



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la cèl·lula muscular llisa en el remodelat vascular

Núria Coll Bonfill



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartigual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartigual 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la cèl·lula muscular llisa en el remodelat vascular

Tesi presentada per

Núria Coll Bonfill

Per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Dr. Joan Albert Barberà

Dra. Melina Mara Musri



Programa de doctorat Medicina
Universitat de Barcelona, 2016

The important thing is never to stop questioning
Albert Einstein

Als meus pares. Al meu germà

Agraiments

M'agradaria donar les gràcies a tota aquella gent que d'una manera o altra m'ha ajudat a arribar a on sóc ara: finalment....amb la tesi sota el braç!

Començaré per agrair al meu *jefe*, el Dr. Joan Albert Barberà, l'oportunitat que em va donar per fer la tesi doctoral. M'has donat l'oportunitat de formar-me, aprendre i ampliar els meus coneixements. Tampoc no seria aquí, sense la Melina. *Esta tesis también es parte tuya, contigo he aprendido TODO lo que significa el mundo de la ciencia, desde razonar los experimentos, a hacerlos y que las cosas salgan! Aunque nuestra relación ha sido muy virtual, has sabido como enseñarme: de los emails largísimos que me imprimía para analizarlos y hasta una estancia contigo en Alemania, que fue de lo más fructífera. A tí, Víctor, que haríamos sin tus consejos y correcciones! A tu lado he aprendido a escribir los papers, el espíritu crítico y ha hacer ciencia de verdad.* No deixo tampoc de donar les gràcies als expneumolabers! La Raquel, el Borja, la Marta i l'Elisabet. Amb vosaltres vaig veure que la tesi no era un camí fàcil, però em vau ensenyar que amb paciència i treball, tot s'aconsegueix.

Bé, la gent actual del pneumolab.... Què he de dir de tots ells! Sou fantàstics i part de la tesi també és vostra. Agrair a les tècnics que han passat pel lab, Susana i Núria; i les que encara están, com la Cristina. Gràcies Cristina per expandir-me les cèl·lules quan t'ho he demanat perquè anava *pillada* de temps. Gràcies també per fer la feina aquesta que no es veu, però necessària perquè el laboratori funcioni. *Valerie, the latest incorporation! Your motivation and enthusiastic character gives a good atmosphere in the lab.* A tu, Olga, gràcies per la teva predisposició a corregir-me les meves spanish-ingleses, els teus ànims en moments clau i les teves idees fresques per fer nous experiments i projectes. *Tanja! Thank you for your capacity to listen and motivate myself! I que decir de mi TRON! Arriba esos brazos! Contigo he hecho todo el camino, desde que me abriste la puerta mi primer día cuando llegué toda perdida, hasta hoy. Juntas hemos puesto apunto protocolos, hemos compartido largas charlas en la sala de cultivos, hemos llorado, hemos reído, hemos viajado, hemos compartido buenos y malos momentos pero sobretodo HEMOS CREADO UNA GRAN AMISTAD. Espero que siga así muchos años más!*

A la gent del laboratori de Funció Pulmonar, i a tu, Isabel. Gràcies per estar sempre quan se't necessita i sobretot per fer fàcils els conceptes mèdics que sempre et preguntem. *A ti Marce, la maestra de Melina, también has sido mi maestra. Muchas gracias por ayudarme con los protocolos que no salían. Tus consejos son oro!* I al servei de citometria del IDIBAPS. Isabel Crespo i Cristina, sou un sol! La vostra sempre bona predisposició és d'agraïr.

En el terreny més personal m'agadaria agrair el suport de les GALLINES. Els nostres sopars no tenen límit. Gràcies noies! Sobretot a les meves excompanyes de pis: Maria i Teresa. Gràcies per estar sempre apunt d'una birra o uns vinets d'ànims! Per les nostres converses inacabables d'abans d'anar a dormir, sempre em despertàven un somriure. A les meves inseparables amigues del *cole*, Ester i Anna. Aquesta tesi també l'heu *aguantat* vosaltres, les vostres paraules sempre són sempre bòniques i d'agraïr! Gràcies.

A la família Coll Macías, perquè les nostres estones plegats sempre són vàlvules d'escapament i m'han donat energia i força per continuar endavant. Jaume, ets un home de poques de poques paraules però a la teva manera transmetes allò que toca.

A tu, Quim. Has viscut el tram final d'aquesta tesi, però no per això menys important, de fet, la més dura. Has portat tremendament bé la gestió de quan es podia fer la pregunta "prohibida" de com van els articles. Gràcies per la paciència que m'has transmès i les teves paraules d'ànim quan les he necessitades, però sobretot gràcies per les teves abraçades inacabables.

Finalment, als meus PARES. M'heu ensenyat moltes coses, però res com el significat real de l'ESFORÇ i el TREBALL. M'heu ensenyat a tirar-ho tot endavant passi el que passi i amb una gran frase ben present sempre al cap "al cul del sac es veuran les porqueres". Les vostres paraules justes però sempre adequades en el moment que les he necessitat m'han fet arribar a on sóc ara.

MOLTES GRÀCIES!

Pròleg

Aquesta tesi doctoral ha estat realitzada dins el programa de Doctorat de Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. La Comissió doctoral de la Facultat de Medicina ha avaluat i acceptat aquesta memòria per a la seva publicació i presentació com a tesi doctoral. Seguint la normativa vigent, aquesta tesi està redactada i compleix amb els criteris de presentació en el format clàssic. Dels resultats exposats se n'han derivat dues publicacions.

L'estructura d'aquesta tesi inclou una introducció general sobre el tema, seguida de les hipòtesis i els objectius globals i concrets que expliquen el perquè d'aquest treball. A continuació, s'exposen els resultats del dos estudis principals que conformen la tesi doctoral. A més, s'exposa una discussió conjunta dels dos treballs, per donar pas a una llista de conclusions. Per acabar, apareix un annex amb un article original publicat en format electrònic, el segon article en el format amb el qual s'ha enviat a publicar, i dues revisions publicades en revistes internacionals en format electrònic sobre els fonaments principals de la tesi doctoral on la doctoranda consta com a primera autora.

Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. Núria Coll-Bonfill, Victor I. Peinado, María V. Pisano, Marcelina Párrizas, Isabel Blanco, Maurits Evers, Julia C. Engelmann, Jessica García-Lucio, Olga Tura-Ceide, Gunter Meister, Joan Albert Barberà, Melina M. Musri. *PLoS One*. 2016 Aug 25;11(8):e0162117. FI: 3,2 1Q

COPD-associated pulmonary vascular remodeling is linked to miRNA dysregulation. *Melina M. Musri, *Núria Coll-Bonfill, ¶Bradley A. Maron, ¶Víctor I. Peinado, Wang Rui-Sheng, Jordi Altirriba, Isabel Blanco, William M. Oldham, Olga TuraCeide, Jessica García-Lucio, Benjamin de la Cruz-Thea, Gunter Meister, Joseph Loscalzo and Joan A. Barberà. Enviat a *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. FI 13,1 1Q

Noncoding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders. Coll-Bonfill N, de la Cruz-Thea B, Pisano MV, Musri MM. *Pflugers Arch*. 2016 Jun;468(6):1071-87. FI: 4,1

Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling. Coll-Bonfill N, Musri MM, Ivo V, Barberà JA, Tura-Ceide O. *Am J Stem Cells*. 2015 Mar 15;4(1):13-21. FI: 3,2

