

Verminderen van TLR4 expressie op mRNA niveau met behulp van RNA interferentie

Naam:	Jessica Snabel
Opleiding:	Life Sciences, Moleculaire Biologie
Instelling:	Hogeschool van Utrecht
Bedrijf:	TNO Preventie en Gezondheid te Leiden
Stagebegeleider:	Daniël Eefting
Schoolbegeleider:	Peter Koppert
Stageperiode:	februari 2004 – december 2004
Plaats en datum:	Leiden, 17 december 2004

Mediatheek HvU



0300 522 7293

Voorwoord

Toll-like receptor 4 (TLR4) speelt een rol bij ontstekingsprocessen. Er is al aangetoond door onder andere Vink et al. en Hollestelle et al. dat deze receptor een belangrijke rol speelt bij atherosclerose en restenose. Bij activatie van de receptor treedt er een ontstekingsproces op, waardoor gladde spiercellen en fibroblasten uit de media en adventitia prolifereren en naar de intima migreren. Het ontstekingsproces kan uiteindelijk leiden tot verdikking van de vaatwand en plaquevorming.

Wanneer patiënten met atherosclerose worden behandeld d.m.v. een dotterprocedure of een bypassoperatie, treedt er bij 30-50 % van de patiënten weer een verdikking van de bloedvatwand op die uiteindelijk kan leiden tot een hernieuwde afsluiting van het bloedvat. Dit proces heet restenose. Hoewel er al therapieën bestaan om dit proces te remmen, is er nog steeds onderzoek noodzakelijk om deze behandelingen te optimaliseren of een nieuwe, nog betere, behandeling te vinden.

Binnen de groep Tissue Repair van het Gaubius Laboratorium TNO-PG te Leiden wordt onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om restenose te remmen met behulp van gentherapie, waarbij inflammatie en daarmee de migratie en proliferatie van vaatwand cellen wordt geremd.

Met behulp van RNA interferentie wordt geprobeerd om de expressie *in vitro* van TLR4 op mRNA niveau te remmen en dus uiteindelijk vermindering van expressie van het TLR4 eiwit. Het uiteindelijke doel is om *in vivo* de expressie van deze receptor te remmen op gladde spiercellen en fibroblasten, zodat deze cellen minder zullen migreren naar de intima.

Samenvatting

Toll-like receptor 4 (TLR4) speelt een rol bij ontstekingsprocessen. Er is al aangetoond door onder andere Vink et al. en Hollestelle et al. dat deze receptor een belangrijke rol speelt bij atherosclerose en restenose.

Atherosclerose is een van de meest voorkomende en dodelijkste ziekten van de Westerse wereld. Van alle doodsoorzaken in Nederland in 2002 werd 35 % veroorzaakt door hart- en vaatziekten. Door factoren zoals: erfelijke aanleg, (te) weinig lichaamsbeweging, roken, abnormale hoge cholesterolgehalten, overgewicht, hoge bloeddruk en diabetes wordt de kans op atherosclerose verhoogd.

Atherosclerose wordt veroorzaakt endotheelbeschadiging. Als reactie op de endotheelbeschadiging worden er pro-inflammatoire cytokinen en Heat Shock Protein 60 (HSP60) geproduceerd. HSP60 is een ligand voor TLR4. TLR4 komt voor in gladde spiercellen en fibroblasten van de bloedvatwand. Bij activatie van TLR4 worden pro-inflammatoire cytokinen geproduceerd. Een gevolg hiervan is migratie en proliferatie van gladde spiercellen en fibroblasten uit de media en adventitia naar de intima van de bloedvatwand. Als reactie op de pro-inflammatoire cytokinen wordt ook een immuunrespons opgewekt, wanneer dit aanhoudt wordt een plaque gevormd. Wanneer deze plaque losscheurt en elders in het lichaam een bloedvat afsluit kan dit leiden tot een infarct van het betreffende orgaan.

Om dit te voorkomen wordt er een dotterbehandeling of een bypassoperatie uitgevoerd. Bij deze behandelingen wordt het endotheel beschadigd, daardoor treedt bij 30-50 % van de patiënten weer een verdikking van de bloedvatwand op die uiteindelijk kan leiden tot een hernieuwde afsluiting van het bloedvat. Dit proces heet restenose. Hoewel er al therapieën bestaan om dit proces tegen te gaan, is er nog geen effectieve behandeling.

Men denkt dat wanneer de expressie van TLR4 wordt verminderd op gladde spiercellen en fibroblasten dit zal zorgen voor minder proliferatie en migratie van deze cellen naar de intima van de vaatwand. Op deze manier probeert men in te grijpen op het restenoseproces.

Met behulp van RNA interferentie wordt tijdens dit onderzoek geprobeerd op *in vitro* de expressie van TLR4 op mRNA niveau te remmen, op deze manier zal uiteindelijk de expressie van het TLR4 eiwit worden verminderd. RNA interferentie is een natuurlijk cellulair verdedigingsmechanisme. Het principe is eenvoudig: kleine RNA moleculen (small interfering RNA: siRNA, ± 21-23 nucleotiden), welke complementaire sequenties bevatten voor gedeeltes van het mRNA, worden in de cel gebracht. Wanneer deze siRNA moleculen hechten aan het mRNA wordt het mRNA in tweeën geknipt en vernietigd door nucleases. Hierdoor wordt er geen eiwit afgeschreven.

Tijdens het onderzoek is op drie manieren geprobeerd om de TLR4 expressie op mRNA niveau te verminderen. Bij de eerste twee manieren werd gebruik gemaakt van een vector met een siTLR4 sequentie. De vectoren die werden gebruikt zijn pSuppressor-siTLR4 waarvan de sequentie werd ontworpen en gekloneerd in de vector in Utrecht en pHippy-siTLR4 waarvan de sequentie zelf werd ontworpen en gekloneerd in de vector. Bij de derde manier werden commerciële siRNA's besteld en in de cel getransfecteerd.

Gladde spiercellen uit de vaatwand van de muis bleken niet geschikt voor de experimenten. De experimenten zijn uitgevoerd met een muizen fibroblasten cellijn. Deze fibroblasten waren niet afkomstig uit de vaatwand, maar brachten wel TLR4 tot expressie en waren goed te transfecteren. pSuppressor-siTLR4 zorgde niet voor reductie van TLR4 op mRNA niveau, de oorzaak hiervan kon zijn dat de vector of de sequenties niet werkzaam waren. De pHippy vector bleek wel een goede siRNA vector te zijn en daarom werden de zelf ontworpen siTLR4 sequenties hierin gekloneerd. Na transfectie in fibroblasten bleek dat de vector zelf voor de meeste reductie van TLR4 te zorgen i.p.v. de vector met de siTLR4 sequenties. Uiteindelijk zijn er commerciële siTLR4's besteld en als siRNA's getransfecteerd in fibroblasten. Deze commerciële siTLR4's zorgden voor reductie van TLR4 op mRNA niveau.

In het vervolgonderzoek moeten de sequenties van de commerciële siRNA's als oligo's worden besteld en in de pHippy vector worden gekloneerd. Ook moet worden bepaald hoeveel reductie van TLR4 op mRNA niveau nodig is voor reductie van TLR4 expressie op eiwitniveau. Uiteindelijk moet de bloedvatwand *in vivo* worden getransfecteerd met pHippy-siTLR4 wat weer nieuwe problemen met zich meebrengt.

Summary

Toll-like sensor 4 (TLR4) plays a role in inflammation processes. The receptor plays an important role at atherosclerosis and restenosis, as described by Vink et al. and Hollestelle et al.

Atherosclerosis is the most deadly disease of the Western world. Of all causes of death in the Netherlands in 2002, 35% were caused by coronary diseases. Factors such as: hereditary construction, little body movement, smoking, abnormal high cholesterol levels, overweight, high blood pressure and diabetes increase the chances for developing atherosclerosis.

Atherosclerosis is caused by endothelial damage. As a response to the endothelial damage, pro-inflammatory cytokines and Heat Shock Protein 60 (HSP60) are produced. HSP60 is a ligand for TLR4. TLR4 is expressed in smooth muscle cells (SMC's) and fibroblasts in the vessel wall. As a result of TLR4 activation, pro-inflammatory cytokines are produced which cause proliferation and migration of SMC's and fibroblasts from the media and adventitia toward the intima of the vessel wall. As a response to pro-inflammatory cytokines, immune responses are activated and a plaque is formed. When this plaque ruptures it can lead to an infarction.

To prevent infarctions, patients are treated by Percutane Transluminal (Coronatic) Angioplasty (PT(C)A) or bypass surgery. Both of these treatments cause endothelial damage and as a result 30-50% of the patient's blood vessel thickens. This process is called restenosis. At present there are several therapies aimed at reducing restenosis, but there is still no effective treatment.

The purpose of this study was to reduce TLR4 expression in SMC's and fibroblasts, so that eventually the migration and proliferation of these cells is blocked. Using RNA interference during this study, we tried to reduce the TLR4 mRNA expression *in vitro*, eventually resulting in reduced expression of the TLR4 protein. RNA interference is a natural cellular maintaining mechanism. The principle of siRNA/RNAi is simple: small RNA molecules (small interfering RNA: siRNA, $\pm$ 21-23 nucleotides) which contain complementary sequences for parts of the mRNA, are transfected in the cell. When these siRNA attach to the mRNA, the mRNA is split and destroyed by nucleases. Because of this process, there is no translation of the protein.

During the study we tried to reduce TLR4 on mRNA level in three manners. At the first and the second manner we used a vector with siTLR4 a sequence. The vectors were pSuppressor-siTLR4 of which the sequence was designed and cloned in the vector by researchers in Utrecht and pHippy-siTLR4 of which the sequence was designed and cloned in the vector by us. At the third manner commercial siRNA's were ordered and transfected in the cells.

Smooth muscle cells of the mouse blood vessel wall did not appear suitable for experiments. Experiments have been carried out with a mouse fibroblasts cell line. These were not fibroblasts of the blood vessel wall, but TLR4 was expressed and good transfection was possible. pSuppressor-siTLR4 did not ensure reduction of TLR4 at mRNA level, the cause of this could be that the vector or the sequences were not operative. The pHippy vector proved to be a good siRNA vector and for this reason the designed siTLR4 sequences were cloned in this vector. After transfection in fibroblasts appeared that the vector without the siTLR4 sequences caused the most reduction of TLR4. Eventually we ordered commercial siTLR4's as siRNA's and transfected them in fibroblasts. These commercial siTLR4's ensured reduction of TLR4 on mRNA levels.

In the future the sequences of the commercial siRNA's must be ordered as oligo's and cloned in the pHippy vector. We have to determine how much reduction of TLR4 at mRNA level must be necessary is for reduction of TLR4 expression at protein level. Eventually the blood vessel wall *in vivo* must be transfected with pHippy-siTLR4, this will cause new problems.

Lijst van afkortingen

• HSP60	=	Heat Shock Protein 60
• IKK	=	Inhibitory Kappa β Kinase
• IL-1	=	Interleukin-1
• IL-1R	=	Interleukin-1 Receptor
• IL-8	=	Interleukin-8
• IP-10	=	IFN-gamma-Inducible Protein-10
• IRAK	=	IL-1RI-Associated Protein Kinases
• LDL	=	Low-Density Lipoprotein
• LPS	=	Lipopolysaccharide
• MCP	=	Monocyt Chemotactic Protein
• M-CSF	=	Macrophage Colony Stimulating Factor
• MIP-1 β	=	Macrophage Inflammatory Protein 1 β
• mTLR4	=	Muis TLR4
• MyD88	=	Myeloid Differentiation factor 88
• NF- κ B	=	Nuclear Factor kappa β
• RNAi	=	RNA interference
• siRNA	=	small interfering RNA
• SMC	=	Smooth Muscle Cell (gladde spiercel)
• TAB1	=	TAK1-Binding protein 1
• TAB2	=	TAK1-Binding protein 2
• TAK1	=	TGF- β -Activated Kinase
• TLR	=	Toll-like Receptor
• TNF- α	=	Tumor Necrosis Factor α
• TRAF6	=	Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6

Inhoud

Voorwoord..... i

Samenvatting..... ii

Summary..... iv

Lijst van afkortingen..... vi

Hoofdstuk 1: Inleiding..... 3

§1.1 Atherosclerose..... 4

 §1.1.1 Plaque vorming..... 4

§1.2 Restenose..... 6

§1.3 Toll-like receptor 4..... 8

 §1.3.1 Toll-like receptoren (TLRs)..... 8

 §1.3.2 TLR4..... 8

 §1.3.2.1 LPS..... 8

 §1.3.2.2 HSPs..... 8

 §1.3.3 TLR signaling pathway..... 9

§1.4 RNA interferentie (RNAi)..... 11

 §1.4.1 Mechanisme..... 11

Hoofdstuk 2: Materiaal en methode..... 13

pSuppressor-siTLR4

§2.1 Celkweek..... 13

§2.2 Transfectie..... 13

 §2.2.1 Transfectie cellen d.m.v. nucleofectie (Amaxa)..... 13

 §2.2.2 Transfectie cellen d.m.v. Lipofectamine 2000..... 14

§2.3 Detectiemethoden voor reporter genen..... 14

 §2.3.1 GFP: Fluorescentiemicroscopie..... 14

 §2.3.2 Luciferase meting..... 14

 §2.3.3 LacZ: X-gal kleuring..... 15

§2.4 RNA isolatie..... 15

 §2.4.1 Lab on a Chip..... 15

§2.5 cDNA synthese..... 15

§2.6 Real Time RT-PCR..... 16

pHippy-siTLR4

§2.7 Kloneren..... 17

 §2.7.1 Digestie..... 17

 §2.7.2 Zuiveren..... 17

 §2.7.3 Sappen..... 17

 §2.7.4 Kineren..... 18

 §2.7.5 Ligatie..... 18

 §2.7.6 Transformatie..... 18

§2.8 Plasmide isolatie..... 18

§2.9 Concentratiebepaling DNA..... 19

§2.10 Controle van de kloon..... 19

Commerciële siTLR4

Hoofdstuk 3: Resultaten	20
§3.1 pSuppressor-siTLR4	21
§3.1.1 Muizen aorta gladde spiercellen (<i>maSMC</i>)	21
§3.1.2 3T3 cellen	21
§3.1.2.1 Transfectie d.m.v. nucleofectie	22
§3.1.2.1 Transfectie d.m.v. lipofectie	23
§3.2 pHippy-siTLR4	24
§3.2.1 pHippy-siLuc	24
§3.2.1.1 In vitro	24
§3.2.1.1 In vivo	25
§3.2.2 pHippy-siTLR4	26
§3.3 Commerciële siTLR4	27
§3.3.1 Tijdsreeks siTLR4, transfectie d.m.v. lipofectie	27
§3.3.2 Transfectie d.m.v. nucleofectie	28
Hoofdstuk 4: Discussie en conclusie	29
Literatuur	31
Bijlage 1: LB medium en agarplaten	I
Bijlage 2: Plasmide DNA digestie d.m.v. restrictie enzymen en 1,2 % agarosegel maken	II
Bijlage 3: Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	IV
Bijlage 4: Ontwerpen van de siTLR4 oligo's	V
Bijlage 5: DNA/RNA concentratie meten m.b.v. de Nanodrop	VIII
Bijlage 6: Sappen en ligeren	X
Bijlage 7: Kineren en hybridiseren van oligo's	XI
Bijlage 8: Transformatie plasmide DNA in <i>E. coli</i> DH5a competente cellen	XII
Bijlage 9: Miniprep volgens Promega Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	XIII
Bijlage 10: Maxi/Gigaprep volgens QIAGEN® Plasmid Purification	XIV
Bijlage 11: Celkweek 3T3, HER911 en SMC's	XV
Bijlage 12: Transfectie 3T3/<i>maSMC</i> d.m.v. Amaxa	XVI
Bijlage 13: Transfectie HER911/3T3 d.m.v. Lipofectamine 2000	XVIII
Bijlage 14: Luciferase meting	XIX
Bijlage 15: RNA isolatie uit cellen volgens QIAGEN RNeasy® Mini Kit	XX
Bijlage 16: RNA isolatie uit weefsel volgens Chromczynski	XXI
Bijlage 17: Kwaliteit RNA bepalen d.m.v. Lab on a Chip	XXII
Bijlage 18: cDNA synthese d.m.v. Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand beads	XXIII
Bijlage 19: cDNA synthese d.m.v. Promega Reverse Transcription System	XXIV
Bijlage 20: siRNA sequenties Ambion	XXV
Bijlage 21: Transfectie 3T3 met siTLR4 Ambion d.m.v. Lipofectamine 2000	XXVI
Bijlage 22: Kloneren van zelf ontworpen siTLR4 in pHippy-siLuc	XXVIII

Hoofdstuk 1: Inleiding

Toll-like receptor 4 (TLR4) speelt een rol bij ontstekingsprocessen. Er is onder andere al aangetoond door Vink et al. [17, 18] en Hollestelle et al. [19] dat deze receptor een belangrijke rol speelt bij atherosclerose en restenose. Bij activatie van de receptor treedt er een ontstekingsproces op, waardoor gladde spiercellen en fibroblasten uit de media en adventitia prolifereren en naar de intima migreren. Het ontstekingsproces kan uiteindelijk leiden tot verdikking van de vaatwand en plaquevorming. In §1.1 wordt dit proces beschreven.

Wanneer patiënten met atherosclerose worden behandeld d.m.v. een dotterprocedure of een bypassoperatie, treedt er bij 30-50 % van de patiënten weer een verdikking van de bloedvatwand op die uiteindelijk kan leiden tot een hernieuwde afsluiting van het bloedvat. Dit proces heet restenose en wordt beschreven in §1.2. Hoewel er al therapieën bestaan om dit proces tegen te gaan, is er nog geen effectieve behandeling.

Met behulp van RNA interferentie wordt geprobeerd om de expressie *in vitro* van TLR4 op mRNA niveau te remmen, op deze manier zal uiteindelijk de expressie van het TLR4 eiwit worden verminderd. De rol van TLR4 in het ontstekingsproces wordt beschreven in §1.3 en in §1.4 wordt ingegaan op RNA interferentie.

Materiaal en methode zijn beschreven in hoofdstuk 2, gevolgd door de resultaten en discussie en conclusie in hoofdstuk 3 en 4.

§1.1 Atherosclerose

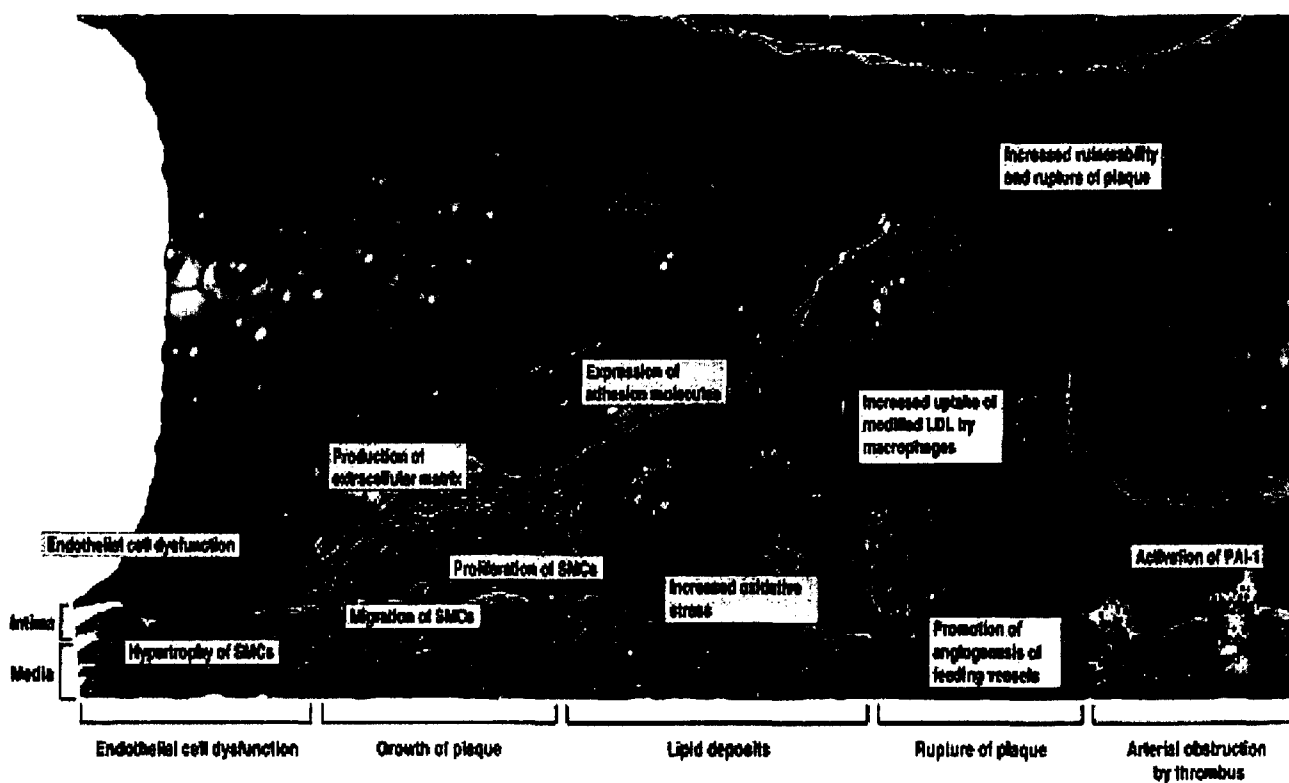
Atherosclerose is één van de meest voorkomende en dodelijkste ziekten van de Westerse wereld.[1] Van alle doodsoorzaken in Nederland in 2002 werd 35 % veroorzaakt door hart- en vaatziekten.[2] Door factoren zoals: erfelijke aanleg, (te) weinig lichaamsbeweging, roken, abnormale cholesterolgehalten, overgewicht, hoge bloeddruk en diabetes wordt de kans op atherosclerose verhoogd.

