische ontstekingsziekte die wordt gekenmerkt door een progressieve opbouw van plaques in de slagaderwand. Plaques zijn samengesteld uit lipiden en ontstekingscellen. Plaques ontwikkelen zich in grote en middelgrote slagaders. De meeste plaques die zich tijdens het leven van een persoon ontwikkelen blijven onopgemerkt. Patiënten krijgen doorgaans pas symptomen wanneer de slagader ernstig vernauwd raakt (bij een stenose van meer dan 70%) of wanneer een plaque scheurt. Dit laatste veroorzaakt een acute verstopping van de slagader. Die patiënten vertonen vaak ernstiger symptomen die zelfs fataal kunnen zijn, bijvoorbeeld in geval van een hartinfarct of ischemische beroerte. Volledige ruptuur van een plaque of plaque-erosie (wanneer een oppervlakkig stukje van de plaque afbreekt) leidt tot het vormen van een bloedprop in de slagader. De bloedprop sluit de slagader gedeeltelijk of volledig af, blokkeert de bloedstroom en veroorzaakt een acuut tekort aan zuurstof en voedingsstoffen in het achterliggende gebied. Dit heet een infarct. Zuurstof en voedingsstoffen zijn van cruciaal belang voor het overleven en functioneren van weefsel. Daarom moet onmiddellijk worden ingegrepen om de bloedstroom te herstellen en de nadelige gevolgen, waaronder celdood en blijvende schade in de ischemische weefsels, te beperken.

### *Risicofactoren en huidige behandelingen*

Risicofactoren voor door atherosclerose veroorzaakte hart- en vaatziekten zijn hoog cholesterol, diabetes, obesitas, genetische aanleg, hoge bloeddruk en leeftijd. Veel van deze risicofactoren kunnen het gevolg zijn van een ongezonde levensstijl, zoals een hoge vet-, cholesterol- en zoutinname, roken en een gebrek aan lichaamsbeweging. Gezonde veranderingen in de levensstijl kunnen daarom helpen in de preventie van hart- en vaatziekten. Plasma lipiden-verlagende geneesmiddelen (bv. statines), bloedplaatjesremmers

en antihypertensiva zijn voorbeelden van veel gebruikte geneesmiddelen om het risico op een (recidief) cardiovasculair event te verlagen.

Zodra zich een cardiovasculair event heeft voorgedaan (bv. een hartinfarct), zijn de therapieën gericht op het herstellen van de bloedstroom, met als doel herhaling te voorkomen en het getroffen orgaan, zoals het hart, te ondersteunen. Bloedstolsel oplossende geneesmiddelen (trombolytica) en chirurgische ingrepen zijn de huidige therapieën om de arteriële blokkade te verwijderen en de bloedstroom te herstellen.

Ondanks verbeteringen in zowel de preventie als behandelingen van hart- en vaatziekten, vertonen de huidige behandelingen ook tekortkomingen. Zo is er een risico op terugkerende occlusies bij endovasculaire ingrepen of bypass operaties, of brengen chirurgische ingrepen, zoals een endarterectomie, perioperatieve risico's met zich mee. De verwachting bestaat dat het aantal patiënten over de jaren heen alleen maar toe zal nemen. Dit komt onder andere door een groei van het aantal risicofactoren, veelal veroorzaakt door een ongezonde leefstijl en door vergrijzing van de samenleving. De totale kosten voor patiënten met hart- en vaatziekten zijn hoog en zullen naar verwachting nog veel verder stijgen. Dit benadrukt de urgentie tot het ontwikkelen van nieuwe therapieën die zowel de preventie als de behandelingen van hart- en vaatziekten verbeteren.