Índex

ABREVIATURES	XIII
INTRODUCCIÓ	1
1. Remodelat vascular	1
1.2 El remodelat vascular en la malaltia pulmonar obstructiva	3
2. Teoria cel·lular del remodelat vascular	5
2.1 Activació dels fibroblastes residents a la adventícia	5
2.2 Cèl·lula muscular de la capa mèdia	6
2.3 Cèl·lules progenitores	6
2.4 Transició de la cèl·lula endotelial a cèl·lula muscular llisa	10
3. Principals mecanismes moleculars implicats en el remodelat vascular pulmonar	13
3.1 La SMC	13
3.2 La EC	18
4. Factors iniciadors i moduladors del remodelat vascular	22
4.1 Superfamília dels factors de creixement transformants (TGF)	22
4.2 PDGF	24
4.3 Notch	24
4.4 Inflamació i quemoquines	26
4.5 Hipòxia	27
5. Epigenètica i malaltia: els microARNs com a reguladors post-transcripcionals	30
5.1 Biogènesi i funció dels miRNA	31
5.2 Estratègies per l'anàlisi funcional dels miRNAs i els seus gens diana	34
6. miRNAs i remodelat vascular	37
FONAMENT DE LA TESI DOCTORAL I HIPÒTESIS	43
OBJECTIUS	45
Objectius generals	46
Objectius específics	46
ESTUDI 1. SLUG AUGMENTA EN EL REMODELAT VASCULAR I INDUEIX EL CANVI FENOTÍPIC DE LA SMC.	47
MATERIAL I MÈTODES	51
Cultius de cèl·lules primàries	52
Estudi de la proliferació cel·lular	53
Experiments de senescència	54
Anàlisi de l'expressió gènica: Extracció ARN i Real Time-PCR (qPCR)	55
Western Blotting	59
Immunodetecció	61
Assajos funcionals: inhibicions i sobreexpressions	62
Assaig de tancament de ferida (Wound healing assay)	63
Anàlisi d'expressió <i>Transcriptome-wide</i>	63
Experiments <i>in vivo</i>	63
Aïllament d'artèries pulmonars humanes	66
Anàlisi de la qualitat de l'ARN	68
Anàlisi estadístic	68

RESULTATS	69
Obtenció dels models <i>in vitro</i> de canvis fenotípics de la SMC	70
Slug disminueix amb la diferenciació de la SMC	72
L'expressió de Slug regula la proliferació i la migració de la SMC	74
L'expressió de Slug regula el canvi de fenotip de la SMC	76
Slug regula gens implicats en migració i proliferació cel·lular	77
L'expressió de Slug incrementa en un model murí d'hipertensió pulmonar	79
L'expressió de Slug augmenta en artèries humanes molt remodelades	81
Slug es troba augmentat a les CE dels pacients amb artèries remodelades	84
Slug és un factor clau en el canvi de fenotip de la CE cap a <i>SMC-like cells</i>	84
RESUM DE RESULTATS PRIMER TREBALL	86
ESTUDI 2. EXPRESSIÓ DE MIRNAS DURANT EL EL REMODELAT VASCULAR PULMONAR ASSOCIAT A LA MPOC.	89
MATERIAL I MÈTODES	91
Expressió de miRNAs a l'artèria pulmonar	92
Anàlisi de xarxes	92
Models cel·lulars	93
Anàlisi d'expressió gènica	93
Northern Blotting	94
Assaig de Luciferasa: <i>Luciferasa reporter assay</i>	95
Anàlisi estadístic	95
RESULTATS	97
Existeix un perfil específic d'expressió de miRNAs a les artèries pulmonars de pacients amb MPOC	98
Anàlisi de xarxes i interaccions	100
Correlació de l'expressió de miRNAs amb el remodelat vascular i el FEV ₁	101
L'expressió del miR-197 augmenta al llarg de la diferenciació de la SMC	103
La inhibició del miR-197 promou l'adquisició del fenotip proliferatiu de la SMC	104
El gen E2F1 és diana directa del miR-197	105
L'expressió de E2F1 està augmentada a les artèries dels pacients amb MPOC	108
RESUM DE RESULTATS SEGON TREBALL	109
DISCUSSIÓ	111
Noves dianes en el remodelat vascular	112
CONCLUSIONS	122
RESULTATS ADDICIONALS	126
BIBLIOGRAFIA	128
ANNEX	152