Een korte omschrijving van het ziektebeeld is: het geleidelijk dichtslibben van de binnenwand van de bloedvaten met plaques, die bestaan uit cholesterol en spier- en bindweefselcellen van de vaatwand.[3]

Atherosclerose komt in principe voor bij grote en middelgrote elastische en gespierde slagaders en kan leiden tot ischemie van het hart, de hersenen, extremiteiten (ledematen, met name de benen) of in het uiterste geval tot een infarct van het betreffende orgaan.[4]

§1.1.1 Plaque vorming

In figuur 1.1 is de vorming van een plaque weergegeven. De processen die plaatsvinden om deze plaque te vormen worden hieronder beschreven.



Figuur 1.1 Vorming van een atherosclerotische plaque.[5]

Beschadiging van het endotheel

Het begin van atherosclerose is de beschadiging van het endotheel. Deze beschadiging is het begin van de ontstekingsreactie.

Groei van de plaque

Als reactie op de endotheelbeschadiging worden er pro-inflammatoire stoffen geproduceerd, waaronder Heat Shock Protein 60 (HSP60), een ligand voor TLR4. Activatie van TLR4 zorgt voor productie van pro-inflammatoire cytokinen, waardoor o.a. gladde spiercellen en fibroblasten prolifereren en migreren naar de intima van de bloedvatwand. Zie verder §1.3

Lipide afgifte[4]

Wanneer de LDL deeltjes vast komen te zitten in de arterie worden ze geoxideerd en opgenomen door macrofagen. Geoxideerd LDL werkt chemotactisch voor monocyt en stimuleert de expressie van de genen voor macrofaag koloniestimulatie factor (M-CSF) en monocyot chemotactisch eiwit (MCP) in de endotheelcellen. Ontstekingsmediatoren zoals TNF- α , interleukine-1 (IL-1) en M-CSF zorgen voor de toename van de binding van LDL aan het endotheel en zorgen voor toename van transcriptie van het LDL-receptor gen.

De immuunrespons zorgt voor activatie van monocyt en T cellen. Hierdoor neemt het aantal receptoren op de celoppervlakte van deze cellen toe. Wanneer ligand bindt zorgt dit voor verdere activatie van de mononucleaire cellen, het zorgt ook voor cel proliferatie en helpt bij het bepalen en lokaliseren van de immuunreactie van de plaque. Activatie van de monocyt en T cellen leidt ook tot afgifte van hydrolytische enzymen, cytokinen, chemokinen en groeifactoren, welke verdere beschadiging veroorzaken en uiteindelijk kunnen leiden tot necrose.

Wanneer de immuunrespons aanhoudt, kan de vaatwand verdikken. De vaatwand compenseert deze verdikking door dilatatie zodat de lumengrootte niet verandert. Op een bepaald moment kan de arterie niet meer compenseren door dilatatie en dan verstoort de plaque de bloedstroom.

Ruptuur van de plaque

Wanneer de plaque de bloedstroom verstoort, wordt er een trombus gevormd. De plaque kan losscheuren en in de bloedstroom terecht komen. Wanneer deze plaque elders in het lichaam een bloedvat afsluit kan dit leiden tot een infarct van het betreffende orgaan.

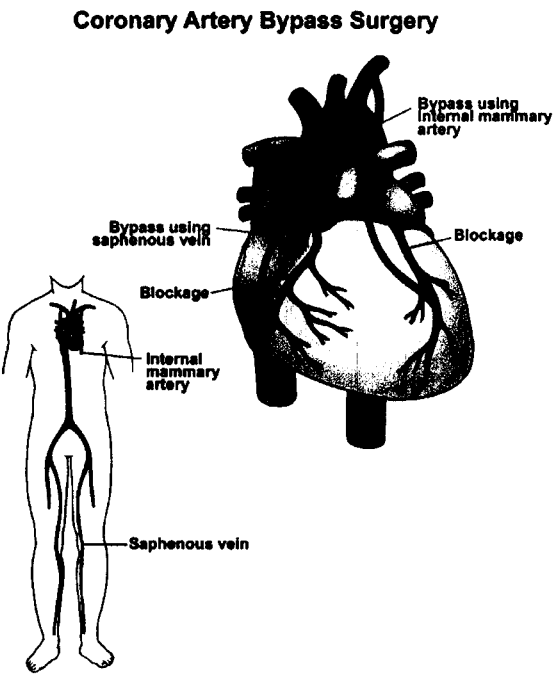
§1.2 Restenose

Om te voorkomen dat patiënten met atherosclerose een infarct krijgen, worden ze behandeld d.m.v. een dotterbehandeling of een bypassoperatie. Bij een dotterbehandeling wordt een ballonnetje in het vat geplaatst en wordt het opgeblazen op de plaats van de plaque, daarna is het mogelijk om een stent te plaatsen (dit gebeurt niet altijd) zie figuur 1.2.



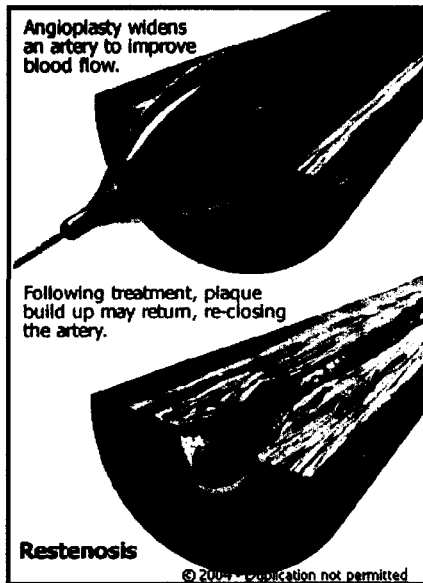
Figuur 1.2 Dotterbehandeling.[6]

Bij een bypassoperatie wordt een bloedvat aangesloten zowel voor en na de afsluiting, waarmee deze vernauwing wordt omzeild. Als extra bloedvat kan zowel een kunststof als een natuurlijk (eigen) bloedvat gebruikt worden.



Figuur 1.3 Bypass.[8]

Bij deze ingrepen wordt het endotheel beschadigd, hierdoor treedt er bij 30-50% van de behandelde patiënten binnen enkele maanden na de ingreep weer een verdikking van de vaatwand op die uiteindelijk kan leiden tot een hernieuwde afsluiting van het bloedvat (figuur 1.4). Dit proces heet restenose.



Figuur 1.4 Restenose. [9]

Door patiënten te behandelen met stents welke met ontstekingsremmende medicijnen zijn geladen wordt geprobeerd om dit proces tegen te gaan. Er zijn een aantal hoopgevende resultaten, maar ook blijkt dat de stent zelf weer voor restenose zorgt.

Een belangrijk proces in de restenosevorming is de proliferatie en migratie van gladde spiercellen en fibroblasten uit de media en de adventitia naar de intima van de vaatwand. Dit is een reactie op de activatie van TLR4 door HSP60 op deze cellen. Door de TLR4 expressie te verlagen, is theoretisch de restenosevorming te verminderen.

§1.3 Toll-like receptor 4

§1.3.1 Toll-like receptoren (TLRs) [7]

De aangeboren immuunrespons is het eerste verdedigingsmechanisme tegen indringende micro-organismen. Fagocyten kunnen pathogenen onderscheiden van eigen signalen d.m.v. Toll-like receptoren (TLRs). TLRs herkennen liganden welke wel in micro-organismen voorkomen, maar niet in gewervelden. Binding van deze liganden (mannoses van de gistcelwand, eiwitten en verschillende bacteriële celwandcomponenten zoals lipopolysaccharides (LPS), lipopeptides en peptidoglycanen) aan TLRs veroorzaken de productie van antimicrobiële peptides en cytokines.

Het aangeboren immuunsysteem onderscheidt pathogenen en eigen moleculen met een klein aantal receptoren. Ze herkennen geconserveerde motieven op pathogenen welke niet worden gevonden in hogere eukaryoten.

§1.3.2 TLR4 [10]

De activatie van het immuunsysteem door TLR4 wordt veroorzaakt door exogeen LPS of endogene cellulaire fibronectines en heat shock protein 60 (HSP60). De endogene peptides worden geproduceerd als reactie op weefselbeschadiging.

Functioneel TLR4 komt voor in de fibroblasten in de adventitia en in gladde spiercellen in de media van de vaatwand. Activatie van TLR4 zorgt voor activatie van NF- κ B (Nuclear Factor kappa β : transcriptiefactor, door activatie worden pro-inflammatoire genen getranscribeerd) en de productie van cytokines, dit zorgt o.a. voor proliferatie en migratie van gladde spiercellen en fibroblasten naar de intima van de vaatwand.

§1.3.2.1 LPS

Activatie TLR4 door LPS zorgt verhoging van onderstaande cytokines op mRNA niveau.

- RANTES, IP-10, MIP-1 β , MCP-1 en IL-8 $\rightarrow$ chemo-attractanten van monocyten en T-cellen.
- IP-10, IL-1, IL-6 en IL-8 $\rightarrow$ beïnvloeden gladde spiercel proliferatie en/of migratie naar de intima.

§1.3.2.2 HSPs [11]

Heat shock proteins (HSPs) zijn aanwezig in de meeste cellen, ze spelen een rol in bescherming van de cel tegen beschadiging als reactie op stress stimuli.

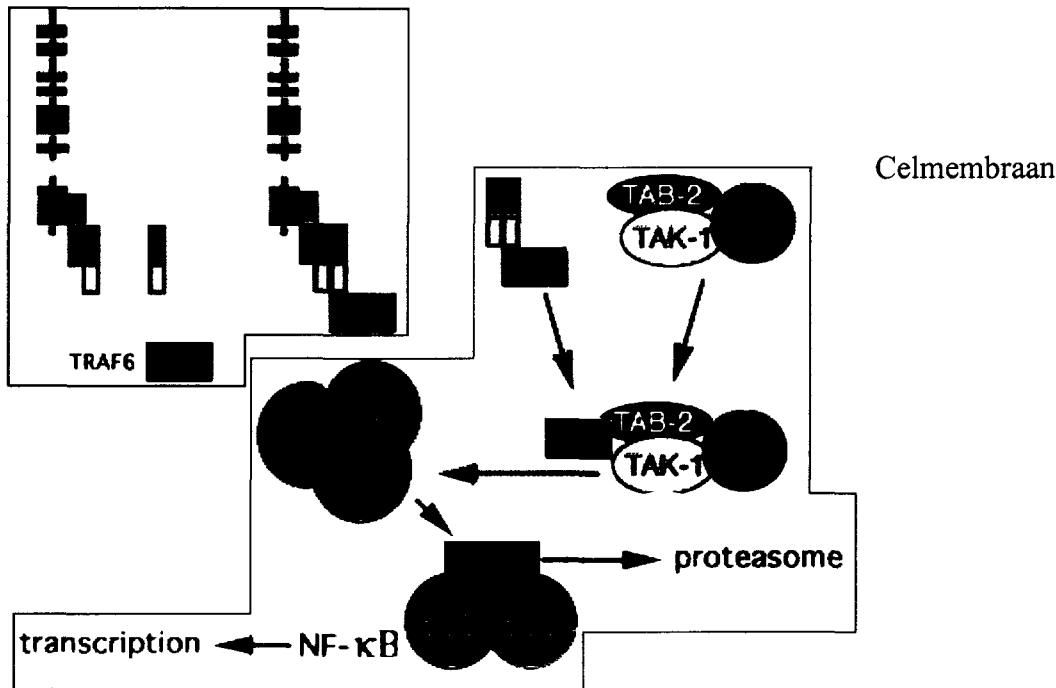
HSPs komen verhoogd tot expressie in atherosclerotische laesies bij mensen, konijnen en ApoE (-/-) muizen. Factoren zoals infecties, geoxideerd LDL, oxidatieve stress, hoge bloeddruk en biochemische stress, zorgen voor HSP overexpressie in endotheliale cellen, macrofagen en gladde spiercellen door activatie van heat shock transcriptie factor 1.

HSP komen onder normale omstandigheden voor in de cel, maar bij atherosclerose komen ze in opgeloste vorm voor in het bloed. Deze opgeloste vorm bindt specifiek aan TLR4 en zorgt zo voor een immuunrespons. Hierdoor worden pro-inflammatoire cytokines door macrofagen geproduceerd en adhesiemoleculen in endotheelcellen via NF- κ B activatie.

De pro-inflammatoire respons en de auto-immuun reactie tegen HSPs in de vaatwand kunnen deelnemen aan het begin en voortgang van atherosclerose en restenose.

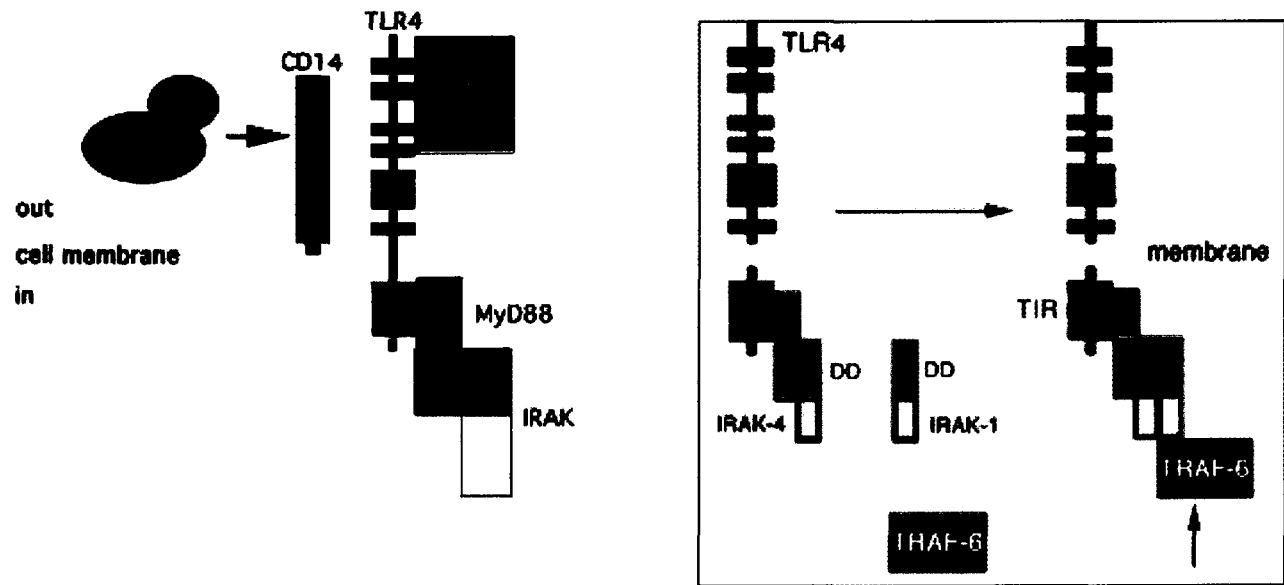
§1.3.3 TLR signaling pathway [7]

In figuur 1.5 is de TLR signaling pathway weergegeven. Belangrijke moleculen zijn: het adaptor molecuul MyD88, IL-1RI-associated protein kinases (IRAK's), de TGF- β -activated kinase (TAK1), TAK1-binding protein 1 (TAB1) en 2 (TAB2) en de tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6).



Figuur 1.5 Totaaloverzicht TLR signaling pathway.[7]

Door activatie van TLR4 door LPS of HSP60 vormt MyD88 met TLR4 een dimeer (figuur 1.6). Binding van MyD88 bevordert binding van IRAK-4 en IRAK-1, bij binding fosforyleert IRAK-4 IRAK-1. Door deze fosforylering wordt TRAF6 wordt aangetrokken naar IRAK-1 (figuur 1.7).

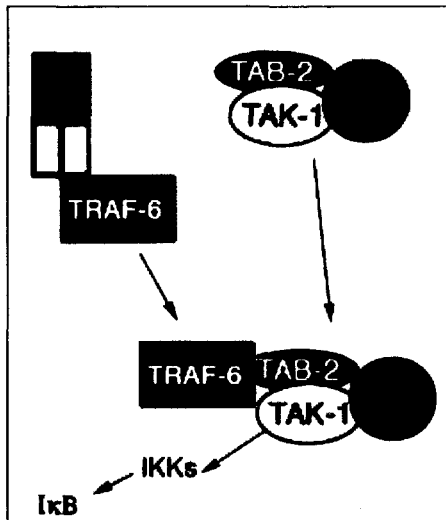


Figuur 1.6 Dimeervorming van TLR met MyD88 [7]

Het IRAK-4/IRAK-1/TRAF6 complex laat los van de receptor en bereikt het membraan. Het complex heeft daar een interactie met een ander complex bestaande uit TAK1, TAB1 en TAB2 (figuur 1.8).

TAB2 en TAK1 worden gefosforyleerd en verplaatst met TRAF6 en TAB1 naar het cytosol. Daarna wordt TAK1 geactiveerd in het cytoplasma wat leidt tot activatie van de IKKs.

Inactief IKK bindt aan NF-kappa B in het cytoplasma. IKKs activatie leidt tot fosforylatie en degradatie van IkappaB en als gevolg daarvan vrijkoming van NF-kappaB. Door de vrijkoming van NF-kappaB kan de transcriptie van de cytokines plaatsvinden. Deze cytokines zorgen o.a. voor proliferatie en migratie van gladde spiercellen en fibroblasten.



Figuur 1.8 NF-kappaB activatie. [7]

§1.4 RNA interferentie (RNAi) [15]

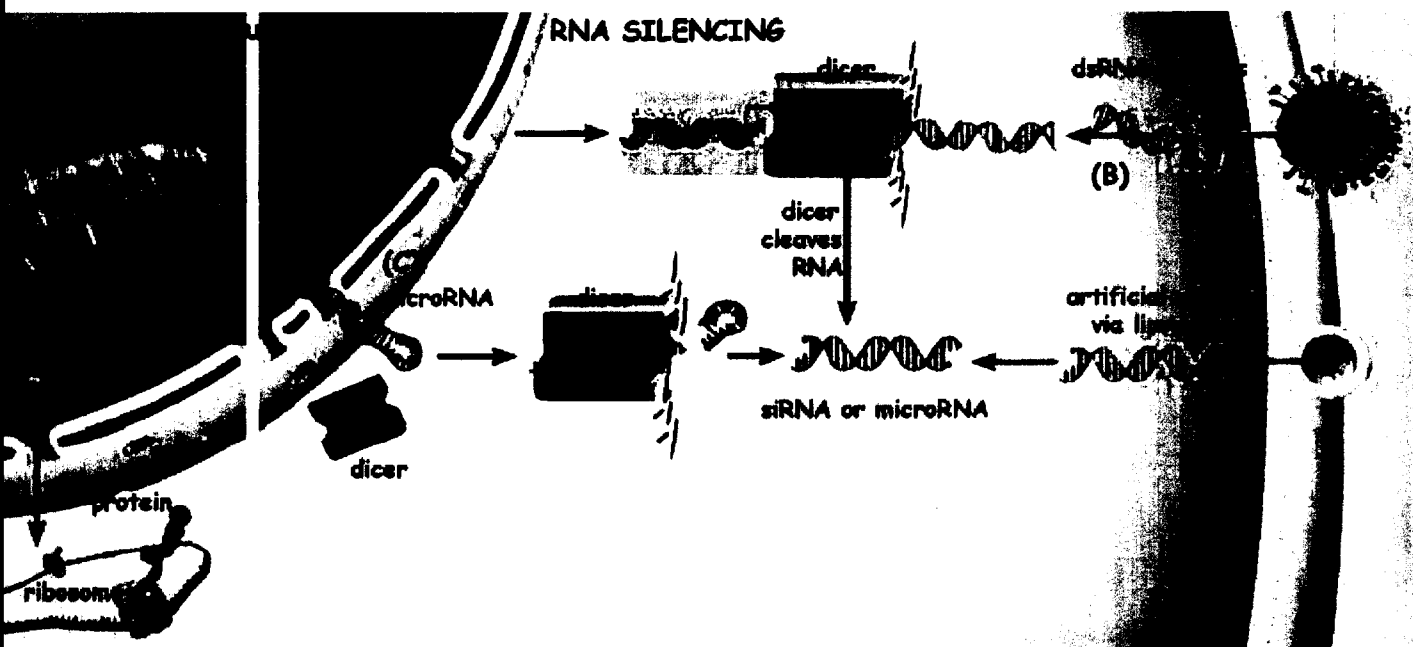
Tijdens dit onderzoek zal worden geprobeerd om de TLR4 expressie *in vitro* op mRNA niveau te verminderen d.m.v. RNA interferentie. RNA interferentie (RNAi) is een cellulair mechanisme om de expressie van genen en de replicatie van virussen te handhaven. Dit mechanisme wordt geregeld door dubbelstrengs small interfering RNA moleculen (siRNAs). RNAi technologie is een recent ontdekt, onderzoekers denken dat dit een belangrijk aspect is van het natuurlijke verdedigingsmechanisme van de cel tegen parasitaire virussen. De cel reageert op een vreemde vorm van siRNA in de cel door al het intracellulaire mRNA te vernietigen met dezelfde sequentie als het vreemde siRNA.