#### *Niet-coderend RNA*

Niet-coderende RNA's (ncRNA's) zijn RNA's die niet in eiwitten worden vertaald. Meer dan 97% van het menselijke genoom codeert voor ncRNA's. Jarenlang werden delen van het humane genoom die niet coderen voor eiwitten beschouwd als junk-DNA. De laatste 2 decennia zijn er echter steeds meer aanwijzingen dat ncRNA's van cruciaal belang zijn voor de regulering van genexpressie en de vervulling van functies bij verschillende ziekten, waaronder hart- en vaatziekten. NcRNA's reguleren de expressie van andere RNA's. Op basis van hun grootte worden ncRNA soorten ingedeeld in ofwel kleine ofwel lange ncRNAs (respectievelijk korter of langer dan 200 nucleotiden). Er zijn veel verschillende soorten ncRNA's, die op hun beurt verschillende functies vervullen. In dit proefschrift ligt de nadruk op microRNA's, small nucleolar RNA's (snoRNA's) en transfer RNA's (tRNA's).

Een type klein ncRNA dat veelal wordt bestudeerd in cardiovasculaire processen, is de microRNA. MicroRNA's reguleren de expressie van meerdere genen tegelijk. In complexe ziekten zoals hart- en vaatziekten, waarin meerdere genen betrokken zijn, kan het veranderen van de expressie van één microRNA daarom resulteren in een groot effect.

Een ander type klein ncRNA is de snoRNA. Van C/D box snoRNA's is al lang bekend dat zij 2'-O-methylering (2'Ome) van ribosomaal RNA (rRNA) begeleiden. Voor de helft van de menselijke C/D box snoRNA's ontbreekt echter een bekend target en hun functie is onbekend. Talrijke C/D box snoRNA's zijn wel in verband gebracht met verschillende ziekten, waaronder hart- en vaatziekten. Dit impliceert dat zij een regulerende rol hebben hierin.

#### *Het 14q32 cluster*

Een cluster op de lange arm van chromosoom 14 van het humane genoom (14q32) codeert voor talrijke ncRNA's. Het 14q32 cluster, ook DLK1-DIO3 locus genoemd naar de eiwit-coderende genen DLK1 en DIO3, is sterk geconserveerd bij de mens en de muis. Het equivalent bij muizen bevindt zich op chromosoom 12 (12F1). Het 14q32 cluster transcribeert het grootste bekende humane microRNA-cluster, een cluster van 54 microRNA-genen. Het 14q32 cluster codeert naast zijn drie eiwit-coderende genen en 54 microRNA's, voor een cluster van 41 C/D box snoRNA's, drie lange niet-coderende RNA's (lncRNA's), MEG3, MEG8 en MEG9, en Piwi-interacterende RNA's (piRNA's). Genetische associatie analyses hebben aangetoond dat de 14q32 microRNA's, snoRNA's en lncRNA's, onafhankelijk van elkaar, sterk geassocieerd zijn met hart- en vaatziekten.

#### *14q32 microRNA-494-3p en microRNA-329-3p in atherosclerose*

MiR-494-3p en miR-329-3p, beide 14q32 microRNA's, zijn betrokken bij verschillende processen van vasculaire remodelering. In een eerdere studie verminderde remming van miR-494-3p de ontwikkeling van plaques in een muismodel met vroege atherosclerose. Deze studie richtte zich op de vroege ontwikkeling van plaques. Patiënten die risico lopen op (terugkerende) cardiovasculaire aandoeningen hebben echter meestal vergevorderde en symptomatische plaques. Patiënten krijgen vaak ook plasma-cholesterolverlagende medicijnen (bv. statines) om het risico op een (recidief) cardiovasculair event te verminderen. In dit proefschrift wilden we daarom 14q32 microRNA remming onderzoeken in een muismodel dat meer lijkt op de menselijke klinische setting. We gebruikten muizen met gevorderde atherosclerose en behandelden hen met ofwel 3e generatie antisense tegen miR-494-3p (3GA-494) of miR-329-3p (3GA-329). Tegelijkertijd verlaagden we hun plasma lipiden door hun dieet te veranderen van vet- en cholesterolrijk naar normaal voedsel.