ÍNDIX DE FIGURES

FIGURA 1. A, TALL TRANSVERSAL D'UN VAS ARTERIAL. B, REPRESENTACIÓ ESQUEMÀTICA DE LES TRES FORMES BÀSIQUES DE REMODELAT: REMODELAT DE LA MÈDIA, L'ADVENTÍCIA I LA ÍNTIMA.	3
FIGURA 2 CARACTERITZACIÓ CEL·LULAR DEL REMODELAT VASCULAR	4
FIGURA 3. ESQUEMA REPRESENTATIU DE LA IMPLICACIÓ DELS DIFERENTS TIPUS DE PROGENITORS DURANT EL REMODELAT VASCULAR.	4
FIGURA 4. ESQUEMA DE LA TEORIA CEL·LULAR DEL REMODELAT VASCULAR.	12
FIGURA 5 ESQUEMA REPRESENTATIU DELS FACTORS TRANSCRIPCIONALS QUE INTERVENEN EN LA DIFERENCIACIÓ DE LA SMC	15
FIGURA 6 . CARACTERÍSTIQUES DE CADA FENOTIP DURANT LA MODULACIÓ FENOTÍPICA DE LA SMC	16
FIGURA 7 ESQUEMA DELS CANVIS QUE INTERVENEN EN REGULACIÓ TRANSCRIPCIONAL PRODUIÏTS DURANT LA MODULACIÓ FENOTÍPICA DE LA SMC	18
FIGURA 8 ESQUEMA REPRESENTATIU DE LA REESTRUCTURACIÓ I MODIFICACIÓ GÈNICA DE LA EC DURANT L'ENMT	20
FIGURA 9 ESQUEMA DE LES VIES QUE S'ACTIVEN DURANT LA DIFERENCIACIÓ I MODULACIÓ FENOTÍPICA DE LA SMC	29
FIGURA 10 ESQUEMA DE LA BIÒGENESI DELS MIRNAS.....	32
FIGURA 11- ESQUEMA RESUM DELS PRINCIPALS MIRNAS QUE INTERVENEN EN EL REMODELAT VASCULAR	41
FIGURA 12 PLOT ON ES POT IDENTIFICAR LA FASE S DEL CICLE CEL·LULAR	54
FIGURA 13 FOTO REPRESENTATIVA D'UN VAS MUSCULARITZAT RESPECTE UN NO MUSCULARITZAT. ELS VASOS MUSCULARITZATS SÓN POSITIVS PER A-SMA.	66
FIGURA 14- ESQUEMA DEL PROCEDIMENT SEGUIT EN L'ANÀLISI D'EXPRESSION A PARTIR D'ARTÈRIES PULMONARS	68
FIGURA 15. MODELS IN VITRO DELS CANVIS DE FENOTIP DE LA SMC.....	70
FIGURA 16. ANÀLISI DE LA SENESCÈNCIA CEL·LULAR EN UN MODEL DE CONTACTE CEL·LULAR.....	71
FIGURA 17. MODELS DE DEDIFERENCIACIÓ AMB TNF-A.....	72
FIGURA 18 .SLUG AUGMENTA EN LES SMC DEDIFERENCIADES.....	72
FIGURA 19. MODEL DE DIFERENCIACIÓ ESTIMULAT AMB TGFβ-1.	73
FIGURA 20. EFICIÈNCIA DEL KNOCKDOWN DE SLUG AMB siRNA.	74
FIGURA 21. SLUG REGULA LA PROLIFERACIÓ I LA MIGRACIÓ DE LA SMC.	75
FIGURA 22. SLUG REGULA AMBDÓS FENOTIPS: LA DEDIFERENCIACIÓ INDUÏDA PER TNFA I LA DIFERENCIACIÓ PER TGFβ-1... ..	77
FIGURA 23. SLUG REGULA GENS RELACIONATS AMB VIES DE PROLIFERACIÓ I MIGRACIÓ	78
FIGURA 24. ANÀLISI DE L'EXPRESSION DE SLUG ALS PULMONS D'UN MODEL MURÍ D'HIPERTENSIO PULMONAR SEVERA.....	80
FIGURA 25. EXPRESSION DE SLUG I SNAI1 DESPRÉS DE L'EXPOSICIÓ A HIPÒXIA O CSE.	81
FIGURA 26. ANÀLISI DE L'EXPRESSION D'SLUG A SMC A ARTÈRIES PULMONARS HUMANES	83
FIGURA 27. ANÀLISI DE L'EXPRESSION D'SLUG A EC A ARTÈRIES PULMONARS HUMANES.	84
FIGURA 28. SLUG ÉS UN FACTOR CLAU EN L'ENMT INDUÏDA PER TNF-A.	85
FIGURA 29. RESUM DEL MECANISME DIRIGIT PER SLUG EN LA DIFERENCIACIÓ DE LA SMC I EL REMODELAT VASCULAR	88
FIGURA 30. PERFIL D'EXPRESSION DE MIRNAS EN ELS PACIENTS AMB MPOC, F I NF NF.....	99
FIGURA 31- XARXA D'INTERACCIONS ENTRE MIRNA A LA MPOC	100
FIGURA 32. ANÀLISI DE CORRELACIONS DE L'EXPRESSION DE MIRNAS AMB LA FEV ₁ I EL GRUIX DE LA ÍNTIMA.	102
FIGURA 33. ANÀLISI DE L'EXPRESSION DEL MIR-197 DURANT EL CANVI FENOTÍPIC DE LA SMC I EN SMC DERIVADES DE PACIENTS	104
FIGURA 34 LA INHIBICIÓ DEL MIR-197 BLOQUEJA LA DIFERENCIACIÓ DE SMC.....	105
FIGURA 35. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E2F1 ÉS DIANA DIRECTA DEL MIR-197.	107
FIGURA 36.IGF1 ES DIANA DE MIR-197.....	108
FIGURA 37. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓ E2F1 ESTÀ AUGMENTAT A LES ARTERIES PULMONARS DELS PACIENTS AMB MPOC.	108
FIGURA 38- RESUM DEL MECANISME PEL QUAL MIR-197 PODRIA ESTAR RELACIONAT AMB EL REMODELAT VASCULAR ASSOCIAT A LA MPOC.	110

ÍNDIX DE TAULES

TAULA 1. RESUM DELS PRINCIPALS MIRNAS IMPLICATS EN LA HOMEÒSTASI DE LA SMC.....	42
TAULA 2- CEBADORS O PRIMERS UTILITZATS EN EL PRIMER ESTUDI (5'-3')	56
TAULA 3. RESUM DELS 15 TOP GO VIES AFECTADES DESPRÉS DEL KO.....	78
TAULA 4 - RESUM DE LES CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ.	81
TAULA 5- CEBADORS O PRIMERS UTILITZATS EN EL SEGON ESTUDI 5'-3'	96
TAULA 6- CARACTERÍSTIQUES DE LA POBLACIÓ.	99

Abreviatures

EC- Cèl·lula endotelial

SMC- Cèl·lula muscular

MPOC- Malaltia pulmonar obstructiva crònica

HP- Hipertensió pulmonar

EnMT- Transició de cèl·lula endotelial a mesenquimal (*Endothelial to mesenchymal transition*)

SMA- α -actina de múscul·llis

SM-MHC- Proteïna de la cadena pesada de la miosina de múscul llis (*smooth muscle myosin heavy chain*)

TGF β - Factor de creixement transformant β (*Transforming growth factor β*)

TGF β R1 o ALK - Receptor tipus 1 de TGF β

FGF- Factor de creixement de fibroblastes (*Fibroblasts growth factor*)

EGF- Factor de creixement de l'epidermis (*Epidermal growth factor*)

HGF- Factor de creixement d'hepatòcits (*Hepatocyte growth factor*)

vWF- vonWillebrand factor

HSC- Cèl·lules mare hematopoiètiques (*Hematopoietic stem cells*)

EPC- Cèl·lules progenitores endotelials (*Endothelial progenitor cells*)

MSC- Cèl·lules progenitores mesenquimals (*Mesenchymal stem cells*)

SMPC- Cèl·lules progenitores de múscul llis (*Smooth muscle progenitor cells*)

PDGF- Factor de creixement derivat de plaquetes (*Platelet-derived growth factor*)

VEGF- Factor de creixement de l'endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*)

VEGFR- Receptor factor de creixement endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor receptor*)

SDF1 o CXL12 - Factor tipus 1 derivat de l'estroma (*Stromal derived factor*)

vRSC- Cèl·lules progenitores vasculars residents (*Vascular resident stem cells*)

PECAM o CD31- Molècula d'adhesió de cèl·lules endotelials i plaquetes

Sm22 α – Transgelina

APEG-1- Proteïna preferencialment expressada a la aorta tipus 1 (*Aortic preferentially expressed gene 1*)

CGRP2- Proteïna tipus 2 rica en cisteïna i glicina (*Cisteïna And Glycine Rich Protein 2*)

SER- Elements responedors de sèrum (*serum response elements*)

SRF- Factor responedor de sèrum (*serum response factor*)

MEF2 – Factor augmentador de miòcits tipus 2 (*Myocyte enhancer factor-2*)

MyoCD- Miocardina

TCE –Elements de control per *TGFβ* (*TGFβ control elements*)

bHLH- Basic hèlix-*loop*-helix

KLF4- Kruppel like factor 4

KLF5- Kruppel like factor 4

EMT- Transició de la cèl·lula epitelial a mesnquimal (*Epithelial to mesenchymal transition*)

MET- Transició de la cèl·lula mesnquimal a epitelial (*Mesenchymal epithelial trasnsdiferentiation*)

BMP- Proteïna de l'ós morfogènic (*Bone morphogenic protein*)

BMPR- Receptor de la proteïna de l'ós morfogènic (*Bone morphogenic protein receptor*)

HDACS- Histones deacetilases

MMP- Metaloproteïnases

SP1- Proteïna específica 1 (*Specific protein 1*)

HAP- Hipertensió arterial pulmonar

NICD- Domini intercel·lular de notch (*Notch intracel·lular domain*)