Door dit mechanisme is het mogelijk om doelgericht mRNA uit te schakelen voordat het eiwit is gevormd zonder het genomisch materiaal te wijzigen. Men hoopt om siRNAs uiteindelijk als medicijn te kunnen gebruiken, omdat RNAi zorgt voor een snellere en meer effectieve manier om genen uit te zetten.

§1.4.1 Mechanisme

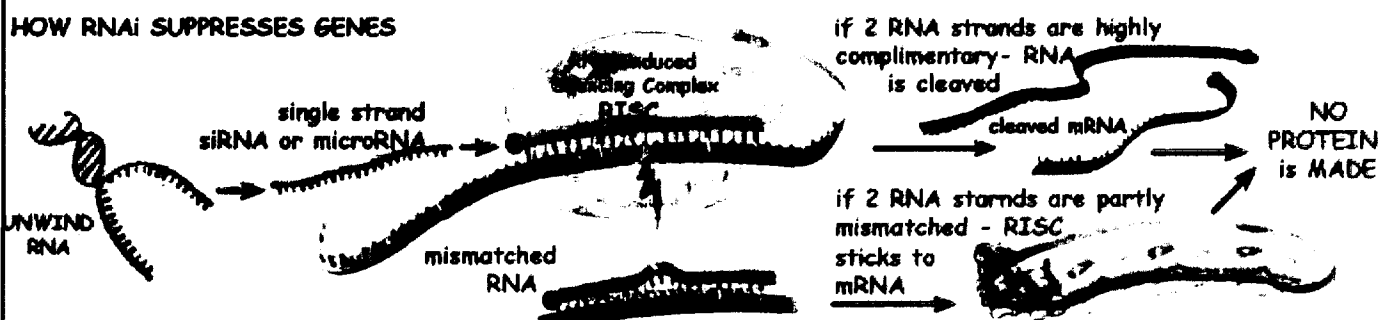
Cellen kunnen de expressie van individuele genen verzwakken door de transcriptie van het mRNA te verstoren. Dit wordt gedaan via een klein dsRNA. Een RNase genaamd DICER knipt short interfering RNAs (siRNA) uit de langere dsRNA geproduceerd door:

(A) zelf kopiërende gensequenties, (B) replicerende virussen, of (C) RNA sequenties bekend als microRNAs. Alle RNAs (A, B, & C) worden geknipt door DICER in kleine siRNA stukjes die de genexpressie kunnen verzwakken (figuur 1.9).



Figuur 1.9 siRNA vorming.[12]

De korte siRNAs (A, B, & C figuur 1.9) worden ontwonden tot enkelstrengs RNA's, welke met eiwitten een RISC (RNA-Induced Silencing Complex) complex vormen. Het RISC vangt mRNA moleculen welke complementair zijn aan de siRNA sequentie. Daarna wordt het mRNA in RNA fragmenten geknipt welke niet worden getransleerd en welke worden opgeruimd door nucleases. (figuur 1.10).



Figuur 1.10 siRNA mechanisme.[12]

Tijdens dit onderzoek zijn de korte stukjes RNAi (siRNA) gebruikt voor transfectie. De siRNA sequentie was complementair aan het TLR4 mRNA. Het mechanisme van deze siRNA's komt overeen met het bovenste mechanisme welke is beschreven in figuur 1.10.

Hoofdstuk 2: Materiaal en methode

Tijdens het onderzoek is op drie manieren geprobeerd om de TLR4 expressie op mRNA niveau te verminderen. Bij de eerste twee manieren werd gebruik gemaakt van een vector met een siTLR4 sequentie. De vectoren die werden gebruikt zijn pSuppressor-siTLR4 waarvan de sequentie werd ontworpen en gekloneerd in de vector in Utrecht en pHippy-siTLR4 waarvan de sequentie zelf werd ontworpen en gekloneerd in de vector. Bij de derde manier werden commerciële siRNA's besteld en in de cel getransfecteerd.

pSuppressor-siTLR4

§2.1 Celkweek

Voordat er een experiment *in vivo* kan worden uitgevoerd, is het belangrijk om eerst de proef *in vitro* uit te voeren. Het is gewenst om het experiment uit te voeren op dezelfde cellen die *in vivo* worden gebruikt bij het experiment, maar dit is niet altijd mogelijk. Wanneer dit het geval is, wordt er voor een alternatieve cel gekozen met overeenkomstige eigenschappen.

De targetcellen voor dit onderzoek waren gladde spiercellen en fibroblasten uit de vaatwand. Bij de experimenten zijn muis aorta gladde spiercellen (maSMC) en een muizen fibroblast cellijn (3T3 cellen) gebruikt.

De maSMC's moesten eerst geïsoleerd worden uit weefsel. Daarna werden de geïsoleerde cellen in kweekflessen in leven gehouden. Bij een lage passage werden er een aantal cellen ingevroren en bewaard in vloeibare stikstof. Dit is belangrijk omdat de ceileigenschappen kunnen veranderen bij een te hoge passage. Door vroeg in te vriezen kunnen er steeds weer cellen worden gebruikt uit een lage passage.

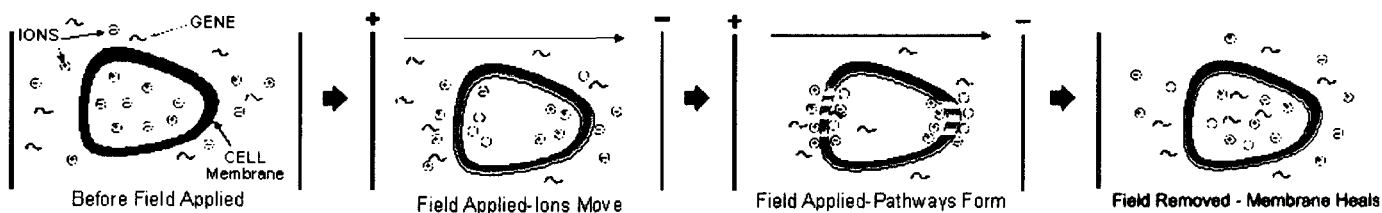
Het voordeel van de muizen fibroblast cellijn was dat de cellen ook bij hoge passagenummers gebruikt konden worden. De kweek staat beschreven in bijlage 11.

§2.2 Transfectie

pSuppressor-siTLR4 werd op twee methodes getransfecteerd. Dit staat beschreven in de onderstaande twee paragrafen.

§2.2.1 Transfectie cellen d.m.v. nucleofectie (Amaxa)

De cellen werden losgemaakt uit de fles en gecentrifugeerd. Aan het pellet werd nucleofectiemix en DNA toegevoegd. D.m.v. de Nucleofector werd er een stroomschokje gegeven waardoor het DNA in de celkern terecht kwam (figuur 2.1). Daarna werden de getransfecteerde cellen uitgeplaat. Zie bijlage 12.



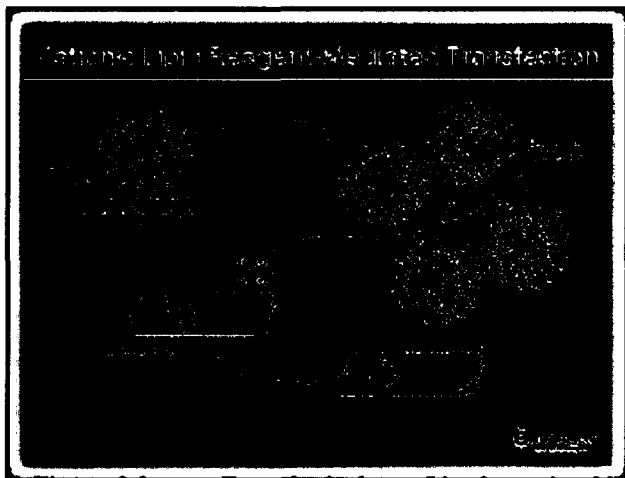
Figuur 2.1 Nucleofectie.[13]

§2.2.2 Transfectie cellen d.m.v. lipofectie (Lipofectamine 2000)

24 Uur voor transfectie werden de cellen uitgeplaat in een wellsplaat. Aan de cellen werd Lipofectamine 2000 en DNA of RNA toegevoegd. Lipofectamine 2000 is een positief geladen eiwit, de transfectie werkt als volgt (bijlage 13):

De positief geladen lipidedeeltjes reageren spontaan met de negatief geladen ruggengraat van DNA of RNA en vormt een complex. Deze complexen hebben een interactie met de negatief geladen celmembraan (zoals de fosfaten van de fosfolipiden) hierdoor wordt het macromolecuul afgeleverd in de cel. Hoe het transport naar de kern wordt geregeld is nog onduidelijk. Waarschijnlijk gebeurt dit door middel van celdeling.

Het voordeel van deze methode was dat de transfectie efficiëntie van plasmiden erg hoog was ($\pm 85\%$) in de muizen fibroblast cellijn.



Figuur 2.2 Transfectie d.m.v. Lipofectamine 2000. [14]

§2.3 Detectiemethoden voor reportergenen

Voordat pSuppressor-siTLR4 werd getransfecteerd in de cellen werd eerst nagegaan of de cellen goed te transfecteren waren met de methodes beschreven in §2.2. De plasmiden zoals pMaxGFP, pcDNA3.1*LacZ en pcDNA3.1*Luciferase bevatten deze reportergenen en werden gebruikt. Deze plasmiden brengen de eiwitten GFP, Luciferase en LacZ tot expressie. Deze eiwitten werden gedetecteerd m.b.v. onderstaande technieken.

§2.3.1 GFP: Fluorescentiemicroscopie

GFP staat voor Green Fluorescent Protein, dit eiwit wordt gedetecteerd m.b.v. de fluorescentiemicroscopie. De cellen waarin het pMaxGFP plasmide tot expressie is gekomen geven groen fluorescerend licht onder deze microscoop.

§2.3.2 Luciferase meting

Met behulp van de Luminometer wordt de emissie van licht kwantitatief gemeten wanneer luciferine aan het monster met Luciferase wordt toegevoegd. Luciferase wordt in de cel tot expressie gebracht en wordt niet uitgescheiden door de cel. Daarom is het van belang om de cellen te lyseren voordat de Luciferase wordt gemeten. Zie bijlage 14. Ook is het mogelijk om de Luciferase expressie te meten m.b.v. een Bioluminescentie camera. Dit is een licht gevoelige camera, welke ook in staat is om de emissie van licht kwantitatief te meten.

§2.3.3 LacZ: X-gal kleuring

De cellen worden gewassen en gefixeerd. Daarna wordt Fifo/X-gal aan de cellen toegevoegd. Na een aantal uren is waar te nemen onder de omkeermicroscop dat de getransfecteerde cellen die LacZ tot expressie brengen blauw gekleurd zijn.

Om RNA kwantitatief aan te tonen wordt de Real Time RT-PCR gebruikt. Het uitgangsmateriaal is cDNA. Daarom moet van het geïsoleerde RNA eerst cDNA worden gemaakt voordat de Real Time RT-PCR kan worden uitgevoerd.

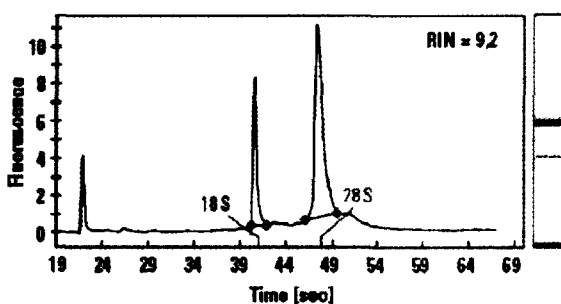
§2.4 RNA isolatie

Er zijn verschillende methodes om RNA te isoleren. Er kan volgens een 'traditionele' manier worden geïsoleerd (Chromczynski, bijlage 16), maar tegenwoordig zijn er ook vele kits op de markt die erg gebruiksvriendelijk zijn en waardoor de isolatie erg snel uitgevoerd kan worden (bijlage 15).

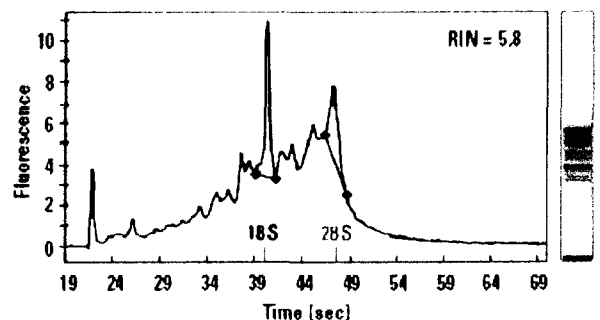
RNA wordt uit cellen geïsoleerd door de cellen te lyseren. RNA wordt uit weefsels geïsoleerd door de weefsels tot poeder te verpulveren m.b.v. vloeibare stikstof, hierna moeten de losgemaakte cellen alsnog gelyseerd worden. Door te wassen en neerslagreacties wordt het RNA gescheiden van het overige materiaal (bijvoorbeeld celresten, DNA, eiwitten enz.).

§2.4.1 Lab on a chip

De concentratie van het RNA kan worden bepaald d.m.v. de Nanodrop (zie §2.9). Ook is het mogelijk om de kwaliteit van het RNA te meten. Dit gebeurt m.b.v. de Lab on a Chip methode. Het RNA wordt op een minigel in een chip gebracht, een detector meet daarna de 18S en 28S pieken van het RNA. Op het linker plaatje van figuur 2.3 zijn de pieken weergegeven van kwalitatief goed RNA, op het rechter plaatje zijn de pieken weergegeven van kwalitatief slecht RNA. Door deze bepaling kan worden bepaald of het RNA nog intact is en of het zuiver is. Zie bijlage 17.



Intact total RNA



Partially degraded RNA

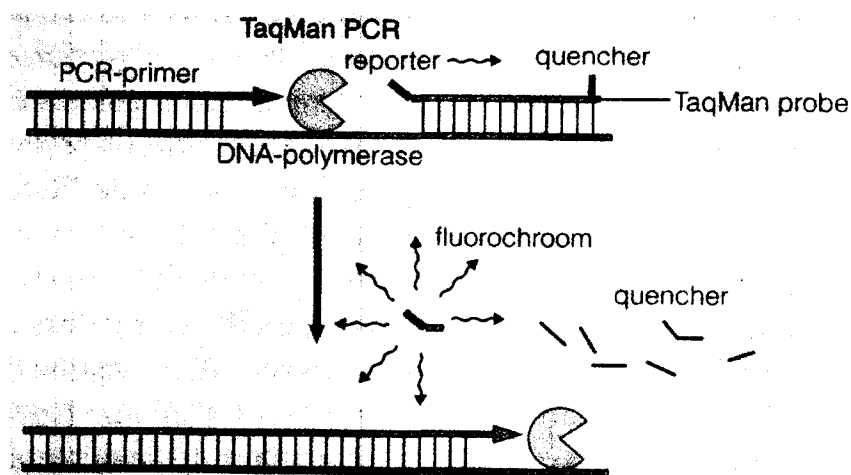
Figuur 2.3 Resultaten kwalitatieve RNA bepaling d.m.v. Lab on a Chip.[16]

§2.5 cDNA synthese

Na de RNA isolatie moet het RNA worden omgezet naar cDNA. Door het enzym Reverse Transcriptase, hexaprimers, buffer met een bepaalde zoutconcentratie en dNTP's aan het RNA toe te voegen wordt het RNA m.b.v. het Reverse Transcriptase omgezet naar cDNA. Dit cDNA wordt in de Real Time RT-PCR gebruikt. In bijlage 18 en 19 zijn de protocollen beschreven.

§2.6 Real Time RT-PCR [15]

Een Real Time RT-PCR met behulp van TagMan-probes wordt meestal uitgevoerd in een tweestapsprotocol met normale primers, maar in aanwezigheid van een speciaal gelabelde TaqMan-probe die gelijktijdig met de primers aan het gedenateerde template DNA hecht. Op deze TaqMan-probe bevindt zich aan het 5'-uiteinde een reporter-fluorochroom en een quencher aan het 3'-uiteinde. In het geval dat de reporter en de quencher nog via de oligonucleotide met elkaar verbonden zijn, zal de reporter zijn energie afstaan aan de quencher. Na scheiding door het DNA-polymerase, zal de reporter zijn energie afstaan en kan deze specifieke golflengte worden gemeten.



Figuur 2.3 Principe van de TaqMan PCR. [15]

Er bestaat een directe relatie tussen het PCR-cyclusnummer waarin een signaal voor het eerst aanwezig is (cycle threshold of Ct) en de hoeveelheid input targetmoleculen. De hoeveelheid input targetmoleculen wordt gecorrigeerd d.m.v. de Ct van een huishoudgen welke altijd in de cel aanwezig is. Het verschil in Ct wordt gebruikt als resultaat.

De methode is als volgt: Taqman polymerase en probes en primers worden aan elkaar toegevoegd en uitgedroogd in een 96-wells plaat. Daarna wordt het cDNA toegevoegd en wordt de plaat voorzien van dopjes zodat het monster niet kan verdampen in het Real Time RT-PCR apparaat. Nadat het apparaat 40 cycli heeft gedraaid kan worden afgelezen bij welke cycli het cDNA een reactie gaf met de probe/primer reactie.

pHippy-siTLR4

Voordat de zelf ontworpen siTLR4 oligo's in de pHippy vector werden gekloneerd, werd eerst getest of de vector een goede siRNA vector was. Door middel van lipofectie werden humane endotheliale retinoblast cellen (HER911) getransfecteerd met een vector met Luciferase en met de lege pHippy of de pHippy-siLuciferase vector. Na incubatie van 24 uur werd luciferine aan de cellen toegevoegd en werd de emissie van licht gemeten d.m.v. de Bioluminescentie camera. Toen bleek dat de vector werkzaam was werden de siTLR4 oligo's in pHippy gekloneerd (zie bijlage 22).

§2.7 Kloneren

Met behulp van het programma Clone Manager 5 versie 5.10 wordt inzicht verkregen in de mogelijke digestieplaatsen en kan er theoretisch gekloneerd worden. In het programma wordt het plasmide met het gewenste DNA en de vector geknipt. Hierna wordt gewenste DNA geligeerd in de vector. Indien mogelijk moeten de enzymen zo worden gekozen dat er geen zelfsluiters kunnen ontstaan en dat het gewenste stuk DNA alleen in de juiste oriëntatie kan ligeren (zodat het juiste eiwit wordt afgeschreven). Dit kan worden bereikt door te kiezen voor twee verschillende restrictie-enzymen, welke geen complementaire nucleotiden hebben na de digestie en welke "sticky ends" hebben na de digestie.

Het is belangrijk dat de kloon een resistentie gen bevat (bijvoorbeeld ampicilline) zodat het mogelijk is om de kloon te selecteren na de transformatie. De bacteriën die niet getransformeerd zijn kunnen niet groeien op een agarplaat met antibiotica (bij bijv. een ampicillinegen is dit ampicilline), terwijl de bacteriën die wel het plasmide hebben opgenomen wel kunnen groeien. Op deze manier is dus de kloon te isoleren, de kolonies die op deze plaat kunnen groeien, bevatten een antibiotica resistentiegen (en dus het plasmide). Zie bijlage 1.