Macrofagen spelen een belangrijke rol bij het ontstaan en de progressie van atherosclerose. In een vervolgstudie hebben we onderzocht of miR-494-3p direct invloed heeft op macrofaag activatie en polarisatie. Of dit een invloed heeft op de stabiliteit van atherosclerotische plaques was onbekend.

### *De functie en RNA-targets van 14q32 snoRNA's*

De expressie van 14q32 snoRNA's wordt gereguleerd onder ischemische omstandigheden bij patiënten met perifere vaatlijden en tijdens vasculaire remodellering. In vergelijking met de 14q32 microRNA's, is er echter veel minder bekend over de 14q32 snoRNA's. Normaliter is de functie van C/D box snoRNA's het begeleiden van 2'Ome op rRNA. Geen van de 14q32 snoRNA's heeft echter een bekend RNA-target. C/D box snoRNA's die geen bekende RNA-targets hebben, worden "wees" snoRNA's genoemd. Aangezien zij geen bekende RNA-targets hebben, is hun functie ook onbekend. Directe binding van 14q32 snoRNA's aan methyltransferase fibrillarine suggereert wel de functie van 2'Ome, maar mogelijk op andere RNA-targets dan rRNA. Daarom was ons doel om zowel de functie als de RNA-targets van 14q32 snoRNA's op te helderen. Wij richtten ons op één 14q32 snoRNA die hoog tot expressie komt, SNORD113-6 bij de mens en zijn equivalent AF357425 bij de muis. We laten zien dat AF357425/SNORD113-6 een breed scala van mRNAs target en hun expressie beïnvloedt via twee mechanismen, pre-mRNA processing en 2'Ome. Vervolgens hebben we mRNAs van de integrine pathway geïdentificeerd als targets van AF357425/SNORD113-6. Aangezien integrine signalering belangrijk is voor cel-cel en cel-matrix interacties, onderzochten we ook of inhibitie van SNORD113-6 de functie van humane arteriële fibroblasten veranderde. Ten tweede wilden we bepalen of AF357425/SNORD113-6 ook kleine RNA's kan targeten. We vonden dat tRNA's voornamelijk werden getarget door AF357425/SNORD113-6 en onderzochten of 2'Ome door AF357425/SNORD113-6 de fragmentatie van tRNA's beïnvloedt.

### **Proefschrift**

Het doel van het eerste deel van dit proefschrift is om inhibitie van microRNA-494-3p en microRNA-329-3p in gevorderde atherosclerose te onderzoeken. Het doel van het tweede deel is om zowel de functie als RNA-targets van één 14q32 snoRNA, humaan SNORD113-6 en de muis equivalent AF357425, te onderzoeken.

#### *MicroRNA-494-3p en microRNA-329-3p in gevorderde atherosclerose*

In **hoofdstuk 2** werden LDLr<sup>-/-</sup> muizen met gevorderde atherosclerose behandeld met 3GA-494, 3GA-329 of een scrambled sequence controle (3GA-ctrl). Een subset van muizen (baseline) werd direct na het tien weken volgen van een vet- en cholesterolrijk dieet opgeofferd. Wij tonen aan dat remming van miR-494-3p en, gedeeltelijk, miR-329-3p de progressie van plaque in de halsslagader stopte en de plaque stabiliteit in de aorta bevorderde. Plasma cholesterol niveaus werden sterk verlaagd na het veranderen van dieet van vet- en cholesterolrijk naar normaal voedsel. Hoewel we de behandeling met 3GA combineerden met het verlagen van plasma lipiden, werd de grootte van de plaque van zowel

3GA-494 als 3GA-329 muizen niet verminderd in vergelijking met de baseline muizen. Dit geeft aan dat, hoewel de plaque progressie werd verminderd, plaque regressie niet optrad in deze opzet.