IL-6- Interleucina 6

TNF- α - Factor necrosi tumoral α

IL-1- Interleucina 1

NF- $\kappa\beta$ - Factor nuclear kappa- beta

HIF-1 α - Factor induït per hipòxia (*Hipoxia inducible factor*)

ncRNAs- ARNs no codificants (*Non-coding RNAs*)

miRNAs- MicroRNAs

ARN- Àcid ribonucleic

ADN- Àcid desoxiribonucleic

TAR – Element de resposta transactivadora del virus de la immunodeficiència (*Immunodeficiency virus transactivation response element*)

Ago- Complex Argonauta

miRISC- Complex de silenciament induït pels miRNAs (*miRNA induced silencing complex*)

IRES- Lloc intern d'entrada de ribosomes (*internal ribosomes entry site*)

KO- Pèrdua de funció (*knockouts*)

STAT3- Proteïna transductora de senyal i activadora de la transcripció 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*)

PTEN- Enzim homòleg fosfatasa-tensina (*Phosphatase and tensin homolog*)

Erk- Proteïna quinasa reguladora de senyals extracel·lulars

FOXO- proteïnes Forkhead box

PCD4- Proteïna de mort cel·lular programada (*programmed cell death 4*)

AP1 – Proteïna activadora tipus 1 (*Activator protein 1*)

D0- SMC fenotip proliferatiu

D2- SMC fenotip intermig

D6- SMC completament diferenciades

IP- Iodur de propidi

PBS- Tampó fosfat salí

TBS- Tampó Tris-salí

FBS-Sèrum fetal boví

CSE- Extracte de tabac

ON-Overnight

qPCR- PCR a temps real

BCA- L'àcid bicinconínic

BSA-Albúmina sèrica bovina

PVDF -Fluor de polivinilide

HRP- Horse-redox-peroxidasa

FITC- Isotiocianat de fluoresceïna

DAPI- 4',6-diamidino-2-phenylindole

siRNAs- ARNs d'interferència

CH- Hipòxia crònica

SU5416- Sugen

RVP-Pressió ventricular dreta

R1- artèries remodelades grau 1

R2- artèries remodelades grau 2

R3-artèries remodelades grau 3

CCNI- Claudina tipus I

KRT19- Queratina 19

CCNA2-Ciclina 2

HBEGF- Factor de creixement semblant al domini d'unio de la heparina-EGF (*Heparin Binding EGF Like Growth Factor*)

FEV₁- volum expiratori al primer segon

FVC- capacitat vital forçada

paO₂-pressió parcial d'O₂

ES-error estàndard

NF- No fumadors

F-Fumadors

IGF1- Factor de creixement de la insulina tipus 1 (*Insulin growth factor 1*)

AS-miR-197- ARN antisentit 2'O metilat del miR-197

AS-miR-CTL- ARN antisentit 2'O metilat no específic de cap miRNA

Introducció

1. El remodelat vascular

El sistema vascular és l'encarregat de mantenir el flux sanguini cap als òrgans mantenint-ne la pressió i un flux continu. Està format principalment per artèries i venes. Les artèries són conductes membranosos, elàstics i d'estructura cel·lular heterogènia principalment formades per cèl·lules endotelials, (*endothelial cells* (EC)), cèl·lules musculars llises (*Smooth muscle cells* (SMC)), fibroblastes i cèl·lules progenitores. Cada vas arterial consta de 3 capes (Figura 1A):

- Túnica interna o íntima: capa de contacte directe amb la sang. Constituïda per l'endoteli (EC i pericits), una làmina basal i una capa conjuntiva subendotelial.
- Túnica mitjana: formada majoritàriament per fibres musculars, fibres elàstiques i fibres de col·lagen. La proporció és variable segons el tipus de vas i és la responsable, majoritàriament, de la funció de contracció i relaxació del vas.
- Túnica externa o adventícia: formada per teixit conjuntiu lax, per fibroblastes i fibres col·lagen principalment.

Cada capa presenta característiques histològiques, bioquímiques i funcionals diferents i actuen de forma específica per mantenir la homeòstasis vascular, regulant el to vascular i la resposta al dany vascular.

El remodelat vascular és un terme utilitzat per definir l'adaptació de l'estructura de la paret vascular a diferents processos com pot ser la pressió, estrès o dany vascular. Això el fa característic d'un gran nombre de malalties vasculars com aneurisma, hipertensió pulmonar (HP), arteriosclerosi, etc (Gibbons and Dzau, 1994). El remodelat vascular és un procés patològic, caracteritzat per un engruiximent de la capa íntima, mitjana i/o adventícia pròpia de les artèries i arterioles, reduint el diàmetre del lumen i augmentant així la resistència al flux sanguini (Galiè et al., 2004) (Ross, 1993). Aquest engruiximent està majoritàriament produït per un increment de la deposició de components de matriu extracel·lular com col·lagen, elastina i fibronectina (Jeffery and Wanstall, 2001) i per una proliferació desmesurada de SMC (Sakao et al., 2010). Aquestes SMC provenen de diferents orígens com els miofibroblasts i SMC provinents

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

de la capa mèdia, de cèl·lules endotelials, progenitores, o fibroblastes de l'adventícia (Stenmark et al., 2006a) (Arciniegas et al., 2007a) (Sahara et al., 2007).

Segons el tipus de malaltia vascular el remodelat vascular estarà produït per diferents processos i afectarà de manera diferent a cada capa del vas arterial (Figura 1B). En el cas de la restenosis i l'arteriosclerosi, després de dany vascular es produeix una acumulació de SMC a la íntima (Schober, 2008) (Weber and Noels, 2011). El remodelat en la HP pot incloure totes les capes de la paret vascular, hiperplàsia de la íntima, hipertròfia de la mèdia i proliferació a l'adventícia (Figura 1B).

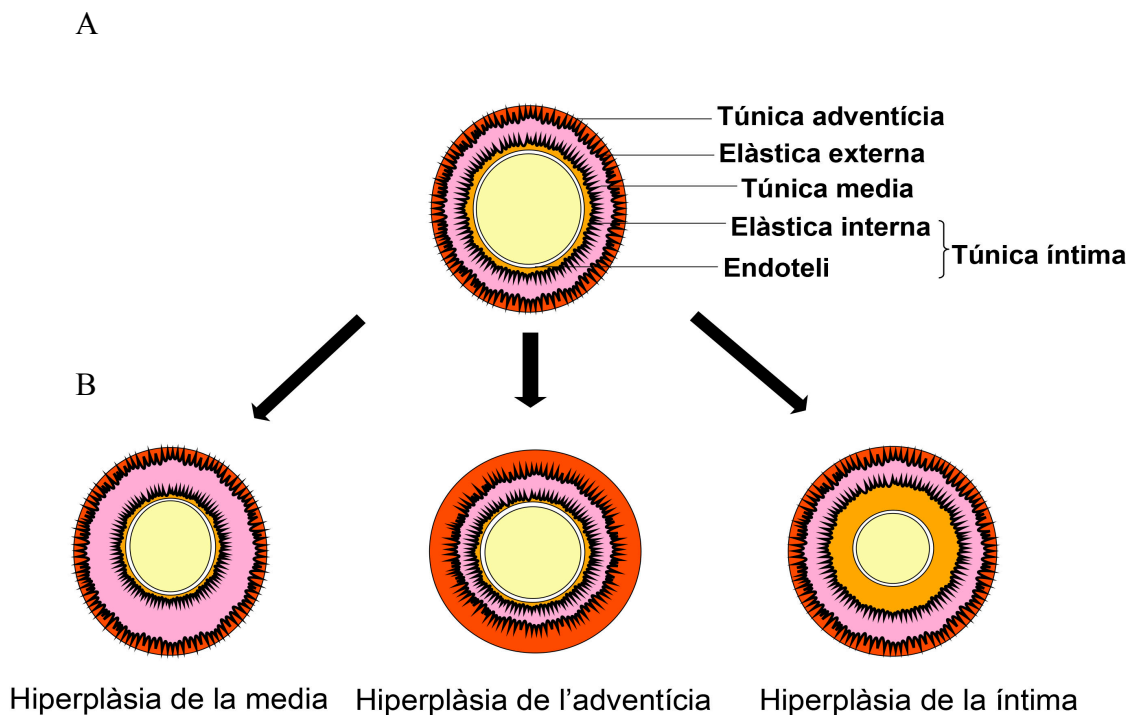


Figura 1. A, Tall transversal d'un vas arterial. B, Representació esquemàtica de les tres formes bàsiques de remodelat: remodelat de la mèdia, l'adventícia i la íntima.