§2.7.1 Digestie

De vector en het plasmide met het gewenste stuk DNA worden opengeknipt met restrictie enzymen. Na de digestie worden de DNA fragmenten op gel gebracht en wordt er geëlectroforeerd, op deze manier is te controleren wat de groottes zijn van de fragmenten. Wanneer dit bandje op de gel wordt gedetecteerd wordt het uitgesneden en het DNA wordt uit het DNA uit de gel gezuiverd. Zie ook bijlage 2.

§2.7.2 Zuiveren

Om het DNA fragment uit de gel te isoleren kan er een zuiveringskit worden gebruikt (ZymoClean). Aan gel met daarin het fragment wordt een buffer toegevoegd en vervolgens wordt de gel gesmolten. Deze oplossing wordt over een kolom gebracht, waarbij het DNA aan de kolom hecht. Vervolgens vinden er een aantal wasstappen plaats en uiteindelijk wordt het DNA geëluëerd (bijlage 3).

§2.7.3 Sappen

Door te sappen worden de fosfaatgroepen verwijderd van de opengeknipte vector, op deze manier wordt er voorkomen dat er zelfsluiters kunnen ontstaan. Het enzym alkaline fosfatase verwijdert de fosfaatgroepen wanneer er wordt geïncubeerd bij 37 °C. Na de incubatie wordt het enzym geïnactiveerd. Na deze stap kan er worden geligeerd. Zie bijlage 6

§2.7.4 Kineren

Wanneer het stuk DNA wat in de vector moet worden gekloneerd een PCR product of een oligo is moet er gekineerd worden. Hierdoor worden er fosfaatgroepen aan de uiteinden geplaatst, zodat het stuk in de opengeknijpte vector geligeerd kan worden. Zonder deze fosfaatgroepen kan er nooit geligeerd worden. Zie bijlage 7

§2.7.5 Ligatie

De opengeknijpte vector en het gewenste DNA uit het plasmide, PCR product of oligo worden in een vastgestelde verhouding samengevoegd en hierna wordt het fragment in de vector geligeerd (bijlage 6).

§2.7.6 Transformatie

Na de ligatie wordt het nieuw verkregen plasmide getransformeerd in een bacterie. Doordat de bacterie deelt worden de nieuwe plasmiden vermenigvuldigd. Voor de transformatie zijn competente cellen (DH5a E.coli's) nodig, deze cellen nemen gemakkelijk DNA op. Men voegt een kleine hoeveelheid DNA (nieuwe plasmide) aan deze cellen toe en na enige tijd hecht het DNA aan het buitenmembraan van de competente cel. Dan wordt met behulp van een hittesthock het DNA in de cel gebracht. Daarna wordt de bacterie met het nieuwe DNA opgegroeid in een voedingsrijk medium zonder antibiotica. Op deze manier kan de bacterie even herstellen van de behandeling en zich vermenigvuldigen. Binnen een uur wordt de cultuur uitgeplaat op een agarplaat met antibiotica. De volgende dag worden de kolonies aangeprikt die zijn gegroeid, dit zijn namelijk de kolonies die het DNA hebben opgenomen, omdat de plasmiden een resistentiegeen bevatten. Deze aangeprikte kolonies worden opgegroeid in een bepaalde hoeveelheid vloeibaar medium met antibiotica. Zie ook bijlage 8.

§2.8 Plasmide isolatie

Het plasmide wordt geïsoleerd met behulp van een Promega Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (miniprep). Het is verstandig om na de transformatie van een nieuwe kloon een miniprep uit te voeren. Voor deze miniprep is een kleine hoeveelheid cultuur nodig en deze handeling is snel uit te voeren. Op deze manier wordt er snel plasmide DNA verkregen. Nadat dit is verkregen is het belangrijk om te controleren of de juiste kloon is geproduceerd. Hoe dit wordt gecontroleerd wordt in §2.10 behandeld.

Wanneer blijkt dat de kloon juist is, is het mogelijk om de kloon in grote hoeveelheden op te groeien. Dit wordt gedaan met behulp van de Qiagen Plasmid Maxi, Mega of Giga kit. Het principe van deze drie isolatie methoden is hetzelfde. Nadat er een juiste cultuur is verkregen wordt de cultuur gecentrifugeerd. Het supernatant wordt verwijderd en het pellet wordt opgelost in resuspensiebuffer. Daarna worden de bacteriën gelyseerd d.m.v. lysisbuffer. Vervolgens worden eiwitten, genomisch DNA en detergentia geprecipiteerd d.m.v. een neutralisatiebuffer. De totale suspensie wordt over een filter gehaald zodat het precipitaat in de filter achterblijft. De oplossing wordt dan over een kolom gegoten, deze kolom is positief geladen zodat het negatief geladen DNA aan de kolom bindt. Nadat de oplossing geheel door de kolom is gelopen wordt de kolom gewassen met wasbuffer, dit zorgt ervoor dat de contaminaties en eventuele koolhydraten worden verwijderd. Met behulp van een elutiebuffer wordt het DNA weer van de kolom verwijderd. Nadat de elutiebuffer is opgevangen wordt isopropanol toegevoegd en wordt er gecentrifugeerd. Door deze laatste stap wordt er een pellet gevormd. Dit pellet wordt gewassen m.b.v. 70 % ethanol, dit zorgt ervoor dat de zouten in het pellet worden verwijderd en dat het isopropanol wordt vervangen door ethanol, zodat er in de volgende stap beter kan worden opgelost. De pellet met ethanol wordt nogmaals gecentrifugeerd. Na de centrifugatiestap wordt het supernatant verwijderd en de pellet wordt aan de lucht gedroogd. Nadat de pellet gedroogd is wordt het in een gewenst volume in een buffer opgelost. Zie bijlagen 9 en 10.

§2.9 Concentratiebepaling DNA

Nadat het plasmide DNA is geïsoleerd is men geïnteresseerd in de concentratie. Voorheen werd dit gemeten m.b.v. een spectrofotometer. Voordat er gemeten kon worden moest er een verdunning worden gemaakt. Tegenwoordig is de concentratie heel gemakkelijk te meten m.b.v. de Nanodrop. Er wordt 1 µl sample op het detectieoog gepipetteerd, daarna wordt de sample arm gesloten. Doordat de detectieoog en de sample arm iets uit elkaar worden getrokken functioneert het monster als een cuvet en wordt de concentratie bepaald (bijlage 5).

§2.10 Controle van de kloon

Voordat de kloon gebruikt kan worden in experimenten is het belangrijk dat er gecontroleerd wordt of de juiste kloon gemaakt is. Dit kan op een aantal manieren gecontroleerd worden. Een veel gebruikte methode is om de kloon te knippen met restrictie enzymen. Doordat deze enzymen op specifieke plaatsen knippen wordt het plasmide geknipt in een bepaald aantal fragmenten van een specifieke grootte. Nadat de enzymen het plasmide geknipt hebben worden de fragmenten op een agarosegel geplaatst en wordt er geëlectroforeerd.

Maar alleen de digestie is niet voldoende, op die manier wordt namelijk niet nagegaan of het juiste eiwit tot expressie komt. Om dit te controleren worden vaak cellen getransfected met het gemaakte construct en wordt er met behulp van een ELISA nagegaan of het juiste eiwit tot expressie is gekomen.

Een derde methode is sequencen. Hierbij wordt de exacte sequentie bepaald. Dit kan door gespecialiseerde bedrijven gedaan worden (zoals bijvoorbeeld BaseClear).

Nadat bleek dat de klonering was gelukt werden de 3T3 cellen (fibroblasten) getransfected met pHippy-siTLR4 d.m.v. lipofectie. Door RNA isolatie, cDNA synthese en uiteindelijk Real Time RT-PCR werd het experiment geanalyseerd.

Commerciële siTLR4

Bij Ambion zijn er twee siTLR4's besteld (RNA moleculen). Deze siTLR4's werden in de muizen fibroblasten cellijn getransfected d.m.v. lipofectie en nucleofectie. Door RNA isolatie, cDNA synthese en uiteindelijk Real Time RT-PCR werd het experiment geanalyseerd.

Hoofdstuk 3: Resultaten

Zoals beschreven in de inleiding wordt er binnen de groep Tissue Repair van het Gaubius Laboratorium TNO-PG te Leiden onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om restenose te remmen met behulp van gentherapie, waarbij de migratie en proliferatie van vaatwand cellen wordt geremd. Tijdens deze stage was het doel van mijn onderzoek:

- Het verminderen van TLR4 expressie op mRNA niveau in gladde spiercellen en fibroblasten met behulp van RNA interferentie.

Om dit doel te bereiken moesten de onderstaande criteria aan een aantal eisen voldoen:

- Cellen: De cellen moesten afkomstig zijn uit de vaatwand van de muis. Het voordeel hiervan is dat op deze manier het effect *in vivo* op deze cellen kan worden voorspeld. De cellen moesten ook TLR4 in voldoende mate tot expressie brengen. Ook was het erg belangrijk dat de cellen stabiel bleven, d.w.z. dat er geen verandering optraden bij hogere passages in bijvoorbeeld het fenotype van de cel.
- Transfectie: Het was erg belangrijk dat er een hoge transfectie-efficiëntie werd bereikt, zodat het effect van siTLR4 waar te nemen was. Ook van belang was dat de transfectie redelijk onschadelijk voor de cellen was, zo bleven er voldoende cellen in leven. Daarnaast kon beschadiging van de cellen weer een immuunrespons opwekken (= meer TLR4) waardoor het effect van siTLR4 niet meer waarneembaar zou zijn.
- Werkende siRNA sequenties: De sequenties moesten zeer specifiek zijn voor TLR4 en moesten ook werkzaam zijn.
- Vector specifiek voor siRNA: Van belang was dat de vector siRNA's kon afschrijven.

Uiteindelijk is er op drie manieren geprobeerd om met siRNA de TLR4 expressie te verminderen.

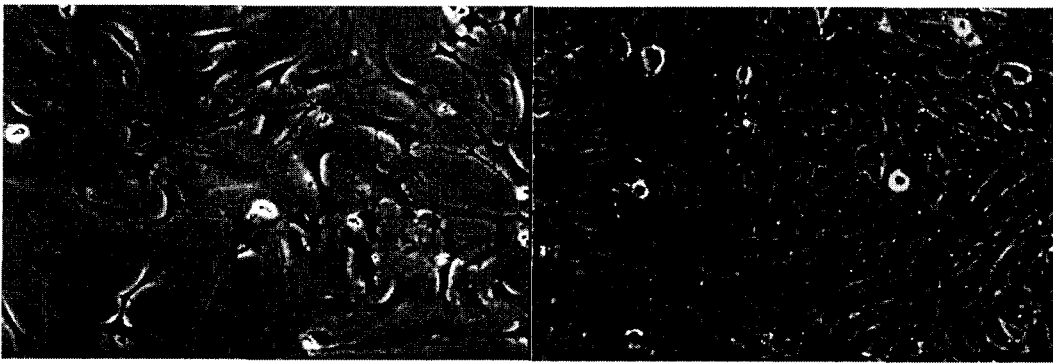
- *pSuppressor-siTLR4*: De vector bevat een U6 promotor, het afgeschreven RNA bevat een hairpin, na vouwing ontstaat er siRNA. De siTLR4 sequenties zijn ontworpen in Utrecht en daar in de vector gekloneerd. In totaal zijn er vier vectoren gebruikt, waarvan twee specifiek tegen humaan TLR4 en twee specifiek tegen muis TLR4 (mTLR4).
- *pHippy-siTLR4*: De vector bevat tegenovergestelde humane H1 en U6 promoten. Het afgeschreven RNA is dubbelstrengs siRNA. Er zijn zelf drie siTLR4 sequenties ontworpen specifiek tegen TLR4 en in deze vector gekloneerd.
- *Commerciële siTLR4*: Er waren twee siTLR4's besteld (RNA moleculen) specifiek voor de muis, volgens de leverancier (Ambion) had elke individuele siTLR4 de kans van 80% dat het werkzaam was.

§3.1 pSuppressor-siTLR4

§3.1.1 Muizen aorta gladde spiercellen (maSMC)

maSMC's zijn afkomstig uit de aorta van de muis, ze brengen TLR4 tot expressie. De maSMC's werden getransfecteerd met pSuppressor-siTLR4, dit is een specifieke vector om siRNA's tot expressie te brengen. De vier pSuppressor-siTLR4 plasmiden werden getransfecteerd in maSMC d.m.v. nucleofectie, als controle werden de maSMC's alleen met nucleofectie behandeld.

Door de transfectie was er veel celdood. Bovendien bleken de maSMC's niet stabiel te zijn, ze veranderden van fenotype na een aantal passages (zie figuur 3.1) en er was verschil in fenotype en groeisnelheid tussen de batches. Ook was het niet mogelijk om de resultaten te reproduceren.



Figuur 3.1 *maSMC bij verschillende passages.*

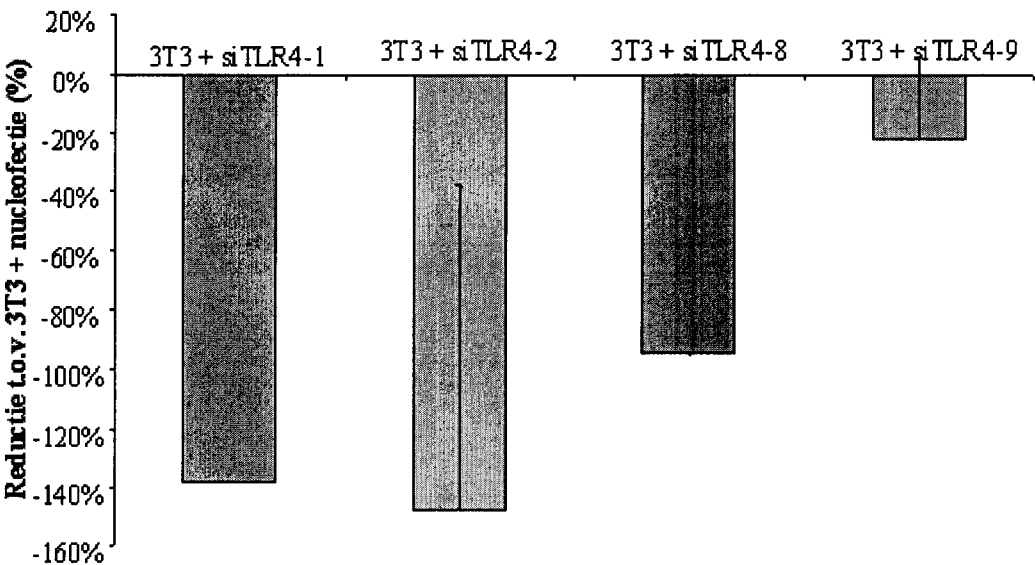
§3.1.2 3T3 cellen

Er werd besloten om de experimenten te herhalen op een cellijn, om zo te voorkomen dat de cellen veranderden bij hogere passages. Er werd een muizen fibroblasten cellijn gebruikt: 3T3 cellen. Deze cellen zijn niet afkomstig van de vaatwand van de muis, maar brengen wel TLR4 tot expressie. Bovendien bleken deze cellen wel goed transfecteerbaar te zijn.

§3.1.2.1 Transfectie d.m.v. nucleofectie

De 3T3 cellen werden getransfecteerd met de vier pSuppressor-siTLR4 plasmiden, waarvan pSuppressor-siTLR4-1 en -2 specifiek waren voor de mens en -8 en -9 specifiek voor de muis. De transfectiemethode was nucleofectie en als controle werden de 3T3's alleen met nucleofectie behandeld. Na 24 uur werd het RNA geïsoleerd, cDNA gemaakt en een Real Time RT-PCR uitgevoerd. De TLR4 expressie werd vergeleken t.o.v. de expressie van het huishoudgen HPRT. Het experiment bleek geen invloed te hebben op de expressie van het huishoudgen. In totaal is het experiment drie keer herhaald. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3.2.

Reductie mTLR4 expressie in 3T3 na transfectie met pSuppressor-siTLR4 d.m.v. nucleofectie



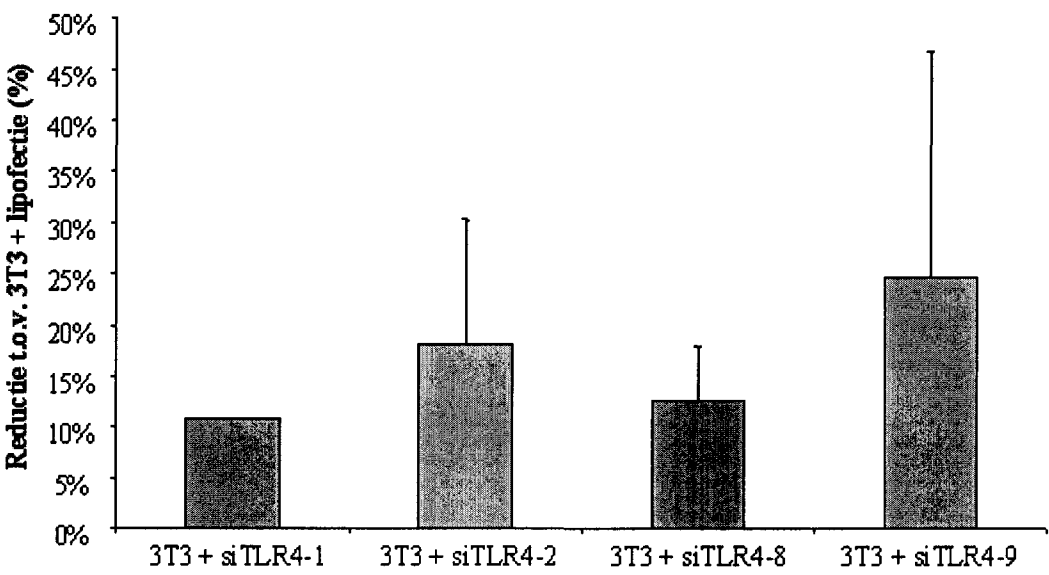
Figuur 3.2 Resultaten transfectie 3T3 met pSuppressor-siTLR4 d.m.v. nucleofectie.

De conclusie uit dit experiment is dat geen enkel construct zorgde voor reductie van TLR4 t.o.v. fibroblasten + nucleofectie. De negatieve reductie geeft aan dat er juist toename is van TLR4 expressie. Ook waren de resultaten erg wisselend, hierdoor is de standaardafwijking erg groot. Bij pSuppressor-siTLR4-1 is geen foutenbalk weergegeven omdat het experiment maar één keer gelukt is bij dit construct, de overige keren waren de cellen dood gegaan.

§3.1.2.2 Transfectie d.m.v. lipofectie

Na een experiment met een plasmide met een reportergen bleek de transfectie-efficiëntie met lipofectie hoger te zijn dan met nucleofectie (Amaxa). Daarom is het experiment herhaald met lipofectie. Dit experiment is vier keer herhaald (behalve construct 1, slechts één keer was het mogelijk om resultaten te behalen). Het huishoudgen bleef gedurende het experiment stabiel en werd dus niet beïnvloed. In figuur 3.3 zijn de resultaten weergegeven.

Reductie mTLR4 expressie in 3T3 na transfectie met pSuppressor-siTLR4 d.m.v. lipofectie



Figuur 3.3 Resultaten transfectie 3T3 met pSuppressor-siTLR4 d.m.v. lipofectie.

De resultaten waren erg wisselend, daarom was niet te concluderen of een van de constructen zorgde voor vermindering van TLR4 expressie. Toch leek het erop dat pSuppressor-siTLR4-1 en -8 een beetje werkzaam waren, maar de verlaging was te laag om met zekerheid te stellen dat dit het geval was. De oorzaken hiervan konden zijn dat de sequenties of de vector niet werkzaam waren. Daarom werd besloten om zelf siTLR4 te ontwerpen en in een vector te kloneren waarvan bewezen is dat het siRNA's tot expressie kan brengen.

§3.2 pHippy-siTLR4

Met behulp van ontwerp strategieën specifiek voor siRNA werden er sequenties ontworpen tegen TLR4 (zie bijlage 4). Deze sequenties werden besteld als oligonucleotiden. Voordat de oligo's in de pHippy vector werd gekloneerd, werd eerst getest of de vector geschikt was. Als test werd pHippy-siLuc gebruikt, deze zorgt voor vermindering van expressie van Luciferase. Er is voor dit construct gekozen omdat de reductie van expressie met een lichtgevoelige camera is waar te nemen.