In tegenstelling tot de plaques in de halsslagaders, verschilden de plaque groottes in de aorta niet tussen de groepen. De stabiliteit van de plaque is echter net zo belangrijk als, of zelfs belangrijker dan de grootte van de plaque voor het verminderen van het risico op cardiovasculaire events. Collageen biedt structurele support in de fibrotische kap van de plaque. Inhibitie van miR-494-3p verhoogde het collageen en verminderde het aantal macrofagen in de gevorderde aorta plaques. Het aantal plaque macrofagen werd verminderd door alleen het dieet te veranderen en werd verder verminderd wanneer muizen werden behandeld met miR-494-3p remmers.

Muizen behandeld met 3GA-494 hadden niet alleen een sterk verminderd aantal circulerende bloedplaatjes, maar ook een verminderd aantal pro-atherogene Ly6C<sup>hi</sup> monocyt en neutrofielen in de circulatie. Bloedplaatjes zijn sterk betrokken bij pro-inflammatoire reacties en vergemakkelijken de extravasatie van monocyt en neutrofielen in de plaque. Vermindering van hun aantal kan hebben bijgedragen aan de afname van plaque macrofagen, hetgeen gunstig is bij het stoppen van plaque progressie. Bloedplaatjes zijn essentieel in de bloedstolling. Een bloedprop is vaak de directe oorzaak van acute ischemische aandoeningen zoals ischemische beroerte en myocardinfarct. Wellicht zou een verlaging van hun aantal ook het risico op een acute cardiovasculaire events verminderen. Een drastische daling van het aantal bloedplaatjes gaat echter waarschijnlijk gepaard met een verhoogd risico op bloedingen, hoewel dit (nog) niet werd waargenomen bij de met 3GA-494 behandelde muizen. Een ander punt van zorg is de vergrote milt bij deze muizen. Wij vonden een sterke toename van het aantal megakaryocyten in de milt, de voorlopercellen van bloedplaatjes. Dit is waarschijnlijk een compensatiemechanisme om ernstige trombocytopenie te voorkomen. Behandeling met 3GA-494 leidde tot hyper-activatie van menselijke bloedplaatjes *in vitro* en zou de onderliggende oorzaak kunnen zijn van de snelle klaring van bloedplaatjes *in vivo*.

#### *MicroRNA-494-3p in macrofaag polarisatie*

Remming van miR-494-3p resulteerde in kleinere plaques met een verhoogde stabiliteit, zowel in vroege als in gevorderde atherosclerose (**hoofdstuk 2**). Aorta plaques bevatten minder macrofagen en het aantal pro-atherogene Ly6C<sup>hi</sup> monocyt en waren ook verminderd in de circulatie. Gebaseerd op deze bevindingen stelden wij de hypothese dat miR-494-3p

direct invloed heeft op macrofaag polarisatie in atherosclerose. Dit werd onderzocht in **hoofdstuk 3**.

Ten eerste toonden we aan dat endogene miR-494-3p gereguleerd wordt tijdens macrofaag polarisatie. MiR-494-3p expressie was verlaagd in pro-inflammatoire M1 en verhoogd in anti-inflammatoire M2 polarisatie. Ten tweede werden belangrijke polarisatie markers op mRNA en eiwit niveau gereguleerd door miR-494-3p. 3GA-494 behandeling remde miR-494-3p expressie in M1 macrofagen en dempte M1 polarisatie. 3GA-494 behandeling versterkte tegelijkertijd M2 polarisatie, terwijl miR-494-3p expressie verhoogd werd in M2 macrofagen. Beide zijn gunstig in het verminderen van plaque vorming en het verhogen van de stabiliteit. Dit komt overeen met de resultaten in **hoofdstuk 2**. In **hoofdstuk 3** toonden we ook aan dat remming van miR-494-3p in atherosclerotische plaques *in vivo* leidde tot een duidelijke vermindering van de pro-inflammatoire marker C-C motief chemokine receptor-2 (CCR2).