1.2 El remodelat vascular en la malaltia pulmonar obstructiva

A la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) l'engruïment de la íntima és un dels trets més destacat. La MPOC és una malaltia que es caracteritza clínicament per per una obstrucció poc reversible al flux aeri associada a un procés inflamatori crònic

INTRODUCCIÓ

als vasos pulmonars degut a la inhalació de partícules i gasos nocius (Vestbo et al., 2013). Entre un 30% i un 70% dels pacients de MPOC també pateixen HP (Seimetz et al., 2011) (Hida et al., 2002). La HP ve definida com l'augment de la pressió mitjana de l'artèria pulmonar amb valors superiors a 25 mmHg en repòs i a 30 mmHg durant l'exercici (Humbert and Galie, 2016).

En estudis previs del grup, es va demostrar que l'engruiximent de la íntima en la MPOC era degut a una proliferació de cèl·lules de tipus muscular positives per α -actina de múscul llis (α -SMA) i desmina negatives, suggerint un fenotip dediferenciat de la cèl·lula muscular llisa vascular o fenotip miofibroblàstic (Santos et al., 2002) (Figura 2). Aquestes cèl·lules posseeixen capacitat sintètica i participen en un procés actiu de remodelat vascular. Es creu que participen disminuint l'expressió de gens contràctils i incrementant la taxa de proliferació, migració i producció de matriu extracel·lular (Stenmark et al., 2006b) (Huang et al., 2014).

A més, la SMC juga un paper important en el reclutament de cèl·lules inflamatòries. Les SMC sintètiques incrementen la producció de múltiples factors de creixement, quemoquines i citocines inflamatòries que participaran en el reclutament de macròfags principalment, però també monòcits i altres cèl·lules (Ostriker et al., 2014) (Schober, 2008). Com s'ha vist, les SMC són les principals promotores del remodelat vascular pulmonar i la seva modulació esdevé crítica en la progressió de les malalties vasculars pulmonars.

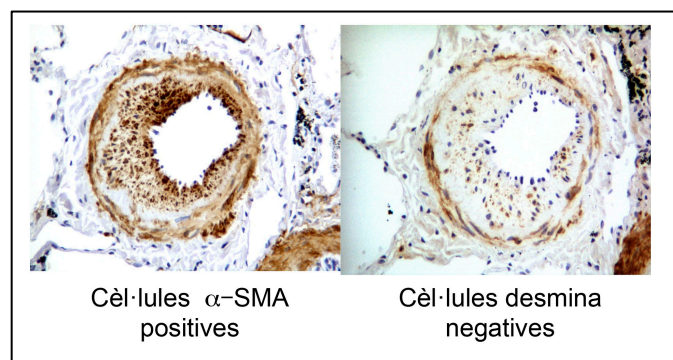


Figura 2. Caracterització cel·lular del remodelat vascular pulmonar: cèl·lules α -SMA positives i desmina negatives constitueixen el tipus cel·lular majoritari a la íntima de les artèries remodelades, tal i com es descriu al article Santos *et al.* ERJ 2002; 19:632

2. Teoria cel·lular del remodelat vascular

Els mecanismes implicats en el remodelat vascular pulmonar no es coneixen exactament. Tradicionalment, es creu que aquest procés inclou canvis a la EC, a la SMC i als fibroblastes. Tots ells promouran un augment de producció de matriu extracel·lular. A part d'aquests canvis a les cèl·lules pròpies del vas, se sap que s'afavoreix el reclutament de cèl·lules provinents de l'adventícia, cèl·lules progenitores i cèl·lules inflamatòries. Així doncs, en el remodelat vascular intervenen diferents tipus de cèl·lules que es detallaran a continuació.

2.1 Activació dels fibroblastes residents a la adventícia

Els fibroblastes són el tipus cel·lular principal de l'adventícia i constitueixen el tipus cel·lular estromal amb vida mitjana més llarga. L'heterogeneïtat de la població dels fibroblastes està ben documentada, cadascun d'ells *in vitro* pot sintetitzar diferents tipus de α -SMA, poden tenir diferent morfologia i poden ser claus en el control de la funció vascular (Sorrell and Caplan, 2004) (Schmitt-Gräff et al., 1994). Específicament, l'adventícia està considerada "sensor" del dany vascular, ja que proporciona gran nombre de cèl·lules i molècules que intervindran en el remodelat vascular (Stenmark et al., 2006a).

La primera evidència de la migració de cèl·lules de la adventícia cap a l'espai subendotelial va ser obtinguda en experiments on s'estudiava la incorporació de bromoxiuridina, molècula només incorporada per les cèl·lules proliferants. En un model porcí, es va demostrar que després de dany vascular, els fibroblastes de l'adventícia migraven i es transformaven a miofibroblasts proliferants a la íntima arterial (Shi et al., 1996a) (Sartore et al., 2001). Més endavant, altres treballs mostraren que els fibroblastes residents de l'adventícia eren activats en resposta a l'estrès oxidatiu, hipòxia o la distensió vascular que estimularien una sèrie de canvis funcionals com un increment en la proliferació, expressió de proteïnes contràctils i de matriu extracel·lular que els permetrien migrar a la íntima arterial (Zalewski and Shi,

INTRODUCCIÓ

1997) (Li et al., 2000). També augmenten la secreció de factors que afecten al to cel·lular de la capa mèdia, al seu creixement i al reclutament de cèl·lules inflamatòries. (Shi et al., 1996a) (Shi et al., 1996b).

2.2 Cèl·lula muscular de la capa mèdia

La SMC es l'únic tipus cel·lular present a la mèdia i és la responsable de regular el diàmetre del vas arterial, de les funcions sintètiques i del manteniment de la matriu extracel·lular, les fibres de col·lagen i les fibres elàstiques.

La SMC té diferents orígens embriològics segons el segment de l'artèria al qual pertany, i això la fa especialment sensible als estímuls segons la zona (Majesky, 2007) (Trigueros-Motos et al., 2013). Aquest fet serà determinant en el desenvolupament del remodelat segons el tipus d'artèria i les condicions a les quals està sotmesa.

Goldberg *et al* (Goldberg et al., 1979) va demostrar que les SMC de la mèdia era capaç de proliferar després de dany vascular i Clowes *et al* va estimar que el 46% de les SMC de la mèdia entraven a cicle cel·lular després de dany endotelial (Clowes et al., 1983) (Clowes and Schwartz, 1985).