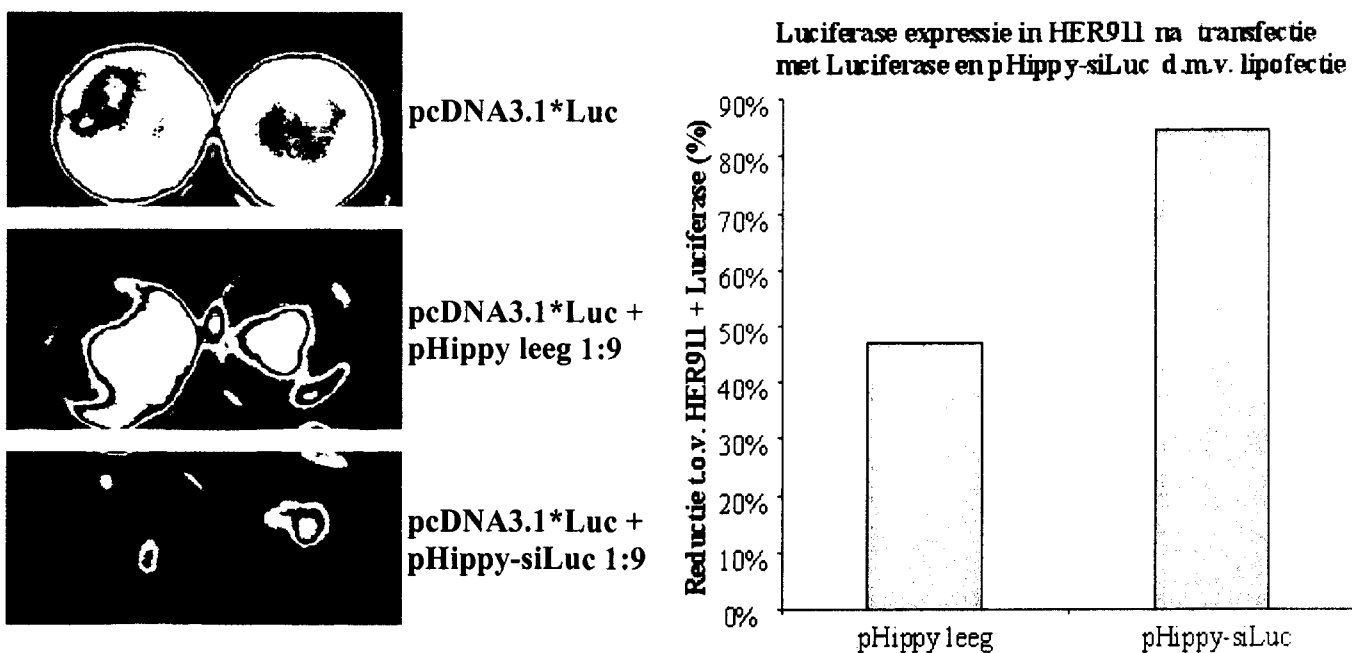
§3.2.1 pHippy-siLuc

§3.2.1.1 In vitro

pHippy-siLuc is verkregen uit het laboratorium van Randall T. Moon (University of Washington, USA). Dit construct is ontworpen voor de expressie van si-Luciferase.

Om deze vector te testen werden humane endotheliale retinoblast cellen (HER911) getransfected met pcDNA3.1*Luciferase en pHippy-siLuc d.m.v. lipofectie. Er werd voor deze cellijn gekozen omdat deze cellen makkelijk te transfecteren en eenvoudig te kweken waren. Deze cellen waren niet bruikbaar voor de experimenten met siTLR4, omdat deze cellen geen TLR4 tot expressie brengen en omdat het een humane cellijn is. De incubatietijd was 24 uur, daarna werd er luciferine aan de wells toegevoegd (Luciferase + luciferine geeft emissie van licht). De emissie van licht werd gemeten met een Bioluminescentie camera, met deze camera was het ook mogelijk ook de kwantitatieve waardes te bepalen.

Na een concentratiereeks bleek dat de verhouding Luciferase : siLuciferase optimaal was bij de verhouding 1:9. Als controle werd de lege vector gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3.4.



Figuur 3.4 Luciferase expressie na transfectie van HER911 met Luciferase en siLuciferase d.m.v. lipofectie.

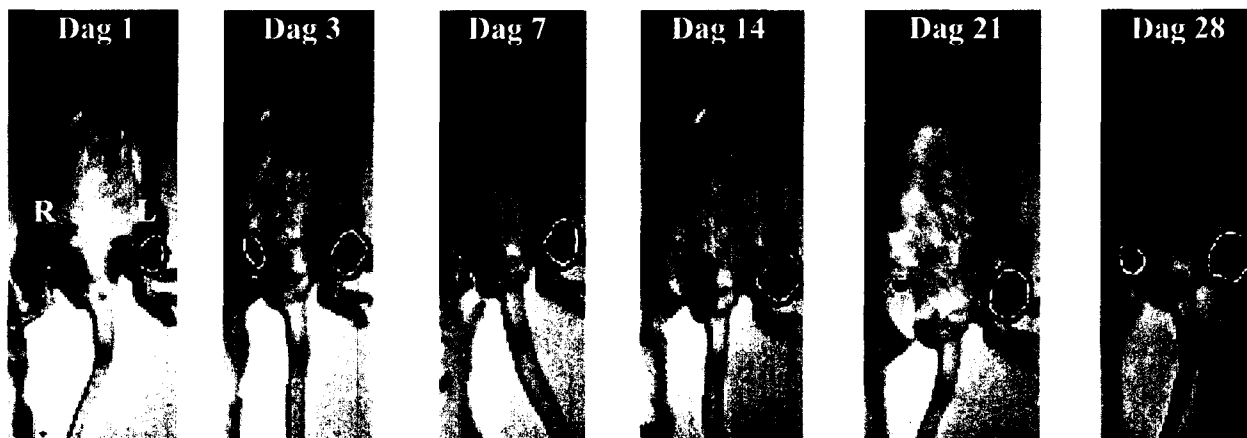
Uit de grafiek is af te lezen dat de lege vector al voor reductie van Luciferase expressie (ongeveer 50%) zorgt t.o.v. HER911's + Luciferase. De oorzaak hiervan kan zijn dat er competentie was tussen de vectoren bij een cotransfectie, waardoor de transcriptiefactoren verdeeld moesten worden. HER911's + Luciferase + siLuciferase zorgt voor een reductie van bijna 90%, het construct was dus werkzaam. Ook in 3T3 cellen bleek de vector werkzaam te zijn, al was de emissie van licht wel minder.

§3.2.1.1 *In vivo*

Er werd ook getest of de vector *in vivo* werkzaam was en hoe lang siLuciferase tot expressie kwam. Daartoe werd de kuitspier van de muis getransfecteerd d.m.v. electroporatie, het principe komt overeen met nucleofectie. In totaal zijn zes muizen behandeld.

In de rechterpoot werd pcDNA3.1*Luciferase + pHippy-siLuciferase ingespoten.
In de linkerpoot werd pcDNA3.1*Luciferase + pHippy leeg ingespoten.

De muizen werden voor 28 dagen gevolgd en tijdens elke meting werd er luciferine in de kuitspier ingespoten. In figuur 3.5 zijn de resultaten van één representatieve muis weergegeven.



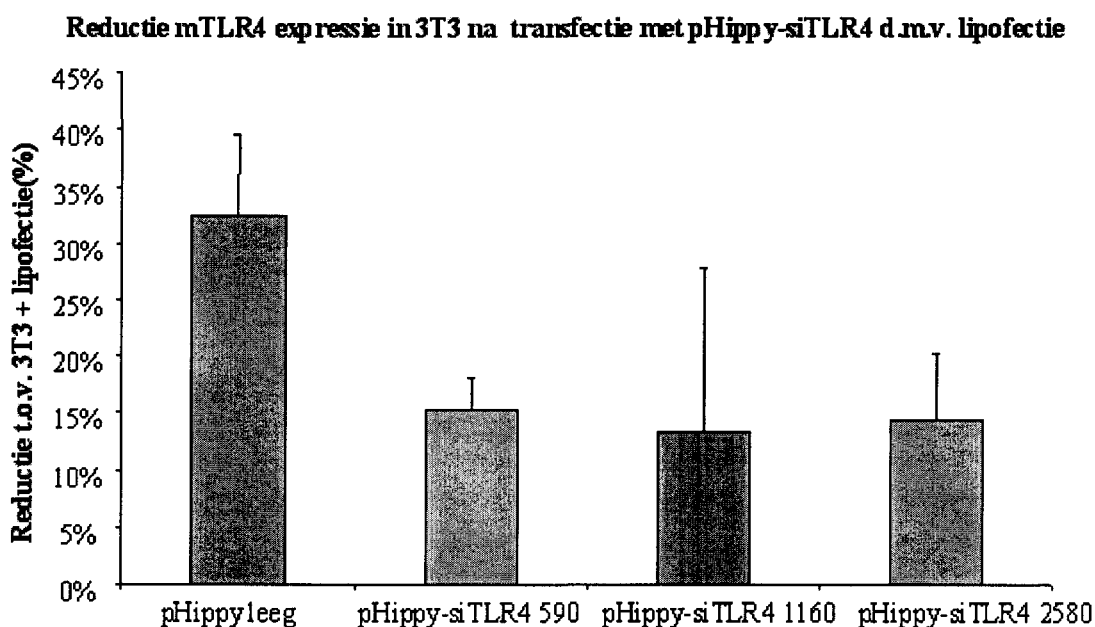
Figuur 3.5 *Luciferase expressie na transfectie van kuitspieren muis met Luciferase en siLuciferase (R) en Luciferase en controle vector (L) d.m.v. electroporatie.*

De sterkte van de emissie van licht wordt weergegeven door kleur en grootte van de lichtvlek. Bij alle tijdspunten is er reductie waar te nemen door siLuciferase t.o.v. de lege vector.

De werking van het plasmid *in vitro* is na 24 uur aangetoond en *in vivo* is de werking in een tijdsreeks tot 28 dagen gevolgd en aangetoond. Omdat de vector siRNA tot expressie bracht, zijn de zelf ontworpen siTLR4 sequenties in de vector gekloneerd.

§3.2.2 pHippy-siTLR4

De oligo's werden in de lege pHippy vector gekloneerd, daarna werden ze getransformeerd in *E. coli* DH5 α . De kolonies werden opgegroeid en het plasmid DNA werd geïsoleerd. Dit DNA werd gesequenced en de kolonies met de juiste sequentie (in de goede oriëntatie) werden in grote hoeveelheden opgegroeid (zie bijlage 22). Het plasmid DNA werd geïsoleerd en getransfecteerd in 3T3 cellen. Na 24 uur werd het RNA geïsoleerd, cDNA gemaakt en een Real Time RT-PCR uitgevoerd. Het huishoudgen bleef gedurende het experiment stabiel en werd dus niet beïnvloed. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3.6.



Figuur 3.6 Resultaten transfectie 3T3 met pHippy-siTLR4 d.m.v. lipofectie. De getallen 590, 1160 en 2580 duiden op de plaats op het TLR4 gen waar siTLR4 aangrijpt.

Uit figuur 3.6 blijkt dat de lege vector voor meer reductie van TLR4 zorgde (ongeveer 30%) dan de pHippy-siTLR4's (ongeveer 15%). Daaruit was te concluderen dat alle zelf ontworpen oligo's niet werkzaam waren. Daarom is besloten om commerciële siTLR4 (siRNA) te bestellen.

§3.3 Commerciële siTLR4

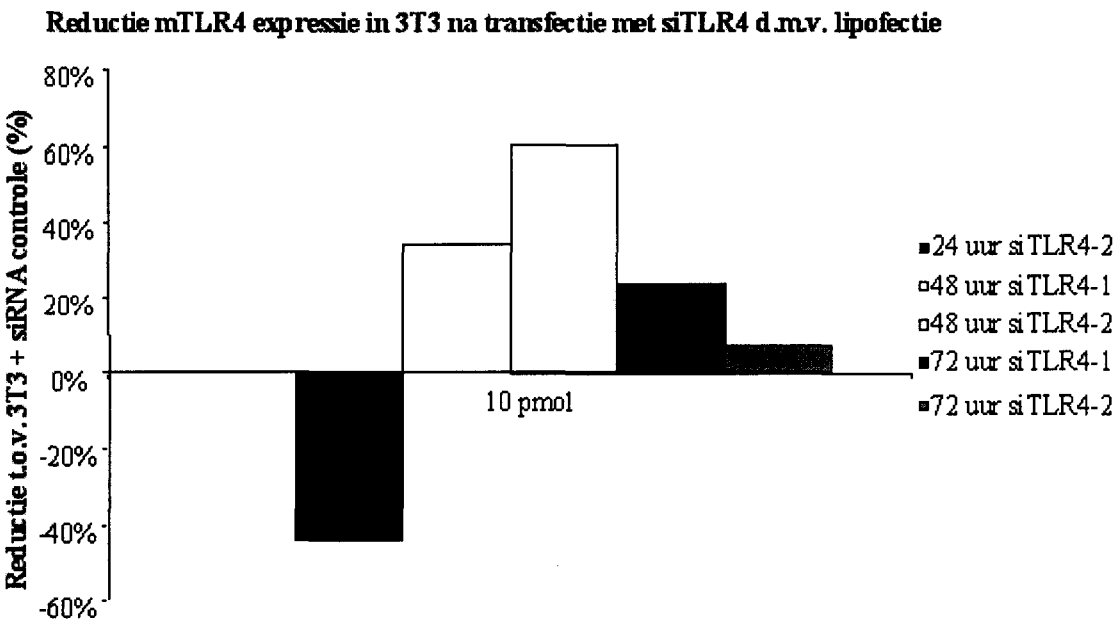
Er zijn twee siTLR4's (RNA) besteld bij Ambion, waarvan volgens de leverancier elke siTLR4 de kans van 80 % had dat ze voor reductie zorgden van TLR4. Ook is er een siRNA controle besteld, dit is een niet werkend siRNA construct. Op deze manier is na te gaan wat het effect van siRNA's is. De sequenties zijn weergegeven in bijlage 20.

Het is niet mogelijk om met een reporter siRNA na te gaan welke transfectie-methode de hoogste efficiëntie heeft. Daarom is besloten om beide transfectie methoden te gebruiken.

Met een concentratiereeks werd bepaald bij welke of de siTLR4's werkzaam waren. 3T3 cellen (1 cm²) werden getransfecteerd d.m.v. lipofectie met 100, 33, 10, 3 en 1 pmol. Na 24 uur werd het RNA geïsoleerd, cDNA gemaakt en een Real Time RT-PCR uitgevoerd. De siTLR4's waren beide werkzaam, de optimale hoeveelheid siTLR4 bleek 10 pmol te zijn.

§3.3.1 Tijdsreeks siTLR4, transfectie d.m.v. lipofectie

Na 24 uur was er al reductie waar te nemen, maar om te bepalen na welke incubatietijd er een optimale reductie waar te nemen was, werd er een tijdsreeks uitgevoerd. Omdat het ook nog mogelijk was dat bij andere tijdspunten een andere hoeveelheid siTLR4 optimaal werkte is de tijdsreeks met drie verschillende hoeveelheden uitgevoerd: 100, 10 en 1 pmol. 3T3 cellen (1 cm²) werden getransfecteerd d.m.v. lipofectie (zie bijlage 21). Na 24, 48 uur en 72 uur werd het RNA geïsoleerd, cDNA gemaakt en een Real Time RT-PCR uitgevoerd. Het huishoudgen (GAPDH) bleef gedurende het experiment stabiel en werd dus niet beïnvloed. Uiteindelijk bleek toch 10 pmol de optimale hoeveelheid te zijn. De resultaten hiervan zijn weergegeven in figuur 3.7.

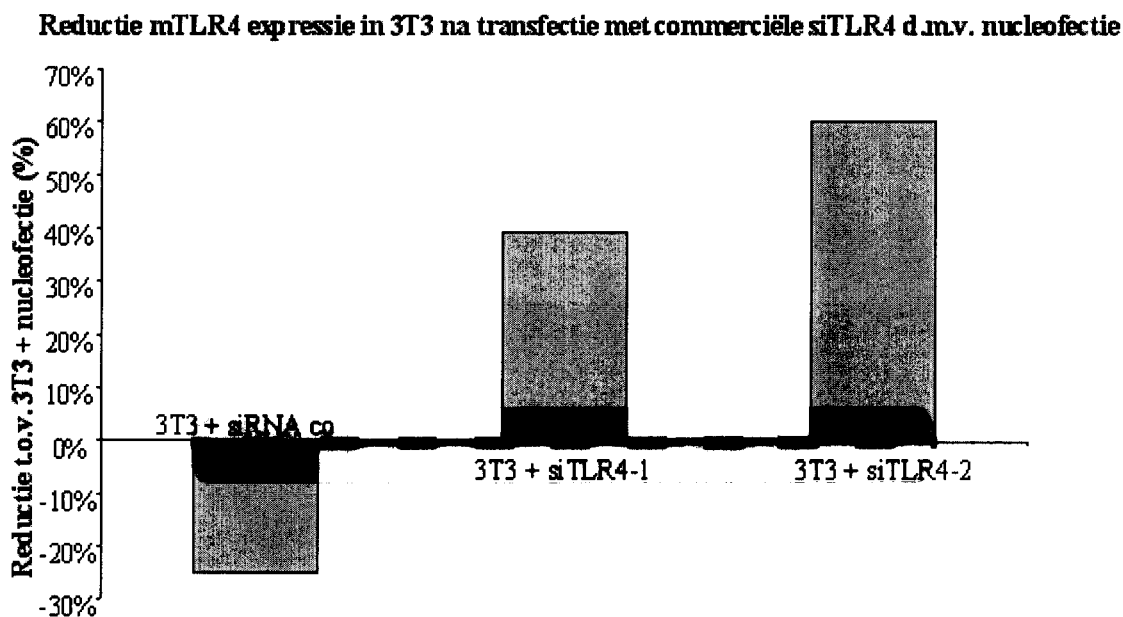


Figuur 3.7 Resultaten tijdsreeks: transfectie 3T3 met commerciële siTLR4 d.m.v. lipofectie.

De reductie van TLR4 expressie is berekend t.o.v. 3T3 + siRNA controle. Na incubatie van 48 uur met 10 pmol siTLR4 bleek voor beide siTLR4's het optimum te liggen voor reductie van TLR4 expressie. siTLR4-1 zorgt voor een reductie van ongeveer 40% en siTLR4-2 zorgt voor een reductie van ongeveer 60% t.o.v. de TLR4 expressie van 3T3 + siRNA controle.

§3.3.2 Transfectie d.m.v. nucleofectie

Nucleofectie is de transfectiemethode die het meeste lijkt op electroporatie *in vivo*. $1,25 \cdot 10^6$ 3T3 cellen ($\pm 10 \text{ cm}^2$) werden getransfecteerd met 100 pmol ($10 \cdot 10 \text{ pmol}$, doordat well 10x zo groot is) siTLR4/siRNA controle, na 48 uur werd het RNA geïsoleerd, cDNA gemaakt en een Real Time RT-PCR uitgevoerd. Het huishoudgen (GAPDH) werd niet beïnvloed. De resultaten zijn weergegeven in figuur 3.8.



Figuur 3.8 Resultaten transfectie 3T3 met commerciële siTLR4 d.m.v. nucleofectie.

De reductie is weergegeven t.o.v. 3T3 + nucleofectie zonder siRNA. Het blijkt dat de controle voor toename van TLR4 expressie van ongeveer 25% zorgt t.o.v. 3T3 + nucleofectie. De siTLR4's zijn allebei werkzaam, siTLR4-1 zorgt voor een reductie van ongeveer 40% en siTLR4-2 zorgt voor een reductie van ongeveer 60%. Wanneer de resultaten vergeleken zouden worden t.o.v. 3T3 + siRNA controle, is de reductie door siTLR4-1 en -2 65% en 85%

Hoofdstuk 4: Discussie en conclusie

Tijdens deze stage was het doel van mijn onderzoek:

- Het verminderen van TLR4 expressie op mRNA niveau in gladde spiercellen en fibroblasten met behulp van RNA interferentie.

Als eerste werd geprobeerd om de TLR4 expressie te verminderen in gladde spiercellen (maSMC). Dit zijn muizen gladde spiercellen uit de vaatwand en brengen TLR4 tot expressie. Helaas bleken deze cellen moeilijk transfecteerbaar te zijn en bleken de cellen te veranderen bij hogere passages. Daarom werd overgestapt naar een ander celtype. Om te voorkomen dat de cellen weer veranderden bij hogere passages werd gekozen voor een cellijn: muizen fibroblasten (3T3 cellen). Deze cellen zijn niet afkomstig uit de vaatwand, maar brengen wel TLR4 tot expressie. Bovendien bleken de transfecties te lukken op deze cellen. Daarom zijn de experimenten op deze cellen uitgevoerd.