Pathway enrichment analyse voorspelde dat miR-494-3p meer dan 70 targets heeft die betrokken zijn bij macrofaag polarisatie. De pathway met de meeste toegewezen genen was de Wnt signalling pathway. MiR-494-3p reguleert inderdaad de expressie van meerdere Wnt signalling genen, waaronder LRP6 en TBL1X. Bij activatie van de Wnt signalling pathway wordt niet-gefosforyleerd  $\beta$ -catenine getransponeerd naar de kern, waar het downstream transcriptie induceert. De Wnt signalling pathway bleek inderdaad geactiveerd na behandeling met 3GA-494. Niet-gefosforyleerd  $\beta$ -catenine was verhoogd zowel in gekweekte M1 macrofagen als in plaques van hypercholesterolemische muizen. De gedempte M1 polarisatie wordt dus, althans gedeeltelijk, gereguleerd via geactiveerde Wnt signalling.

Wnt signalling is vooral bekend van (stam)cel differentiatie en de betrokkenheid bij ziekten, zoals kanker. Sommige studies suggereren echter een beschermende rol van Wnt signalling tegen atherosclerose. Wnt signalling zou bijvoorbeeld een rol kunnen spelen in het beperken van cholesterol-ophoping in atherosclerotische plaques. Bevindingen uit eerdere studies en uit dit proefschrift wijzen erop dat miR-494-3p remming cholesterolmetabolisme beïnvloedt. Efflux van high-density lipoproteïne (HDL) bijvoorbeeld, was verhoogd in miR-494-3p geremde macrofagen. MiR-494-3p inhibitie verminderde ook de grootte van de necrotische kern in vroege atherosclerotische plaques en verlaagde het plasma cholesterolgehalte *in vivo* (**hoofdstuk 2**). TREM2 is een marker voor ontstekingsremmende lipide-geladen macrofagen die betrokken zijn bij cholesterolmetabolisme. Hoewel geen direct miR-494-3p target, nam de expressie van TREM2 toe in M2 gepolariseerde macrofagen behandeld met 3GA-494. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase 1 (HMGCS1) is een vermoedelijk miR-494-3p



target en is betrokken bij de cholesterolsynthese. Van de vier humane donoren, toonden drie donoren een differentiële expressie van HMGCS1 na 3GA-494 behandeling, in zowel gekweekte M1 als M2 macrofagen (**hoofdstuk 3**). MiR-494-3p is daarom waarschijnlijk betrokken bij de regulatie van cholesterol metabolisme genen. De precieze mechanismen, en ook of Wnt signalling of andere relevante pathways hierbij betrokken zijn, zal echter nog uitgezocht moeten worden in toekomstig onderzoek.

Polarisatie van macrofagen naar M2 induceerde miR-494-3p expressie. MiR-494-3p expressie werd echter nog verder geïnduceerd in reactie op behandeling met miR-494-3p remmers (**hoofdstuk 3**). Dit onverwachte fenomeen werd ook waargenomen in zowel de bloedplaatjes als de gehele milt na behandeling met 3GA-494 (**hoofdstuk 2**). Mogelijk reguleert miR-494-3p de expressie van RNA-bindende eiwitten en reguleren RNA-bindende eiwitten op hun beurt de processing van miR-494-3p. RNA-bindend eiwit Mef2A, bijvoorbeeld, bindt direct aan pri-miR-494-3p. Welk mechanisme precies aan de basis ligt van deze subset-, cel-, en weefsel-specifieke autoregulatie, moet echter nog worden onderzocht.

Samenvattend, het eerste deel van dit proefschrift toont aan dat miR-494-3p bijdraagt aan de progressie van atherosclerose. Remming ervan stopt plaque progressie en verhoogt de stabiliteit van gevorderde plaques. Remming van miR-329-3p heeft een minder ingrijpend effect op de progressie van atherosclerose. Bovendien reguleert miR-494-3p ook rechtstreeks de activering en polarisatie van macrofagen. Inhibitie van miR-494-3p vermindert M1 polarisatie, terwijl M2 polarisatie wordt versterkt. Beide zijn gunstig in het afremmen van atherosclerose.