Més recentment, Herring *et al* (Herring et al., 2014) va demostrar que després del dany vascular les SMC de la mèdia eren capaces de dediferenciar-se, migrar i formar part de la neointima. Va concloure, tot i que amb molta heterogeneïtat, que el 40-90% de cèl·lules de la íntima provenien de la mèdia. Recentment, Owens *et al* (Shankman et al., 2015) ha descrit que el 80% de les cèl·lules de la íntima provenen de la dediferenciació de SMC de la mèdia.

2.3 Cèl·lules progenitores

L'estimulació de l'angiogènesi i la neovasculogènesi per part de les cèl·lules progenitores és fonamental per la correcta reparació dels vasos pulmonars a l'individu adult.

2.3.1 Cèl·lules progenitores derivades de la medul·la òssia:

Tipus progenitores: La medul·la òssia conté diferents tipus de progenitores: cèl·lules mare hematopoiètiques (*hematopoietic stem cells* (HSCs)), cèl·lules progenitores endotelials (*endothelial progenitor cells* (EPCs)), cèl·lules mare mesenquimals (*mesenchymal stem cells* (MSC)), cèl·lules progenitores musculars (*smooth muscle progenitor cells* (SMPC)) (Saiura et al., 2001) (Hirschi and Majesky, 2004) i cèl·lules mare multipotents. Molts estudis han evidenciat la plasticitat d'aquestes cèl·lules derivades de medul·la òssia per a diferenciar-se a diferents tipus cel·lulars. Aquesta característica farà que puguin exercir un paper dual. Per una banda, realitzar una funció reparativa i de regeneració de nous vasos sanguinis participant en l'angiogènesis, i per l'altra, iniciar un procés patològic contribuint a la hiperplàsia de la íntima (Yamashita et al., 2000) (Sahara et al., 2007) (Daniel et al., 2010). Es va demostrar que el 60% de les SMC que formem part de la neoíntima post dany vascular provenien de cèl·lules progenitores derivades de medul·la òssia (Sata et al., 2002).

- *EPC:* Ashara et al (Ashara 1997) va aïllar per primera vegada les EPC, basant-se en l'expressió de CD34 i altres marcadors, i va demostrar la incorporació de les EPC en llocs actius d'angiogènesis en diferents models d'isquèmia. Més endavant, cèl·lules CD34+ flk1+ van ser trobades a vasos i demostrada la seva capacitat de regenerar l'endoteli i transformar-se a cèl·lules amb un fenotip mesenquimal semblant a cèl·lula muscular (*SM-like cells*) (Tanaka et al., 2003) (Yamashita et al., 2000). Sata et al va descriure que cèl·lules c-Kit+/Sca1-/lin- eren capaces a diferenciar-se a *SM-like cells* expressant α -SMA (Sata et al., 2002). Més endavant, es va estudiar el seu paper en la formació de la íntima, demostrat per l'aparició de cèl·lules c-kit+, sca-1-, CD34+, KDR+ en la neoíntima i l'adventícia de plaques arterioscleròtiques de pacients (Torsney et al., 2007). En el nostre grup també es van fer treballs en aquest sentit. Cèl·lules progenitores endotelials CD45+ CD34+ CD133+, es van detectar augmentades en pacients amb MPOC i artèries remodelades. A més, la infiltració d'aquestes cèl·lules correlacionava positivament amb l'engruiximent de la íntima (Peinado et al., 2006) (Díez et al., 2007). També eren capaces de

transformar-se a *SM-like cells* (Díez et al., 2010). Més recentment, cèl·lules c-kit+ s'han localitzat a vasos de pacients amb hipertensió arterial pulmonar idiopàtica (Montani et al., 2011) (Figura 3).

- *MSC*: Gràcies a la seva capacitat d'adhesió a plàstic s'han caracteritzat aquest tipus de progenitores, identificades com CD105+, CD44+, CD90+, CD71+. Nombrosos treballs han demostrat que les MSC poden diferenciar-se a SMC tant *in vitro* com *in vivo* (Davani et al., 2003) (Gojo et al., 2003) (Yoon et al., 2005). Diversos estudis han demostrat un increment d'íntima arterial provinents de MSC en ratolins amb dany vascular (Wang et al., 2008). Recentment, s'ha demostrat que una petita proporció (<7%) de les cèl·lules que formen part del remodelat vascular provenen de MSC (Shankman et al., 2015) (Figura 3).

- *SMPC (smooth muscle progenitors cells)*: Simper *et al* (Simper et al., 2002) van demostrar l'existència de SMPC provinents de medul·la òssia. Va cultivar cèl·lules mononuclears (*mononuclear cells* (MNCs)) en medi EGM-2 enriquit amb el factor de creixement derivat de plaquetes B (*platelet derived growth factor* (PDGFB)) i va obtenir colònies de cèl·lula muscular. Eren colònies amb morfologia progenitora i eren positives per α -SMA, la proteïna de la cadena pesada de la miosina de múscul llis (*Smooth muscle-myosin heavy chain* (SM-MHC)) i Calponina. També expressaven marcadors d'hemangioblasts com CD34+, Fit-1 i Flk-1. Zoll *et al* (Zoll et al., 2008) per la seva banda, va obtenir cèl·lules progenitores musculars *in vitro* a partir de sang perifèrica després de malaltia coronària. Aquestes cèl·lules van establir la lesió i no van tenir efecte en el remodelat vascular. Altres estudis si que van demostrar que el reclutament de les SMPC van afavorir la hiperplàsia de la íntima i la muscularització de les arterioles (Subramanian et al., 2010) (Sheikh et al., 2015) (Figura 3).

Reclutament: Se sap que després de dany vascular, es dona una alliberació de factors com el PDGFB, el factor de estimulador del creixement endotelial (*vascular endothelial growth factor* (VEGF)) i factor estromal 1 (*stromal cell-derived factor-1* (SDF-1)). VEGF i SDF1 són importants per la mobilització de les EPC (Asahara et al.,

1999)(Massa et al., 2005). Una vegada mobilitzades aquestes migren via luminal o per la adventícia. Després actuaran factors com el TGF- β i el PDGFB que induiran la diferenciació cap a *SM-like cells* (Díez et al., 2010) (Sinha et al., 2004). En el reclutament de les SMPC intervenen molècules com la quemoquina SDF-1/CXCL12 (Subramanian et al., 2010) o la hipòxia (Sheikh et al., 2015) (Figura 3).

2.3.2 Cèl·lules progenitores residents:

S'ha descrit l'existència de nínxols de cèl·lules mare als vasos pulmonars. Un nínxol es defineix com el microambient que interactua amb les cèl·lules mare i regula el destí d'aquestes. Aquest microambient manté les cèl·lules mare en un estat quiescent, però després de dany vascular es podrien activar senyals que promouen la proliferació i la diferenciació de les mateixes.