Tijdens het onderzoek is op drie manieren geprobeerd om de TLR4 expressie op mRNA niveau te verminderen. Bij de eerste twee manieren werd gebruik gemaakt van een vector met een siTLR4 sequentie. De vectoren die werden gebruikt zijn pSuppressor-siTLR4 waarvan de sequentie werd ontworpen en gekloneerd in de vector in Utrecht en pHippy-siTLR4 waarvan de sequentie zelf werd ontworpen en gekloneerd in de vector. Bij de derde manier werden commerciële siRNA's besteld en in de cel getransfecteerd.

Als eerste werden de 3T3 cellen getransfecteerd met pSuppressor-siTLR4 d.m.v. nucleofectie. Uit de resultaten bleek dat geen enkel construct zorgde voor reductie van TLR4 expressie op mRNA niveau t.o.v. de cellen die alleen met nucleofectie werden behandeld. Er was alleen maar negatieve reductie (extra expressie) van TLR4 waar te nemen. Door transfectie met plasmide met een reporter gen werd bepaald dat de transfectie efficiëntie door lipofectie hoger was dan door nucleofectie. Daarom werd het experiment herhaald met lipofectie. Uit de resultaten bleek dat pSuppressor-siTLR4-1 en -8 een beetje werkzaam waren, maar de verlaging was te laag om met zekerheid te stellen dat dit het geval was. De oorzaken hiervan konden zijn dat de sequenties of de vector niet werkzaam waren. Daarom werd besloten om zelf siTLR4 te ontwerpen en in een vector te kloneren waarvan bewezen is dat het siRNA's tot expressie kan brengen (pHippy).

Voordat de zelf ontworpen oligo's in de pHippy vector werden gekloneerd werd eerst de vector getest. HER911's werden getransfecteerd met pcDNA3.1*Luciferase en pHippy leeg/pHippy-siLuciferase. Er werd voor deze cellijn gekozen omdat deze cellen makkelijk te transfecteren en eenvoudig te kweken waren. Deze cellen waren niet bruikbaar voor de experimenten met siTLR4, omdat deze cellen geen TLR4 tot expressie brachten en omdat het humane cellen waren. Na meting met de Bioluminescentie camera bleek dat de lege vector al voor reductie van Luciferase expressie (ongeveer 50%) zorgde t.o.v. HER911's + Luciferase. De oorzaak hiervan kon zijn dat er competentie optrad tussen de vectoren door de cotransfectie, de transcriptiefactoren moeten dan verdeeld worden. HER911's + Luciferase + siLuciferase zorgde voor een reductie van bijna 90% t.o.v. HER911's + Luciferase, het construct was dus werkzaam. Ook in 3T3 cellen bleek de vector werkzaam te zijn, al was de emissie van licht wel minder.

Ook *in vivo* is de werking van de pHippy vector getest. De kuitspier van de muis werd geëlectroporeerd met pcDNA3.1*Luciferase en pHippy leeg/pHippy-siLuciferase. Er werd een tijdsreeks uitgevoerd tot 28 dagen. De transfectie efficiëntie *in vivo* kan per poot van de muis en tussen de muizen onderling verschillen. Maar omdat bij zes muizen reductie was waargenomen is er geconcludeerd dat siLuciferase werkzaam was. Op deze manier werd aangetoond dat de vector *in vivo* ook werkzaam was en werd bewezen dat de expressie langdurig was.

Nadat de zelf ontworpen siTLR4 oligo's in de lege pHippy vector waren gekloneerd werden 3T3 cellen hiermee getransfecteerd d.m.v. lipofectie. Helaas bleek de lege vector voor meer reductie van TLR4 te zorgen i.p.v. de cellen met de pHippy-siTLR4's t.o.v. de cellen behandeld met lipofectie. De zelf ontworpen siTLR4's waren dus niet werkzaam.

Uiteindelijk werden er commerciële siTLR4's besteld. Omdat het niet mogelijk was om met een reporter siRNA na te gaan welke transfectie methode de hoogste efficiëntie gaf werden beide methodes gebruikt. Transfectie met siRNA's zorgde voor toename van expressie van TLR4 (siRNA controle geeft een toename van TLR4 expressie). Wanneer de reductie t.o.v. 3T3 + siRNA controle werden vergeleken bleek dat er meer reductie was door transfectie met nucleofectie dan met lipofectie. De reductie d.m.v. lipofectie was voor siTLR4-1 en -2 40 % en 60 % en de reductie d.m.v. nucleofectie 65 % en 85 %. Wel bleek de reductie d.m.v. siRNA afhankelijk te zijn van de concentratie en incubatietijd.

Het onderzoeksdoel was bereikt, TLR4 expressie op mRNA niveau in fibroblasten werd gereduceerd wanneer commerciële siTLR4's werden gebruikt.

Vervolgonderzoek

Bij levering van de commerciële siTLR4's zijn de sequenties opgegeven. Deze sequenties moeten als oligo's worden besteld en in de pHippy vector worden gekloneerd. Het voordeel van het gebruik van plasmiden t.o.v. siRNA's is dat de expressie veel langer is omdat bijvoorbeeld de cel zelf de siRNA's afschrijft en het is zelf mogelijk om de plasmiden in hoge hoeveelheden zelf op te kweken waardoor er niet steeds nieuwe commerciële siTLR4's besteld hoeven worden. Een nadeel is dat de transfectie iets lastiger is, de plasmiden zijn veel groter en moeten in de kern terecht komen voordat de siRNA's worden afgeschreven.

Na klonering moet de vector worden getest *in vitro* d.m.v. een Real Time RT-PCR. Er is dan alleen nog maar bepaald wat de reductie door pHippy met commerciële siTLR4 op mRNA niveau is. Voordat de experimenten *in vivo* worden voortgezet is het belangrijk om eerst een western blot of immunofluorescentie analyse uit te voeren, zodat ook de reductie op eiwitniveau bepaald is.

Uiteindelijk kan pHippy met commerciële siTLR4 *in vivo* getransfecteerd worden in de bloedvatwand van transgene muizen (hoog cholesterol). Op deze manier kan getest worden of TLR4 reductie op eiwitniveau zorgt voor minder restenose. Een van de problemen die hierbij nog opgelost moet worden is de lage transfectie efficiëntie van de bloedvatwand.

Literatuur

1. http://www.e-gezondheid.be/guide/article_3757_890.htm
2. <http://www.hartstichting.nl/Uploads/Brochures>
3. <http://www.consumed.nl/nieuw/database/indicaties/indicatie.php3?id=4196>
4. Ross, R., *Atherosclerosis – An Inflammatory Disease*, The New England Journal of Medicine 1999; 340-2: 115-123
5. http://www.takeda.ch/german/cardio/a_blo_rasystem4.htm
6. http://www.tyih.gov.tr/makale_kard_ekim.html
7. <http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/pictures/TRLsignaling.html>
8. http://www.med.umich.edu/1libr/aha/aha_bypass_art.htm
9. <http://www.heartcenteronline.com>
10. Vink, A. et al, *In Vivo Evidence for a Role of Toll-Like Receptor 4 in the Development of Intimal Lesions*, Circulation 2002; 106: 1985-1990
11. Xu, Q, *Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002; 22: 1547-1559
12. http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/how_siRNA_works.htm#2
13. <http://www.cytopulse.com/electroporation.html>
14. <http://invitrogen.com/Content/Online%20Seminars/TRANSFECTION/transfection03.html>
15. Pelt-Verkuil, E. van et al, *Moleculaire Diagnostiek*, Bohn Stafleu Van Loghum, Houten/Diegem 2001: 123-124
16. <http://www.chem.agilent.com/temp/radC6031/00048551.pdf>
17. Vink, A et al, *Functional role for toll-like receptors in atherosclerosis and arterial remodelling*, Current Opinion in Lipidology 2004; 15:515–521
18. Vink, A. et al, *In Vivo Evidence for a Role of Toll-Like Receptor 4 in the Development of Intimal Lesions*, Circulation 2002;106:1985-1990
19. Hollestelle, S.C.G. et al, *Toll-Like Receptor 4 Is Involved in Outward Arterial Remodeling*, Circulation 2004;109:393-398

Bijlagen

Bijlage 1: LB medium en agarplaten

LB medium

Materiaal:

- Caseïne hydrolysaat
- Yeast extract
- NaCl
- MilliQ
- HCl of NaOH

Methode:

1. Weeg af:
 - 10 g/l caseïne hydrolysaat
 - 5 g/l yeast extract
 - 5 g/l NaCl
2. Vul aan met MilliQ.
3. Stel de pH in op 7.
4. Autoclaveer het LB medium.

Agarplaten

Materiaal:

- LB medium
- Select Agar
- Antibiotica
- Gietplaten

Methode:

1. Voeg 15 g/l Select Agar toe aan het LB medium.
2. Autoclaveer het medium + agar.
3. Koel af tot 42 °C in waterbad.
4. Voeg antibiotica toe: bijvoorbeeld 100 µg/ml Ampicilline of 50 µg/ml Zeocine.
5. Giet de platen en laat het stollen in de 37 °C stoof (deksel een beetje open).
6. Bewaar de platen in de koude kamer.

Bijlage 2: Plasmide DNA digestie d.m.v. restrictie enzymen en 1,2 % agarosegel maken

Plasmide DNA digestie d.m.v. restrictie enzymen

Materiaal:

- Plasmide DNA
- Restrictie enzymen
- 10 x reactie buffer (per enzym afhankelijk)
- Geautoclaveerd MilliQ water

Methode:

1. Voeg toe aan een epje: - 1 µl plasmide DNA (maximaal 0,5 µg)
- 1 µl 10 x reactie buffer
- 1 µl restrictie enzym (per restrictie enzym)
2. Vul aan met geautoclaveerd MilliQ tot 10 µl.
3. Incubeer 1 uur bij 37 of 55 °C (afhankelijk van het restrictie enzym).

In het geval van meerdere restrictie-enzymen

- Gelijke buffer en gelijke temperatuur → geen aanpassing
- Gelijke buffer, verschillende temperatuur → alles bij elkaar voegen, eerst een uur op laagste temperatuur, daarna een uur op hogere temperatuur. Wanneer dit wordt omgekeerd is het mogelijk dat er een restrictie enzym niet meer werkzaam is.
- Verschillende buffers, gelijke/verschillende temperatuur → Eerst eerste reactiebuffer + enzym incuberen, daarna over Zymoclean kolom halen en tweede reactiebuffer + enzym incuberen.

1,2 % Agarosegel

Materiaal:

- Agarose
- 0,5 x TAE buffer
- Ethidiumbromide

Methode:

1. Plaats de houder voor de gel in de desbetreffende bak en plaats een kam in de houder.
2. Weeg 1,2 gram agarose af in erlenmeyer.
3. Voeg 100 ml 0,5 x TAE toe.
4. Plaats de erlenmeyer in de magnetron en wacht tot alle agarose is opgelost en de oplossing kookt.
5. Koel de oplossing af onder de kraan en voeg 2 druppeltjes ethidiumbromide (handschoenen! is nl. carcinogeen, hiermee laat je zien dat je ook bewust bent van veilig werken) toe wanneer de erlenmeyer is aan te raken het de hand.
6. Giet de oplossing in de houder, prik de luchtbellen weg.
7. Laat de gel stollen.

Gelelectroforese

1. Plaats de gel in de electroforesebak.
2. Voeg zoveel 0,5 x TAE buffer toe dat de gel onder de buffer ligt.
3. Voeg aan de monsters (gedigesteerd plasmide DNA) loading buffer toe.
4. Pippetteer de ladder en de monsters in de slotjes.
5. Electroforeer 45 minuten bij 150 Volt.
6. Maak een foto onder UV licht en snij eventueel de gewenste bandjes uit.

Bijlage 3: Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit

Materiaal:

- Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit
- Uitgesneden DNA fragment uit agarosegel.

Methode:

- Zie Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit protocol
(<http://www.zymoresearch.com/protocols/dna/d4001instruct2.pdf>)

Bijlage 4: Ontwerpen van de siTLR4 oligo's

Voor het ontwerpen van de si-oligo's moeten de sequenties aan een aantal eisen voldoen:

- De meest efficiënte vermindering van expressie wordt bereikt door siRNA duplexen bestaande uit 21 nt sense en 21 nt antisense strengen, op zo'n manier gepaard dat er 2 nt voor een 3' overhang zorgen (AAN19TT patroon).
(<http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>)
 - Het moet een N4AN6TN2HN5WN2 patroon bevatten (totaal 23 nt en het 3'-eind is TT).
 - %GC:30-70%
 - Sluit meer dan achtereenvolgende vier A's, T's of G's uit.
 - Sluit meer dan zeven opeenvolgende GC's uit.
 - Zorg ervoor dat alle nucleotiden ongeveer in gelijke aantallen aanwezig zijn (+/- 10%).
 - Zorg voor TT aan het 3'-eind.
 - Sluit d.m.v. blasten polymorfismen en exon/exon uiteinden uit.
- (Reynolds, A. et al, *Rational siRNA design for RNA interference*, Nature Biotechnology 2004 Mar;22(3):326-30).

Er zijn twee TLR4 sequenties gebruikt uit de genbank van NCBI.

- BC029856. *Mus musculus toll...*[gi:20988278]

Alternatief:

- AF110133. *Mus musculus toll...*[gi:4761196]

Uiteindelijk zijn er 4 si-sequenties geselecteerd welke 100 baseparen of meer downstream van de ATG startcodon en 100 baseparen of meer upstream van het stopcodon. Er zijn twee oligo's ontworpen met het AAN19TT patroon en twee met het N4AN6TN2HN5WN2 patroon.

De oligo's zijn ontworpen met een AAAA overhang aan het 5'-einde, zodat het direct in pHippy kan worden gekloneerd wanneer deze wordt geknipt met BsmBI.

AAN19TT:

- I.(590) Sense(5'-3'): AAAAGTTTCTCTGGACTAACAAG
 aSense(3'-5'): CAAAGAGACCTGATTGTTCAAAA
 aSense(5'-3'): AAAACTTGTTAGTCCAGAGAAAC
- IV.(1543) Sense(5'-3'): AAAATTCTCAGCGTTCTTATCCC
 aSense(3'-5'): AAGAGTCGCAAGAATAGGGAAAA
 aSense(5'-3'): AAAAGGGATAAGAACGCTGAGAA

N4AN6TN2HN5WN2

- VII.(1160) Sense(5'-3'): AAAACAATGTCTCTGGCAGGTGT
 aSense(3'-5'): GTTACAGAGACCGTCCACAAAAA
 aSense(5'-3'): AAAAACACCTGCCAGAGACATTG

VIII.(2580) Sense(5'-3'): AAAAGTATCGCCTTCTTAGCAGA
aSense(3'-5'): CATAGCGGAAGAATCGTCTAAAA
aSense(5'-3'): AAAATCTGCTAAGAAGGCGATAC

BC029856 Mus musculus toll-like receptor 4, mRNA
Cod.sequence:234-2741 in zwart, 5'- en 3'-UTR in rood and, **si in blauw**
GTTCTACTCTTCAGTCTTCTAACTTCCCTCCTGCGACGGGGCAGATCGATTCTAGAACAAAACCAAAGT
GCGAATGCTAAGGTTGGCACTCTCACTTCCTCTTTGAATATAGTACTTGCAGAGGGGCACCCACTGGGAG
GGAAGAGGCAGGTGTCCCAGGGACTCTGCGCTGCCACCAGTTACAGATCGTCATGTTCTCTCATGGCCTC
CACTGGTTGCAGAAAATGCCAGGATGATGCCCTCCCTGGCTCCTGGCTAGGACTCTGATCATGGCACTGTT
CTTCTCCTGCCCTGACACCGGAAGCTTGAATCCCTGCATAGAGGTAGTTCCTAATATTACCTACCAATGC
ATGGATCAGAAACTCAGCAAAGTCCCTGATGACATTCCTTCTCAACCAAGAACATAGATCTGAGCTTCA
ACCCCTTGAAGATCTTAAAAAGCTATAGCTTCTCCAATTTTTTCAGAACTTCAGTGGCTGGATTTATCCAG
GTGTGAAATTGAAACAATTGAAGACAAGGCATGGCATGGCTTACACCACCTCTCAAACCTTGATACTGACA
GGAAACCCTATCCAGAGTTTTTCCCCAGGAA**GTTTCTCTGGACTAACAAG**TTTAGAGAATCTGGTGGCTG
TGGAGACAAAATTGGCCTCTCTAGAAAGCTTCCCTATTGGACAGCTTATAACCTTAAAGAAAACCTCAATGT
GGCTCACAAATTTTATACATTCCCTGTAAGTTACCTGCATATTTTTCCAATCTGACGAACCTAGTACATGTG
GATCTTTCTTATAACTATATTCAAACCTATTACTGTCAATGACTTACAGTTTCTACGTGAAAAATCCACAAG
TCAATCTCTCTTTAGACATATCTTTGAACCAATTGACTTCATTCAAGACCAAGCCTTTCAGGGAATTAA
GCTCCATGAAGTACTCTAAGAGGTAATTTTAATAGCTCAAATATAATGAAAACCTGCCTTCAAACCTG
GCTGGTTTACACGTCCATCGGTTGATCTTGGGAGAAATTTAAAGATGAAAGGAATCTGGAAATTTTTGAAC
CCTCTATCATGGAAGGACTATGTGATGTGACCATTGATGAGTTCAGGTTAACACATACAAATGATTTTTTC
AGATGATATTGTTAAGTTCCATTGCTTGGCGAATGTTTCTG**CAATGTCTCTGGCAGGTGT**ATCTATAAAA
TATCTAGAAGATGTTCCATAACATTTCAAATGGCAATCCTTATCAATCATTAGATGTCAACTTAAGCAGT
TTCCAACCTCTGGATCTACCCTTTCTTAAAAGTTTGACTTTAACTATGAACAAAGGGTCTATCAGTTTAA
AAAAGTGGCCCTGCCAAGTCTCAGCTATCTAGATCTTAGTAGAAATGCACTGAGCTTTAGTGTTGCTGT
TCTTATTCTGATTTGGGAACAAACAGCCTGAGACACTTAGACCTCAGCTTCAATGGTGCCATCATTATGA
GTGCCAATTTTCATGGGTCTAGAAGAGCTGCAGCACCTGGATTTTCAGCACTCTACTTTAAAAAGGGTCAC
AGAA**TTCTCAGCGTTCTTATCCCT**TGAAAAGCTACTTTACCTTGACATCTCTTATACTAACACCAAAATT
GACTTCGATGGTATATTTCTTGGCTTGACCAGTCTCAACACATTAATAATGGCTGGCAATTCTTTCAAAG
ACAACACCCCTTTCAAATGTCTTTGCAAACACAACAACTTGACATTCTGGATCTTTCTAAATGTCAATT
GGAACAAATATCTTGGGGGGTATTTGACACCCCTCCATAGACTTCAATTATTAAATATGAGTCACAACAAT
CTATTGTTTTTGGATTATCCCATTTATAACCAGCTGTATTCCCTCAGCACTCTTGATTGCAGTTTCAATC
GCATAGAGACATCTAAAGGAATACTGCAACATTTTCCAAAGAGTCTAGCCTTCTTCAATCTTACTAATAA
TTCTGTTGCTTGTATATGTGAACATCAGAAATTCCTGCAGTGGGTCAAGGACCAGAAGCAGTTCTTGGTG
AATGTTGAACAAATGACATGTGCAACACCTGTAGAGATGAATACCTCCTTAGTGTTGGATTTAATAATT
CTACCTGTTATATGTACAAGACAATCATCAGTGTGTGATGATCAGTGTGATTGTGGTATCCACTGTAGC
ATTTCTGATATACCATTCTATTTTACCTGATACTTATTGCTGGCTGTAAAAAGTACAGCAGAGGAGAA
AGCATCTATGATGCATTTGTGATCTACTCGAGTCAGAAATGAGGACTGGGTGAGAAATGAGCTAGTAAAGA
ATTTAGAAGAAGGAGTGCCCCGCTTTACCTCTGCCTTCACTACAGAGACTTTATTCTGGTGTAGCCAT
TGCTGCCAACATCATCCAGGAAGGCTTCCACAAGAGCCGGAAGGTTATTGTGGTAGTGTCTAGACACTTT
ATTCAGAGCCGTTGGTGTATCTTTGAATATGAGATTGCTCAAACATGGCAGTTTCTGAGCAGCCGCTCTG
GCATCATCTTCATTGTCCTTGAGAAGGTTGAGAAGTCCCTGCTGAGGCAGCAGGTGGAATT**GTATCGCCT**
TCTTAGCAGAAACACCTACCTGGAATGGGAGGACAATCCTCTGGGGAGGCACATCTTCTGGAGAAGACTT
AAAAAGGCCCTATTGGATGGAAGGCTCGAATCCTGAGCAAACAGCAGAGGAAGAACAAGAAACGGCAA
CTTGGACCTGAGGAGAACAAAACCTCTGGGGCCTAAACCCAGTCTGTTTGCAATTAATAAATGCTACAGCT
CACCTGGGGCTCTGCTATGGACCGAGAGCCCATGGAACACATGGCTGCTAAGCTATAGCATGGACCTTAC
CGGGCAGAAGGAAGTAGCACTGATGCCTTCCTTTCCAGGGATATGAATTACCTAACTCAGGAAAAAGAAAC
ATAATCAAGAATCTTTACCTTTAAACTGAAGGAGAAGAGGCTAAGGCCTAGTGAGAACAGAAAGGAGAAC
CAGTCTTCACTGGGCCTTTTGAATACAAGCCATGTCATGTTCTGTGTTTCAGTTGCTTTAGAAGAGTATT
GATAGTTTCAACTGAAGTAAAGGTTTCTTACTTTCCCTTTTTTCTACTGAATGCAATATTAAATAGCTC
TTTTTGAGAGGTCCTCATTTCCAAAAA

3



VII

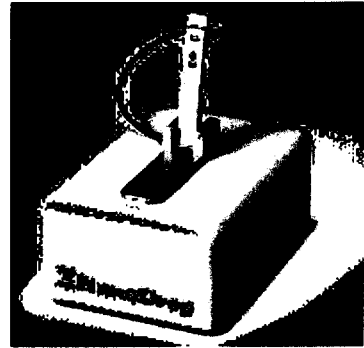
Bijlage 5: DNA/RNA concentratie meten m.b.v. de Nanodrop

Materiaal:

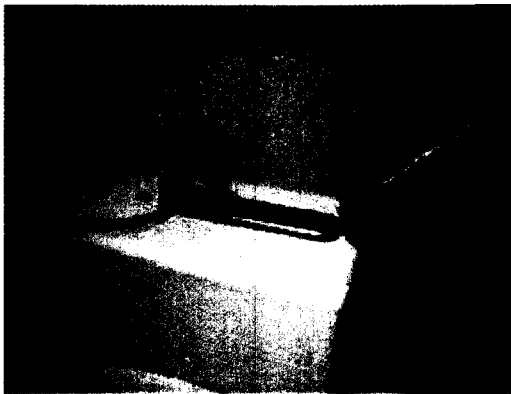
- DNA/RNA monster
- Blanco
- Water
- 70 % ethanol

Methode:

1. Maak het detectie-oog en sampling arm schoon met water en daarna met 70 % ethanol.
2. Pipetteer 1 μ l water op het detectie-oog en sluit de meter.