#### *AF357425/SNORD113-6 target mRNA's via pre-mRNA-processing en 2'Ome*

Van sommige "wees" C/D box snoRNA's, die dus geen bekende rRNA-targets hebben, is beschreven dat zij 2'Ome op andere type RNAs sturen, zoals mRNA's, microRNA's en tRNA's. Geheel andere functies, b.v. het sturen van alternatieve splicing en het reguleren van genexpressie op een microRNA-achtige manier, zijn ook beschreven voor "wees" C/D box snoRNAs.

In **hoofdstuk 4** hebben we één van de 14q32 snoRNAs, SNORD113-6 en zijn muizen equivalent AF357425, onderzocht. Met de D' antisense box bindt het snoRNA aan zijn RNA targets. De D' box antisense box van SNORD113-6/AF357425 is volledig geconserveerd tussen mens en muis. SNORD113-6/AF357425 en 14q32 snoRNA's in het algemeen, komen sterk tot expressie in fibroblasten. Daarom was ons eerste plan om AF357425 knock-out fibroblasten te

gebruiken. Deze konden echter niet worden verkregen, omdat AF357425-knockout klonen niet levensvatbaar bleken te zijn. Dit suggereert ofwel dat onze CRISPR/Cas9 strategie niet succesvol was of, meer waarschijnlijk, dat AF357425 essentieel is voor cel overleving. Daarom gebruikten we een antisense technologie om AF357425 in muizen fibroblasten te inhiberen (knockdown) of tot overexpressie te brengen. Vervolgens hebben we twee verschillende RNA sequencing (RNA-seq) strategieën toegepast op deze cellen. In één strategie, werd RNA-seq uitgevoerd op hele cel lysaten om alternatieve splicing en processing te onderzoeken. In de andere strategie werd RNA afkomstig van fibrillarine pulldown geïsoleerd. Vervolgens werd dit RNA vrijgemaakt van rRNA en gesequenced om fibrillarine-geassocieerde targets te identificeren.

Wij vonden een verrijking van AF357425 bindingsplaatsen (d.w.z. het omgekeerde complement van de D' antisense box) in het laatste exon en de 3'UTR van (pre)mRNAs. We identificeerden 46 genen met vermoedelijke snoRNA bindingsplaatsen. Deze vertoonden differentiële expressie van splice- of processing-varianten tussen AF357425 overexpressie en knockdown cellen. Van deze genen, hadden vermoedelijk 20 genen een geconserveerde bindingsplaats bij de mens. We selecteerden drie genen, DUSP7, JAG1 en EBPL, en bevestigden inderdaad veranderde processing onder SNORD113-6/AF357425 knockdown. Het bleek dat de locatie van de snoRNA-bindingsplaats bepaalt of de processing van het pre-mRNA al dan niet wordt beïnvloed door SNORD113-6/AF357425-knockdown. Een bindingsplaats in het laatste exon en 3'UTR, maar niet in introns, resulteerde in verhoogde expressie van de dominante variant (gedefinieerd door de variant met een bindingsplaats in exon/3'UTR, de eiwit-coderende variant of de variant met de meeste bindingsplaatsen) boven de alternatieve variant onder SNORD113-6/AF357425 knockdown.

Ook identificeerden we 7 genen uit de integrine pathway, MAP2K1, ITGB3, ITGA7, FLNB, NTN4, PARVB en COL4A4, die fibrillarine-afhankelijke 2'ome mRNA targets zijn van AF357425/SNORD113-6. De integrine pathway is belangrijk voor cel-cel en cel-matrix interacties. Bindingsplaatsen van deze genen waren zowel bij muis als mens geconserveerd, zij het voor sommige op verschillende locaties (laatste exon/3'UTR bij muis versus introns bij mens). We richtten ons op de integrine pathway, omdat deze de sterkste verrijking van targets had. We vonden echter ook mogelijke targets die betrokken zijn bij andere relevante cardiovasculaire pathways. Na het blokkeren van transcriptie, werd het mRNA van de targets sneller afgebroken onder knockdown van AF357425/SNORD113-6. 2'ome door AF357425/SNORD113-6 is dus belangrijk voor de stabiliteit van deze mRNA targets. De effecten op eiwitniveaus waren echter dubbelzinnig en hangen waarschijnlijk af van