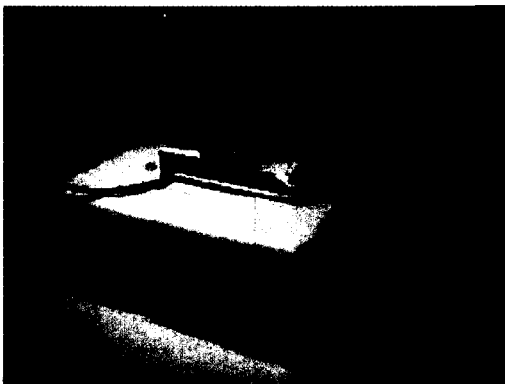


Bron: <http://www.nanodrop.com>



Bron: <http://www.nanodrop.com>

3. Start de software en druk op de knop voor Nucleid Acid Measurement. Er wordt direct een meting verricht en het apparaat wordt automatisch op nul gesteld.
4. Maak het detectie-oog en de sampling arm schoon met een tissue.



Bron: <http://www.nanodrop.com>

5. Pipetteer 1 μ l blanco op het detectie-oog en sluit de meter. Maak een keuze uit DNA of RNA meting en druk op de knop "blank".
6. Maak het detectie-oog en de sampling arm schoon met een tissue, nadat de meting is verricht.
7. Pipetteer 1 μ l monster op het detectie-oog en sluit de meter. Druk op de knop "measure".
8. Maak het detectie-oog en de sampling arm schoon met een tissue, nadat de meting is verricht.
9. Herhaal stappen 7 en 8 indien er meerdere monsters gemeten moeten worden.

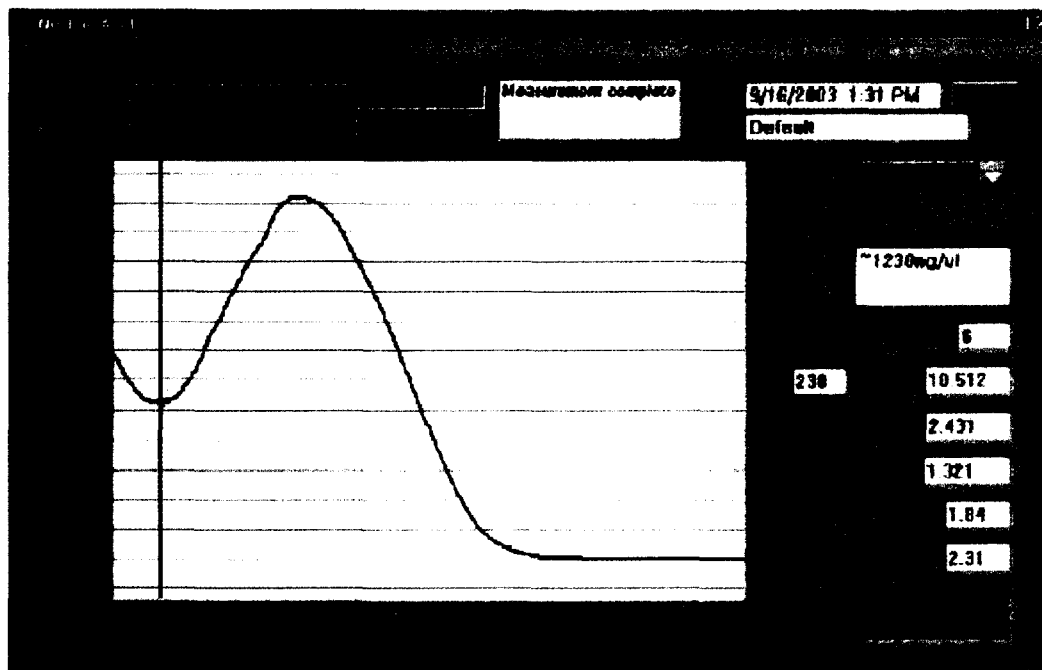
10. Maak het detectie-oog en sampling arm schoon met water en daarna met 70 % ethanol.

De voordelen van de Nanodrop t.o.v. de klassieke spectrofotometer zijn:

- Er is een kleine hoeveelheid sample nodig (slechts 1 µl).
- Hoog absorptie vermogen: 50 keer hoger dan dat van traditionele spectrofotometer.
- Voor de meeste monsters is geen verdunning nodig.
- Spectrum van 220-750 nm.
- Er is slechts 10 seconden nodig om te meten.
- Er zijn geen cuvetten of capillairen nodig.
- Veel kleiner dan een traditionele spectrofotometer.

<http://www.nanodrop.com/nd-1000-overview.html>

Nadat de meting is verricht is er een grafiek te zien van de Extinctie bij de verschillende golflengtes. D.m.v. deze grafiek is na te gaan of het DNA/RNA zuiver is. Bij DNA moet het de curve overeenkomen met figuur B. De 260/280 en 260/230 ratio's van DNA behoren rond de 1,8 en 1,8-2,2 te liggen. Van RNA liggen deze ratio's rond de 2,0 en 1,8-2,2.



Figuur B Extinctiecurve van DNA bij een nanodrop meting.

Bron: <http://www.nanodrop.com>

De gevoeligheid van de meting is weergegeven in figuur C.

Detection Limit (ng/ul)	Approximate Upper Limit (ng/ul)	Typical Reproducibility (minimum 5 replicates) (SD= ng/ul; CV= %)
1.5	3700 (dsDNA) 3000 (RNA) 2400 (ssDNA)	sample range 1.5-100 ng/ul: ±1.5 ng/ul sample range >100 ng/ul: ± 2%

Figuur C Concentratie gevoeligheid van de Nanodrop.

Bijlage 6: Sappen en ligeren

Sappen

Materiaal:

- Roche Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) kit

Methode:

1. Voeg aan het gedigesteerde plasmide DNA 0,9 µl per 7 µl digestiemengsel dephosphoylation Buffer (10 x).
2. En voeg 1 µl (1 U) per 7 µl digestiemengsel Phosphatase alkaline, shrimp toe.
3. Incubeer 10 minuten bij 37 °C. (In het geval van blunt ends 60 minuten)
4. Inactiveer SAP door 15 minuten te incuberen bij 65 °C.

Ligeren

Materiaal:

- Roche Rapid DNA Ligation Kit

Methode:

1. Pipetteer de onderstaande componenten in een epje.

Component	Amount
DNA fragment	0.5 µl (150 ng)
Ligation buffer (2x)	10 µl
T4 DNA Ligase	1 µl (5 U)

<http://www.roche-applied-science.com>

Incubeer 5 minuten bij kamertemperatuur (transformatie is hierna gelijk mogelijk).

Bijlage 7: Kineren en hybridiseren van oligo's

Materiaal:

- Roche T4-PNK (T4-Polynucleotide Kinase)
- Roche T4-PNK Buffer (10 x)
- Sense en antisense oligo
- BSA (10 mg/ml)
- rATP (100 mM)

Methode:

Kineren

1. Pipetteer de onderstaande componenten in een epje.

Component	Hoeveelheid
T4-PNK	2 µl
T4-PNK Buffer (10 x)	10 µl
Sense oligo (200 µM)	2 µl
Antisense oligo (200 µM)	2 µl
BSA (10 mg/ml)	0,25 µl
rATP (100 mM)	0,5 µl
Water	33,25 µl

2. Incubeer 1 uur bij 37 °C.

Inactiveren T4-PNK en hybridiseren

1. Breng een bekerglas met water en kookkralen aan de kook op een warmteplaatje.
2. Zet de heater uit zodra het water kookt.
3. Doe de epjes met de gekineerde oligo's in een piepschuim drijvertje en laat ze in het bekerglas drijven tot het water is afgekoeld tot 45 °C.
Zet vervolgens de epjes op ijs (ligatie is hierna mogelijk).

Bijlage 8: Transformatie plasmide DNA in *E. coli* DH5α competente cellen

Materiaal:

- Plasmide DNA
- Competente cellen
- SOC medium
- Agarplaten met gewenste antibiotica

Methode:

1. Ontdooi 20 µl competente cellen op ijs.
2. Voeg aan de competente cellen 1 µl DNA toe.
3. Incubeer 30 minuten op ijs.
4. Geef het mengsel een hitteshock door het 30-45 seconden in een 42 °C waterbad te plaatsen.
5. Plaats het mengsel direct op ijs en laat het 2 minuten staan.
6. Voeg 180 µl SOC medium toe.
7. Plaats het epje 45 minuten in de schudincubator (37 °C).
8. Plaat het mengsel uit op agarplaten met antibioticum (bijvoorbeeld 10 % en 90 %).

Bijlage 9: Miniprep volgens Promega Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System

Materiaal:

- Promega Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System

Methode:

1. Zie Promega Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System protocol.
<http://www.promega.com/tbs/tb225/tb225.pdf>

Bijlage 10: Maxi/Gigaprep volgens QIAGEN® Plasmid Purification

Materiaal:

- QIAGEN Plasmid Maxi en Giga Kit
- QIAfilter™ Giga Kit

Methode:

1. Zie QIAGEN® Plasmid Purification Handbook
(http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/PlasmidDNAPurification/PLS_Plasmid/1025302_HB_PLS_082003WW.pdf)

Bijlage 11: Celweek 3T3, HER911 en SMC's

Materiaal:

- Medium 3T3/HER911: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep
- Medium SMC: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1% Glutamine, 1% NEAA (Non Essential Amino Acids)
- PBS/EDTA
- Trypsine
- 1% Gelatine

Methode:

Opstarten cellen

- Ontdooi de ampullen met cellen in een 37 °C waterbad totdat er nog een klontje ijs waarneembaar is.
- Neem de cellen op in 5 ml medium met serum en draai 10 minuten af bij 1200 rpm.
- Supernatant afzuigen en pellet oplossen in gewenste medium en overbrengen naar kweekfles (bij SMC's overbrengen naar een gelatine gecoate kweekfles).
- Kweekfles in 37 °C stoof met CO₂ plaatsen en overnacht incuberen.
- Volgende dag medium vervangen om dode cellen te verwijderen.

Kweek

- Medium verwarmen in een 37 °C waterbad.
- Cellen wassen met PBS/EDTA.
- Trypsine op cellen en tegen fles tikken totdat alle cellen los zijn.
- Trypsen stoppen door 5 x zoveel medium met serum toe te voegen.
- Gewenste hoeveelheid cellen overbrengen naar nieuwe kweekfles (in het geval van SMC's overbrengen naar een gelatine gecoate kweekfles).
- Voldoende medium toevoegen en in 37 °C stoof met CO₂ plaatsen.

Invriezen

Extra materialen: - FCS
 - DMSO

- Maak een FCS 10% DMSO oplossing en plaats dit op ijs.
- Codeer de ampullen en plaats deze ook op ijs.
- Cellen wassen met PBS/EDTA.
- Trypsine op cellen en tegen fles tikken totdat alle cellen los zijn.
- Trypsen stoppen door 5 x zoveel medium met serum toe te voegen.
- Cellen overbrengen naar een 50 ml blauwe dopbuis en 10 minuten afdraaien bij 1200 rpm.
- Supernatant afzuigen en cellen opnemen in de FCS 10 % DMSO oplossing en op ijs plaatsen.
- Cellen verdelen over de ampullen en in een piepschuim doosje overnacht in -80 °C vriezer plaatsen.
- Cellen op droogijs plaatsen en overbrengen naar stikstofvat.

Bijlage 12: Transfectie 3T3/maSMC d.m.v. Amaxa



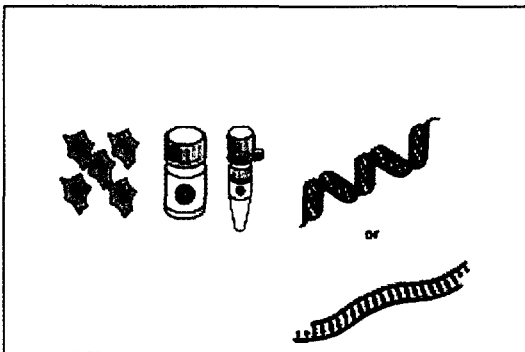
Materiaal:

- Cellen (10^6 cellen per reactie)
- PBS/EDTA
- Trypsine
- Medium 3T3: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep
- Medium maSMC: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 1% Glutamine, 1% NEAA (Non Essential Amino Acids)
- PBS
- Amaxakit: Nucleofector solution + cuvetten + pipetten
- Nucleofector

Bron: <http://www.amaxa.com>

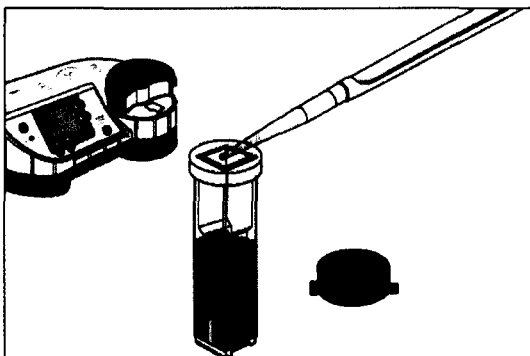
Methode:

1. Medium van de cellen afzuigen en wassen met PBS/EDTA.
2. Trypsine toevoegen en trypsen stoppen door toevoeging van 5 x zoveel medium met 10 % FCS.
3. Celkamer vullen en cellen tellen.
4. Ondertussen overige cellen overbrengen naar 50 ml blauwe dopbuizen en 10 minuten afdraaien bij 1200 rpm.
5. Supernatant afzuigen, 5 ml PBS toevoegen en 5 minuten afdraaien bij 1200 rpm.
6. Herhaal stap 5.
7. Supernatant afzuigen en per 10^6 cellen 100 μ l Nucleofector solution en 3 μ g DNA toevoegen.



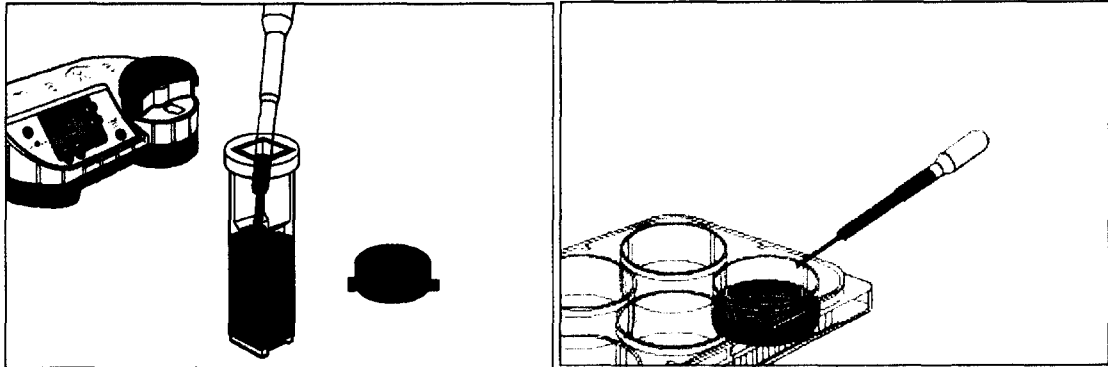
Bron: <http://www.amaxa.com>

8. Cellen + Nucleofector solution + DNA in de cuvetten brengen en in Nucleofector plaatsen.



Bron: <http://www.amaxa.com>

9. Voer de nucleofectie uit op programma U30.
10. Neem de cellen op in een fiepje met warm medium, resuspendeer in de cuvet en breng het over naar 4 ml warm medium. Verdeel dit over 2 wells van een 6-wellsplaat.



Bron: <http://www.amaxa.com>

11. Plaats de 6-wellsplaten overnacht in de stoof.

Tijdschema:

- Dag -1: Voldoende cellen doorzetten.
- Dag 0: Nucleofectie.
- Dag 1: Oogsten cellen.

Bijlage 13: Transfectie HER911/3T3 d.m.v. Lipofectamine 2000

Materiaal:

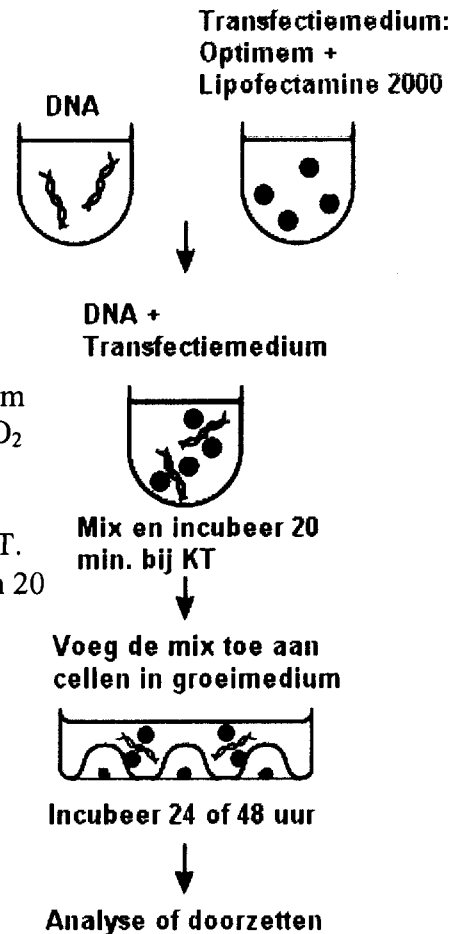
- Cellen (6-wellsplaat 90-95 % confluent)
- PBS/EDTA
- Trypsine
- Medium: DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep
- Optimem
- Lipofectamine 2000
- DNA

Methode:

1. Oude medium afzuigen van de 6-wellsplaat en 2 ml medium per well toevoegen. De platen 1 uur in de 37 °C stoof + CO₂ incuberen.
- Transfectiemedium (per well 250 µl Optimem en 10 µl Lipofectamine 2000) maken en 5 minuten incuberen bij KT.
- Aan het transfectiemedium DNA toevoegen (4 µg/well) en 20 minuten incuberen bij KT.
- Transfectiemedium in wells pipetteren.
- Overnacht in de 37 °C stoof + CO₂ incuberen.
- Analyse of doorzetten van de cellen.