verschillende factoren. De plaats van de bindingsplaats en de vraag of binding van AF357425/SNORD113-6 leidt tot 2'Ome of niet, zou de translatie van eiwitten kunnen beïnvloeden. Aan de ene kant laten we zien dat 2'Ome het mRNA beschermt tegen degradatie. Er is dus meer mRNA aanwezig om in eiwit te worden vertaald. Anderzijds kan 2'Ome op het mRNA de binding van het ribosoom belemmeren, wat resulteert in minder eiwit. Om meer duidelijkheid te krijgen in wat dit betekent voor de functie van fibroblasten, hebben we een aantal functionele assays uitgevoerd met humane arteriële fibroblasten. We vonden een verhoogde barrièrefunctie, een verhoogd vermogen om extracellulaire matrix samen te trekken en een verhoogde migratie in SNORD113-6 knockdown fibroblasten.

Zowel de integrine pathway als de fibroblast functie zijn belangrijk in cardiovasculaire remodellering en ziekte. Hoe de door SNORD113-6 gereguleerde fibroblastfunctie de cardiovasculaire remodellering en ziekte precies beïnvloedt, moet nog worden bepaald in toekomstig onderzoek.

#### *AF357425/SNORD113-6 reguleert fragmentatie van tRNAs via 2'Ome*

In **hoofdstuk 4** laten we zien dat AF357425/SNORD113-6 een breed scala van mRNAs target en hun expressie beïnvloedt via twee mechanismen, pre-mRNA processing en 2'Ome. Recente studies hebben aangetoond dat post-transcriptionele modificaties geleid door snoRNAs, 2'Ome en pseudouridylering  $\Psi$ , op tRNAs kunnen leiden tot hun splitsing in kleinere tRNA-afgeleide fragmenten (tRFs). In **hoofdstuk 5** wilden we daarom bepalen of AF357425/SNORD113-6 ook kleine RNAs kan targetten.

Small RNA sequencing (sRNA-seq) werd uitgevoerd op cel lysaten van ofwel AF357425 geremde of tot overexpressie gebrachte AF357425 muizen fibroblasten. De kleine RNA's die het meest in expressie veranderden waren tRF's. De totale vorming van tRFs was verminderd in AF357425 knockdown fibroblasten. Wanneer gestratificeerd naar fragmentlengte, waren de kleinere tRFs (18-30 nucleotiden) verrijkt en de langere tRFs (30-45 nucleotiden) verminderd in deze cellen.

Wij focuste ons op één van de tRNA's, tRNA Leucine anti-codon TAA (tRNA<sup>Leu</sup>(TAA)), om het onderliggende werkingsmechanisme te onderzoeken. tRNA<sup>Leu</sup>(TAA) heeft een voorspelde bindingsplaats voor AF357425/SNORD113-6, die inderdaad door AF357425/SNORD113-6 bleek te worden gemethyleerd. AF357425/SNORD113-6 knockdown had geen invloed op de degradatie van tRNA<sup>Leu</sup>(TAA). Deze enkele 2'Ome site is dus niet essentieel voor de algemene stabiliteit van het tRNA. De dominante tRF van tRNA<sup>Leu</sup>(TAA), tRF<sup>Leu</sup><sub>47-64</sub> wordt gevormd

aangrenzend aan de 2'Ome site. Knockdown van AF357425/SNORD113-6 verhoogde de verhouding van tRF<sup>Leu 47-64</sup> tot tRNA<sup>Leu(TAA)</sup>. Dit suggereert dat 2'Ome door AF357425/SNORD113-6 plaats-specifieke fragmentatie van tRNAs in kleine fragmenten (~18 nucleotiden in lengte) voorkomt.

Het is aangetoond dat fragmentatie van tRNAs toeneemt onder cellulaire stress, zoals hypoxie en oxidatieve stress. Plasmaniveaus van 14q32 snoRNA's zijn ook gereguleerd onder ischemische condities bij perifeer vaatlijden patiënten. Zoals verwacht verhoogde blootstelling van cellen aan cellulaire stress de expressie van AF357425/SNORD113-6, maar ook van tRNA<sup>Leu(TAA)</sup> en tRF<sup>Leu 47-64</sup>. Echter, het induceren van cellulaire stress verhoogde de verhouding van tRF<sup>Leu 47-64</sup> ten opzichte van het volwassen tRNA<sup>Leu(TAA)</sup> niet verder in AF357425/SNORD113-6 knockdown cellen. In feite was de sterkste toename van deze verhouding in cellen gekweekt onder fysiologische omstandigheden, zonder inductie van cellulaire stress. Een verklaring zou kunnen zijn dat andere endonucleasen geactiveerd worden tijdens cellulaire stress en alternatieve tRF soorten produceren uit volwassen tRNA<sup>Leu(TAA)</sup>. Het zou ook kunnen dat de opregulatie van AF357425/SNORD113-6 onder cellulaire stress, de effecten van snoRNA knockdown compenseert.

Dit specifieke tRF<sup>Leu 47-64</sup> kan een belangrijke rol spelen in de celfysiologie, aangezien het onder fysiologische omstandigheden wordt geproduceerd en niet uitsluitend tijdens cellulaire stress. Voor tRF's zijn allerlei regulerende functies beschreven. Zij reguleren de translatie van eiwitten, vervullen microRNA-achtige functies en hebben interactie met RNA-bindende eiwitten. TRFs kunnen zowel cel fenotypes reguleren, bv. hartspiercellen, skeletspiercellen en endotheelcellen, als ook volledige complexe vasculaire processen reguleren zoals angiogenese. De exacte functie van deze AF357425/SNORD113-6-afhankelijke tRF<sup>Leu 47-64</sup> en zijn rol in vasculaire remodelling is nog niet bekend en moet dus nog in toekomstig onderzoek worden vastgesteld.

Samenvattend blijkt uit het tweede deel van dit proefschrift dat SNORD113-6/AF357425 een breed scala van mRNA's target en hun expressie beïnvloedt via twee mechanismen, pre-mRNA processing en 2'Ome. Beide mechanismen stabiliseren mRNA's en beïnvloeden het fenotype van fibroblasten. Verder laten we zien dat SNORD113-6/AF357425 ook tRNA's target via 2'Ome en dat dit de fragmentatie beïnvloedt. We hebben ingezoomd op het mechanisme van tRNA<sup>Leu(TAA)</sup>. Deze inzichten in de functie van SNORD113-6/AF357425 en hoe dit snoRNA de fibroblastfunctie beïnvloedt, kunnen nieuwe therapeutische mogelijkheden bieden bij de behandeling van hart- en vaatziekten.

## **Conclusie**

Dit proefschrift heeft (een deel van) de bijdrage van 14q32 microRNAs en snoRNAs aan de progressie van hart- en vaatziekten laten zien. We hebben ook hun therapeutisch potentieel onderzocht. In het eerste deel van het proefschrift hebben we aangetoond dat remmen van miR-494-3p potentieel heeft in het verminderen van atherosclerose. In het tweede deel onderzochten we zowel de functie als de RNA targets van één 14q32 snoRNA, het humane SNORD113-6 en zijn muizen equivalent AF357425. Dit leverde nieuwe inzichten op in de functie van menselijke arteriële fibroblasten. Er moeten nog talrijke hindernissen worden overwonnen voordat deze fundamentele kennis in de geneeskunde kan worden toegepast. Een beter begrip van de onderliggende pathogenese van de ziekte, waartoe dit proefschrift heeft bijgedragen, creëert echter wel nieuwe therapeutische mogelijkheden voor hart- en vaatziekten.