Tijdschema:

- Dag -1: Uitplaten cellen op 6-wellsplaat, zodat op dag van transfectie de confluentie 90-95 % is.
- Dag 0: Transfectie.
- Dag 1: Analyse of doorzetten van de cellen.



Bron: <http://www.invitrogen.com>

Bijlage 14: Luciferase meting

Materiaal:

- Luciferase lysis buffer
- 1 M DTT
- Luciferase assay system (Promega)
(koud houden en beschermen tegen fel licht)
- MilliQ
- Luminometer (Berthold Luminat LB 9507)



Bron: <http://www.bertholdtech.com>

Methode:

1. Verdun 1M DTT tot 1mM in Luciferase lysis buffer.
2. Voeg de lysisbuffer + DTT aan de cellen in de well of aan fijngestampt weefsel.
3. Plaats het monster op droogijs en laat het 3 vries/dooi cycli ondergaan. Daarna op ijs laten staan.
4. Ondertussen MilliQ handwarm maken in magnetron en apparaat 3 keer spoelen:
Others → OPER. Funct. → Reagents → Prime → Inj1 → Reageerbuis plaatsen → Start.
5. Luminometer primen met Luciferase assay buffer volgens punt 4.
6. Voeg aan de reageerbuis 10 µl monster toe.
7. Meting: Exit → Measure → Protocols → Nummer 5 → Enter → Yes → Insert tube → Start.
8. Na metingen Luminometer spoelen met MilliQ volgens punt 4.

Bijlage 15: RNA isolatie uit cellen volgens QIAGEN RNeasy® Mini Kit

Materiaal:

- QIAGEN RNeasy® Mini Kit

Methode:

1. Zie QIAGEN RNeasy® Mini Handbook.

(http://www1.qiagen.com/literature/handbooks/PDF/RNAStabilizationAndPurification/FromAnimalAndPlantTissuesBacteriaYeastAndFungi/RNY_Mini/1016272HBRNY_062001WW.pdf)

Bijlage 16: RNA isolatie uit weefsel volgens Chromczynski

Materiaal:

- Minibead-beater cupje
- Glaspereels
- RNA-Bee
- Chloroform
- Isopropanol
- 75 % Ethanol

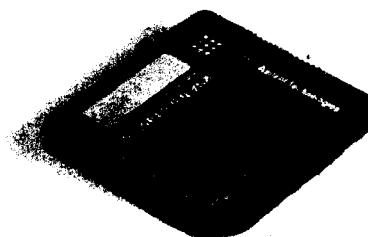
Methode:

1. Plaats de gecodeerde minibead-beater cupjes met glaspereels op droogijs.
2. Stamp het weefsel in vloeibare stikstof en breng het over naar een minibead-beater cupje met glaspereels erin.
3. Plaats de cupjes op ijs en voeg 1,3 ml koude RNA-Bee toe.
4. Schud in de minibead-beater 30 seconden op 50.000 rpm.
5. Voeg 230 µl chloroform toe.
6. Vortex de cupjes 15 seconden en laat het 5 minuten op ijs staan.
7. Centrifugeer 15 minuten op 13.000 rpm bij 4 °C.
8. Pipetteer 750 µl van de waterfase (bovenste transparante laag) over in een RNase vrij 1,5 ml epje.
9. Voeg 750 µl koude isopropanol toe en plaats de cupjes 15 minuten op ijs.
10. Centrifugeer 5 minuten op 13.000 rpm bij 4 °C.
11. Pipetteer het supernatant af. De witte pellet bevat het RNA, deze is niet altijd zichtbaar.
12. Voeg 1 ml koude 75 % Ethanol toe en vortex de cupjes.
13. Centrifugeer 8 minuten op 8000 rpm bij 4 °C.
14. Supernatant grondig afpipetteren en gedurende ca. 20 minuten open laten liggen op filterpapier op kamertemperatuur om de resterende ethanol te laten verdampen.
15. Pellet opnemen in 50 µl RNase vrij water.
16. Concentratiebepaling volgens Nanodrop.

Bijlage 17: Kwaliteit RNA bepalen d.m.v. Lab on a Chip

Materiaal:

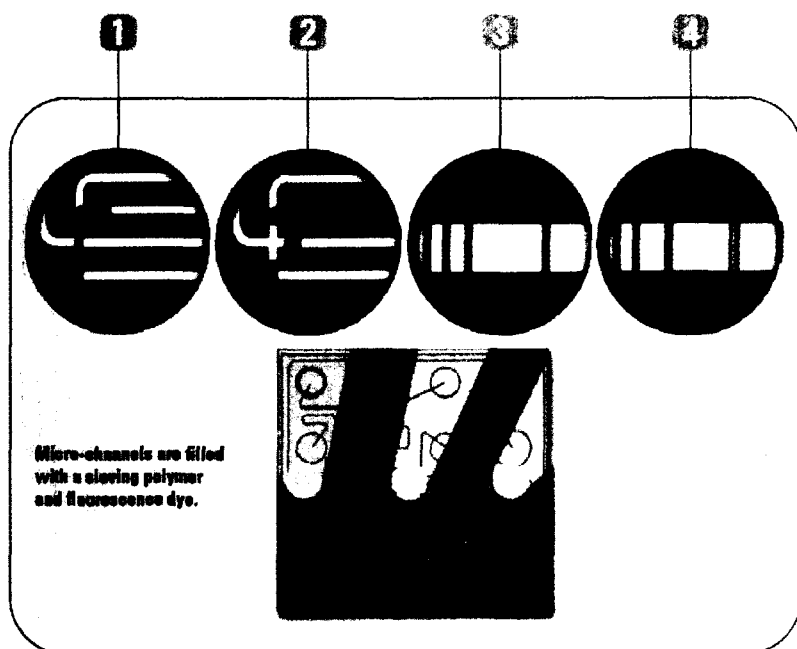
- Agilent Cooled RNA 6000 Pico Reagents & Supplies
- Agilent Bioanalyzer 2100



Bron: <http://www.chem.agilent.com>

Methode:

D.m.v. elektroforese met de Bioanalyzer 2100 kan de kwantiteit en kwaliteit van nucleinezuren of eiwitten worden bepaald. De chips bestaan uit een netwerk van microkanalen en reservoirs. Door de kanalen met een gel matrix te vullen en de reservoirs met buffer of monster, is er elektroforese mogelijk op miniatuurschaal.



- 1 The sample moves through the micro-channels from the sample well.
- 2 The sample is injected into the separation channel.
- 3 Sample components are electrophoretically separated.
- 4 Components are detected by their fluorescence and translated into gel-like images (bands) and electropherograms (peaks).

Bron: <http://www.chem.agilent.com>

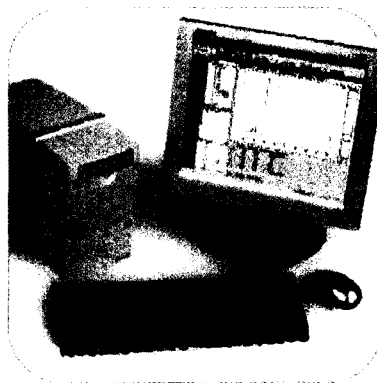
- 1 Fast and easy operation
Add sample



- 2 Automation
Start chip run



- 3 Digital data in 30 minutes
Watch real-time data display



Bron: <http://www.chem.agilent.com>

Bijlage 18: cDNA synthese d.m.v. Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand beads

Materiaal:

- Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand beads (Amersham Biosciences)
- RNase vrij water
- RNA monsters
- Hexaprimer (dN6, 0,2 µg/ µl) (Random primer Promega)
- RNase vrije epjes

Methode:

1. Verdun het RNA tot 1 µg in 32 µl RNase vrij water in een RNase vrij epje.
2. Incubeer 10 minuten bij 65 °C.
3. Plaats het epje voor 2 minuten op ijs en spin daarna.
4. Pipetteer de RNA mix volledig over in de Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand beads en wacht ongeveer 1 minuut totdat de beads volledig opgelost zijn.
5. Voeg 1 µl hexaprimer toe aan de beads.
6. Incubeer 1 uur bij 37 °C in een waterbad.
7. Verdun het cDNA door 200 µl RNase vrij water toe te voegen.

Bijlage 19: cDNA synthese d.m.v. Promega Reverse Transcription System

Materiaal:

- Promega Reverse Transcription System

Methode:

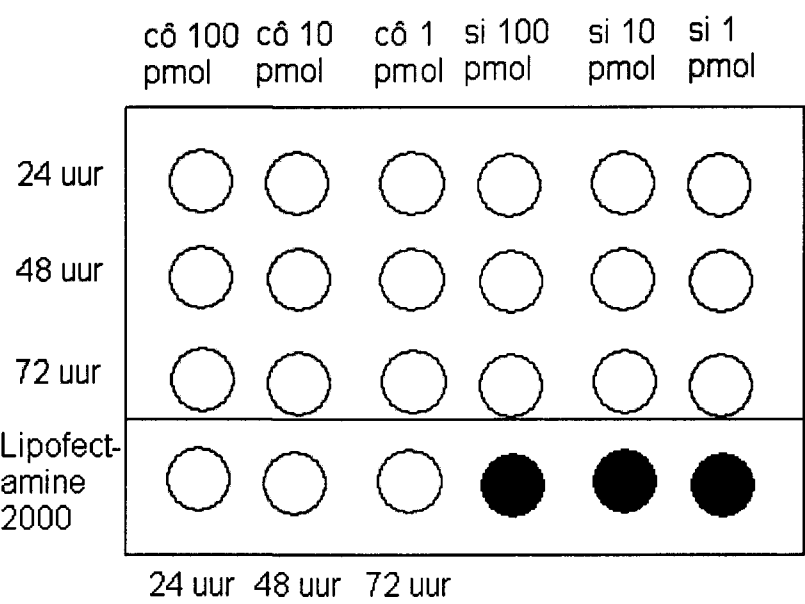
1. Zie Promega Reverse Transcription System protocol (<http://www.promega.com/tbs/tb099/tb099.pdf>)

Bijlage 20: siRNA sequenties Ambion

Target Sequence Name Tlr4		siRNA Kit Lot#: ASO008O9B													
Target Sequence															
5' N/A		3'													
Sense Sequence 5' GGCCCAUAAUUUGACUAAAtt 3' <table><tr><td>Length</td><td>Molecular Weight</td><td>%GC</td></tr><tr><td>21</td><td>6615.2</td><td>33</td></tr></table> AntisenseSequence 5' UUAUAGUCAAAUAUGGGCCtt 3' <table><tr><td>Length</td><td>Molecular Weight</td><td>%GC</td></tr><tr><td>21</td><td>6655.2</td><td>33</td></tr></table>				Length	Molecular Weight	%GC	21	6615.2	33	Length	Molecular Weight	%GC	21	6655.2	33
Length	Molecular Weight	%GC													
21	6615.2	33													
Length	Molecular Weight	%GC													
21	6655.2	33													
Annealed siRNA Molecular Weight 13270.4 **40 ug/OD was used to calculate concentration		RefSeq Number: NM_021297 siRNA ID: 75594													
Amount 20 nmole	Purification Standard														
5' Modifications N/A	Internal Modifications N/A	3' Modifications N/A													

Target Sequence Name Tlr4		siRNA Kit Lot#: 043601siB													
Target Sequence															
5' N/A		3'													
Sense Sequence 5' GGUGUGAAAUUGAAACAAUtt 3' <table><tr><td>Length</td><td>Molecular Weight</td><td>%GC</td></tr><tr><td>21</td><td>6742.2</td><td>29</td></tr></table> AntisenseSequence 5' AUUGUUUCAAUUUCACACctg 3' <table><tr><td>Length</td><td>Molecular Weight</td><td>%GC</td></tr><tr><td>21</td><td>6538.2</td><td>29</td></tr></table>				Length	Molecular Weight	%GC	21	6742.2	29	Length	Molecular Weight	%GC	21	6538.2	29
Length	Molecular Weight	%GC													
21	6742.2	29													
Length	Molecular Weight	%GC													
21	6538.2	29													
Annealed siRNA Molecular Weight 13280.4 **40 ug/OD was used to calculate concentration		RefSeq Number: NM_021297 siRNA ID: 75500													
Amount 20 nmole	Purification Standard														
5' Modifications 176	Internal Modifications 197	3' Modifications 189													

Bijlage 21: Transfectie 3T3 met siTLR4 Ambion d.m.v. Lipofectamine 2000



Dag 1: Cellen 1:4 uitzetten

Dag 2: Concentratierreeksen maken en transfectie volgens bijlage 13

Stock cô: 50 µM, stock siTLR4: 100 µM

- Cô 100 pmol → 15 µl
- Cô 10 pmol → 8 µl Nuclease-vrij water + 2 µl cô (50 µM)
- Cô 1 pmol → 9 µl Nuclease-vrij water + 1 µl cô-oplossing

- siTLR4 100 pmol → 10 µl
- siTLR4 10 pmol → 9 µl Nuclease-vrij water + 1 µl siTLR4 (100 µM)
- siTLR4 1 pmol → 9 µl Nuclease-vrij water + 1 µl siTLR4-oplossing

Deze mixen bewaren voor volgende dagen

Transfectiemedium: 18 wells, voor 20 wells maken

20 * 50 = 1 ml Optimem, 20 * 1 = 20 µl Lipofectamine 2000

ABC1: 150 µl Transfectiemedium + 6 µl cô 100 pmol

ABC2: 150 µl Transfectiemedium + 3 µl cô 10 pmol

ABC3: 150 µl Transfectiemedium + 3 µl cô 1 pmol

ABC4: 150 µl Transfectiemedium + 3 µl si 100 pmol

ABC5: 150 µl Transfectiemedium + 3 µl si 10 pmol

ABC6: 150 µl Transfectiemedium + 3 µl si 1 pmol

Na 20 minuten verdelen over de wellen A, B en C, 50 µl per well

Dag 3: Cellen isoleren 24 uur en overige cellen transfecteren

BC1: 100 µl Transfectiemedium + 4 µl cō 100 pmol

BC2: 100 µl Transfectiemedium + 2 µl cō 10 pmol

BC3: 100 µl Transfectiemedium + 2 µl cō 1 pmol

BC4: 100 µl Transfectiemedium + 2 µl si 100 pmol

BC5: 100 µl Transfectiemedium + 2 µl si 10 pmol

BC6: 100 µl Transfectiemedium + 2 µl si 1 pmol

Na 20 minuten verdelen over de wellen B en C, 50 µl per well

Dag 4: Cellen isoleren 48 uur en overige cellen transfecteren

C1: 50 µl Transfectiemedium + 2 µl cō 100 pmol

C2: 50 µl Transfectiemedium + 1 µl cō 10 pmol

C3: 50 µl Transfectiemedium + 1 µl cō 1 pmol

C4: 50 µl Transfectiemedium + 1 µl si 100 pmol

C5: 50 µl Transfectiemedium + 1 µl si 10 pmol

C6: 50 µl Transfectiemedium + 1 µl si 1 pmol

Na 20 minuten verdelen over de wellen C, 50 µl per well

Dag 5: Cellen isoleren 72 uur, RNA isolatie, cDNA synthese en Real Time RT-PCR

a



Digestie

- 10 µg pHipPy-siLuc.
- 20 Units BsmBI (10000 U/ml) → 2 µl
- 10 µl buffer 3 (10x)
- Aanvullen tot 100 µl met H₂O (SB)

1. 1 Uur incuberen bij 55 °C.
2. 2 µl BsmBI toevoegen.
3. 1 Uur incuberen bij 55 °C.

Op gel is niet het verschil van 1 en 2x geknipte fragmenten waar te nemen (siLuc is ongeveer 25 baseparen). Fragment is ongeveer zo groot als originele vector (2167 bp). Fragment uit gel snijden en zuiveren d.m.v. ZymoClean kolom. Elueren in 100 μ l.

XXVIII

“pHippy leeg” maken

Blunten (Labjournaal 2/8/04)

- 10 µl Pfx buffer (10x)
- 3 µl MgSO₄ oplossing
- 5 µl dNTP's 2,5 mM
- 1 µl Pfx polymerase
- 31 µl H₂O

Totaal 50 µl (Alle benodigdheden in Invitrogen doosje bij Simone)
+ een aantal druppels mineral oil

1. 3 Minuten incuberen bij 94 °C.
2. 50 µl gezuiverde pHippy 1 en 2x geknipt toevoegen (door de olie mengen).
(Totaal 8µg in 100µl. Concentratie $\approx$ 80 ng/µl)
3. 30 Minuten incuberen bij 68 °C.
4. Zuiveren over ZymoClean kolom.
5. Elueren in 10 µl.

Ligatie

- *Met ligase:* - 5 µl ligatiebuffer (2x)
- 1 µl geblunte pHippy leeg ($\approx$ 80 ng)
- 1 µl T4 DNA ligase
- 3 µl H₂O
- *Zonder ligase:* - 5 µl ligatiebuffer (2x)
- 1 µl geblunte pHippy leeg ($\approx$ 80 ng)
- 4 µl H₂O

Alle benodigdheden zijn van: Roche Rapid DNA Ligation Kit

1. 5 Minuten incuberen bij kamertemperatuur

Transformatie in *E. coli* DH5a

Er mogen geen kolonies worden gevormd bij stap zonder ligase (anders zijn er zelfsluiters ontstaan). Kolonies moeten groeien op zeocine plaat (pHippy heeft zeocine resistentieën).

Sequencen

Miniprep van gegroeide kolonies, opsturen naar baseclear. Sequentie na BsmBI knip: AAAA

“pHippy-siTLR4” maken

Vector sappen

1. Voeg aan het gedigesteerde plasmide DNA 0,9 µl per 7 µl digestiemengsel (≈ 560 ng) dephosphorylation Buffer (10 x).
2. En voeg 1 µl (1 U) per 7 µl digestiemengsel Phosphatase alkaline, shrimp toe.
3. Incubeer 10 minuten bij 37 °C. (In het geval van blunt ends 60 minuten)
4. Inactiveer SAP door 15 minuten te incuberen bij 65 °C.

Alle benodigdheden zijn aanwezig in de la van Simone

Oligo's oplossen

Gewenste eindconcentratie: $200 \mu\text{M} = 200 * 10^{-6} \text{ M}$

$(23 * 324,5 * 200 * 10^{-6} \approx 1,5 \mu\text{g}/\mu\text{l})$ voor een 23-mer)

Hoeveelheid oligo's: $\text{nmol} = 10^{-9} \text{ mol}$

Hoeveelheid DEPC water toevoegen = hoeveelheid oligo's (mol)/ $200 * 10^{-6} \text{ (M)}$

Kineren van de oligo's

- 10 µl T4-PNK buffer (10x)
- 33,25 µl DEPC water
- 2 µl Sense oligo ($\approx 3 \mu\text{g}$)
- 2 µl aSense oligo ($\approx 3 \mu\text{g}$)
- 0,25 µl BSA (10 mg/ml)
- 0,5 µl rATP (100 mM)
- 2 µl T4-PNK

Totaal 50 µl (Bij 100% hybridisatie $\approx 6 \mu\text{g}$ van een ds-23bps, maakt $\approx 120 \text{ ng}/\mu\text{l}$)

1. 1 Uur incuberen bij 37 °C.

Oligo's hybridiseren en inactiveren T4-PNK

Breng een bekglas met water aan de kook op een warmteplaatje (vergeet de kookkralen niet). Zet de heater uit als het water kookt. Doe de epjes met gekineerde oligo's in een piepschuim drijvertje en laat ze in het bekglas drijven tot het water is afgekoeld tot 45 °C. Zet vervolgens de epjes op ijs.

Ligeren gehybridiseerde oligo's in gesapte pHippy vector

- 1 µl (50 ng) gesapte pHippy vector ($\approx 62 \text{ ng}$)
- 1 µl ds gekineerde oligo (1 µl 1/20 verdunde Kinase mix $\approx 6 \text{ ng}$ ds-23bps, dit geeft een vector to insert ratio van $1:6 / (23/2167 * 62) \approx 1:9$)
- 5 µl ligase buffer (2x)
- 1 µl T4 DNA-ligase
- 2 µl DEPC water

Totaal 10 µl

Transformatie in *E. coli* DH5a

Kolonies moeten groeien op zeocine plaat (pHippy heeft zeocine resistentiegen).

Sequencen

Miniprep van gegroeide kolonies, opsturen naar baseclear.