El descobriment de l'existència de cèl·lules progenitores vasculares residents (*vascular resident stem cells* (vRSC)), és a dir, una població resident de cèl·lules progenitores als vasos pulmonars, va relacionar-se amb un engruiximent de la íntima (Hu et al., 2002). Ingram et al 2005 va descriure EPC clonogèniques i amb una alta taxa de replicació sota la capa endotelial madura dels vasos (Ingram et al., 2005). Sainz et al va descriure la presència de cèl·lules progenitores multipotents musculars a la mèdia de les artèries, que sota l'estímul de TGF- β i PDGFB podien diferenciar-se a SMC (Sainz et al., 2006). Un altre tipus de progenitores multipotents que es van descriure són les cèl·lules ckit+, stro1+ notch+, cèl·lules progenitores vasculares que resideixen al límit entre la mèdia i l'adventícia, també anomenada *vasculogenic zone*, que tenen la capacitat de migrar després de dany vascular i substituir cèl·lules mortes i disfuncionants (Ergün et al., 2007) (Zengin et al., 2006) (Tintut et al., 2003). També s'han descrit cèl·lules progenitores a l'adventícia que poden diferenciar-se a SMC (Hu et al., 2002) (Figura 3).

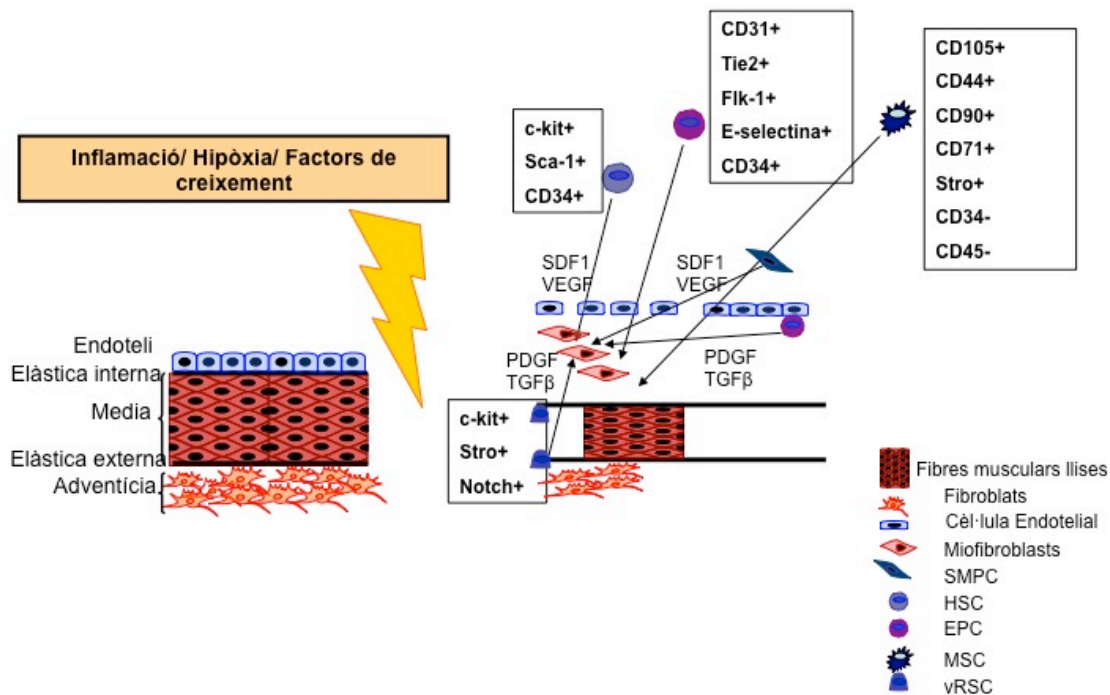


Figura 3. Esquema representatiu de la implicació dels diferents tipus de progenitors durant el remodelat vascular.

2.4 Transició de la cèl·lula endotelial a cèl·lula muscular llisa

Les cèl·lules endotelials poden contribuir al remodelat vascular pulmonar a través d'un procés anomenat transició de la CE a cèl·lula mesenquimal (*Endothelial to mesenchymal transition* (EnMT)). L'EnMT és un procés caracteritzat per l'adquisició per part de l'endoteli d'un fenotip mesenquimal and propietats progenitores degut a causes externes o intrínseques a l'endoteli. En aquest procés es produeix una transdiferenciació de la CE cap un fenotip miofibroblàstic o *SM-like cell*.

Arciniegas *et al* (Arciniegas et al., 1992), primer *in vitro*, van demostrar la capacitat de la cèl·lula endotelial en adquirir propietats mesenquimals amb l'expressió de α -SMA i més endavant va descriure la seva implicació en el remodelat vascular i la HP (Arciniegas et al., 2007b). Diversos factors, que són alliberats en condicions de dany

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

vascular, com el factor de creixement transformant β (*Transforming growth factor* β (TGF- β)), el factor de creixement de fibroblasts 2 (*fibroblast growth factor 2* (FGF-2)), factor de creixement de l'epidermis (*epidermis growth factor* (EGF)), factor de creixement de hepatòcits (*hepatocyte growth factor* (HGF)), estimulaven la transdiferenciació de la cèl·lula endotelial cap a un fenotip mesenquimal (Arciniegas et al., 2007b).

Més recentment, les cèl·lules de la íntima s'ha vist que coexpressen marcadors endotelials com CD31 i *von Willebrand factor* (vWF) amb α -SMA i la SM-MHC demostrant l'origen endotelial d'aquestes cèl·lules (Qiao et al., 2014) (Frid et al., 2002). Aquest punt ha estat directament demostrat en els treballs de Ranchoux i Good on en un model animal murí d'hipertensió pulmonar es trobaven cèl·lules vWF+/ α -SMA+ en la íntima engruixida (Good et al., 2015) (Ranchoux et al., 2015).

A continuació, a la figura 4 es detalla un resum dels diferents tipus cel·lulars que intervenen en l'engruiximent de la íntima:

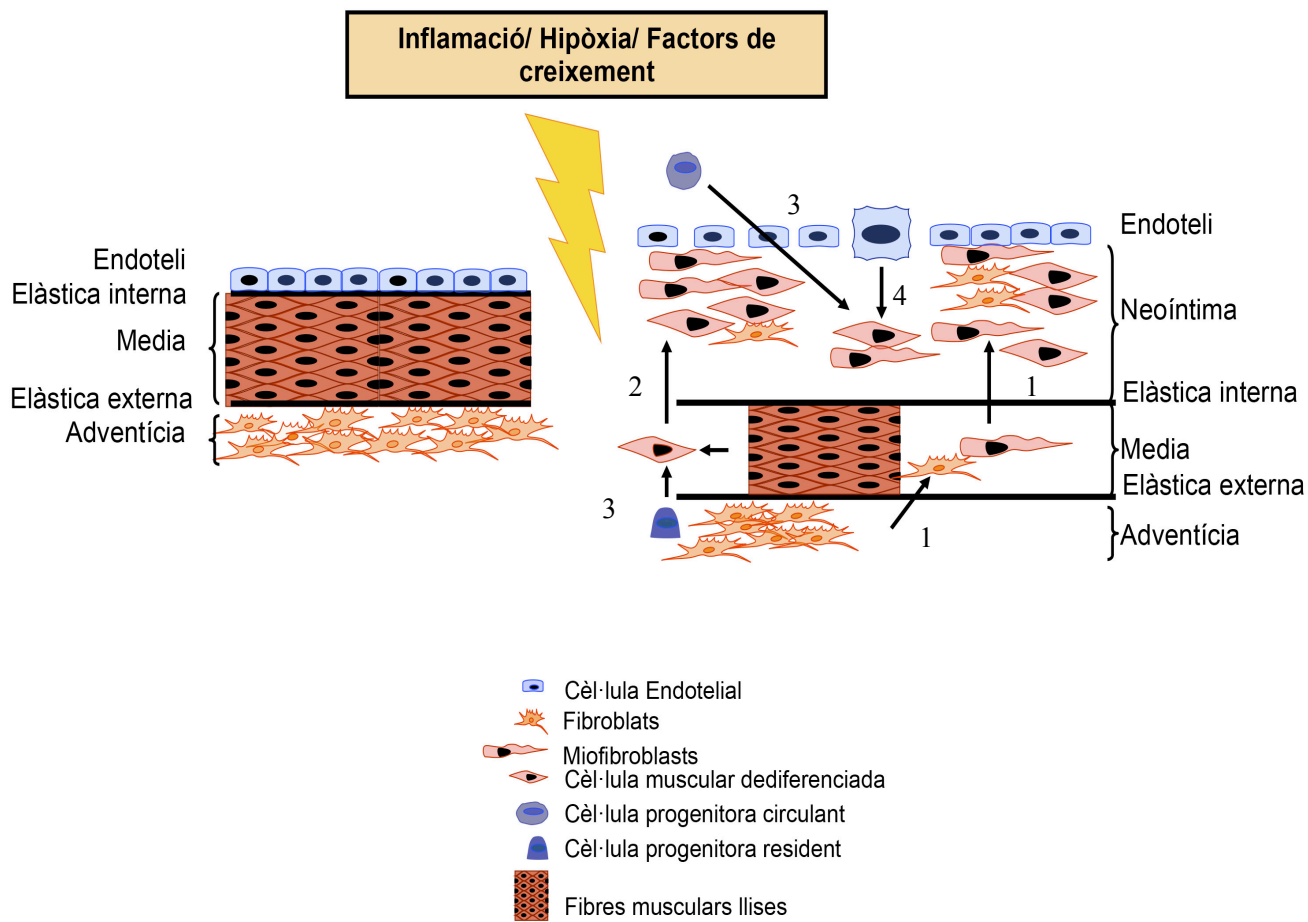


Figura 4. Esquema de la teoria cel·lular del remodelat vascular.

1. Activació dels fibroblastes residents a l'adventícia
2. Dediferenciació de la SMC de la mèdia
3. Progenitores circulants i residents
4. EnMT

3. Principals mecanismes moleculars implicats en el remodelat vascular pulmonar

El remodelat vascular pulmonar és el resultat d'un procés angiogènic patològic que provoca un desequilibri de factors a favor de la proliferació i la migració de SMC cap a la íntima arterial. Això determina que l'estudi de la homeòstasi de la SMC sigui essencial.

3.1 La SMC

La principal funció de la SMC vascular a l'individu adult és la de contracció i relaxació dels vasos sanguinis, però en moltes malalties vasculars aquestes pateixen canvis estructurals i de funció. Durant les fases primerenques de la vasculogènesi, és a dir, durant la formació dels vasos en la embriogènesi, la SMC i les seves progenitores, són altament proliferatives i migratòries. A l'individu adult, la SMC passa a ser quiescent i expressa un llarg nombre de proteïnes contràctils com la transgelina (Sm22- α), la Calponina o SM-MHC, proteïnes implicades en la regulació del calci i proteïnes implicades en la transducció del senyal necessàries per la contracció (Owens et al., 2004) (Owens, 1995). La proteïna més restrictiva en el llinatge muscular sembla ser la SM-MHC, tot i que les SMC arterials també expressen proteïna preferencialment expressada a l'aorta tipus 1 (*Aortic preferentially expressed gene 1* (APEG-1)) i proteïna rica en cisteïna i glicina tipus 2 (*Cystein And Glycine Rich Protein 2* (CGRP2)) (Kumar and Owens, 2003).

3.1.1. Regulació molecular de la diferenciació de la SMC

Existeixen diferents seqüències o *boxes* descrites als promotors dels gens contràctils indispensables per la regulació de la diferenciació de la SMC:

- La via *SRF/CARG* boxes: És la via principal que intervé en la regulació de la diferenciació. L'expressió de tots els marcadors de SMC madura depenen d'un o més elements responedors de sèrum (*serum response elements* (SER)) que reconeixen *CARG boxes* (CC(AT)₆GG) als seus promotors/*enhancers*. Específicament, el factor responedor de sèrum (*serum response factor* (SRF)) actua conjuntament amb altres cofactors

específics de SMC i n'és el principal modulador, sense ell no hi ha expressió de proteïnes contràctils (Owens et al., 2004). Existeixen diferents cofactors, alguns dels més importants són el factor augmentador de miòcits (*myocyte enhancer factor-2* (MEF2)) o els pertanyents a la família de la miocardina (MyoCD) com MRTF-A i MRTF-B i la pròpia MyoCD (Han et al., 2004). *SRF* interacciona amb la MyoCD i activa promotors com el de la Calponina, SM-MHC, α -SMA o la Sm22- α (Wang et al., 2001) (Chen et al., 2002). Mutacions selectives en la regió SRF del promotor de la SM-MHC (Manabe and Owens, 2001), α -SMA (Mack and Owens, 1999) i Sm22- α (Qiu and Li, 2002) inactiven els promotors i bloquejant la diferenciació.

- Els TCE (*TGF β control elements*): TGF β -1 s'ha demostrat que és un factor inductor de la diferenciació de SMC (Ross, 1993) (Wang et al., 2011). TGF β -1 augmenta l'expressió de *SRF*, el seu reclutament a les *CARG* boxes, i als *TCE*, augmentant així l'expressió de marcadors de diferenciació com la α -SMA, SM-MHC, Calponina i Sm22- α (Adam et al., 2000) (Hautmann et al., 1997) (Hirschi et al., 2002).
- Les *E-boxes* s'han trobat a diversos promotors de gens específics de SMC. A les *E-boxes* (CannTG) s'uneixen en forma de homodímer o heterodímer membres de la família de les *bHLH* (*basic-helix-loop-helix*). S'ha vist que aquests membres activen miogènesi de múscul esquelètic i altres programes de diferenciació cel·lular a altres tipus cel·lulars mitjançant MyoD. (Weintraub et al., 1989) (Atchley and Fitch, 1997) (Soleimani et al., 2012). A nivell de la SMC, intervenen en la diferenciació regulant gens de SMC, com la SM-MHC (Seward et al., 2001) o la Sm22- α (Osborn et al., 1995). S'ha demostrat que al promotor de la α -SMA existeixen dos *E-boxes* on s'uneixen les *bHLH* E12/E47 (Kumar et al., 2003), i que a més, interaccionen amb *SRF* promovent l'expressió dels marcadors de diferenciació de SMC (Kawai-Kowase et al., 2005). Existeixen també factors reguladors de les *bHLH*,

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

com la proteïna estimuladora (protein upstream stimulatory factor (USF)) que activa transcripció de gens contràctils (Johnson and Owens, 1999).

- Els factors de transcripció GATA, són del tipus dits de zinc que interaccionen amb elements reguladors amb seqüència A/T GATA A/G (WGATAR) (Durocher and Nemer, 1998). El GATA-4/5/6 són essencials per al desenvolupament del sistema cardiovascular, però només GATA6 s'expressa a la SMC de la mèdia i promou l'expressió de SM-MHC, α -SMA i Calponina (Morrisey et al., 1996) (Mano et al., 1999).

A continuació, a la figura 5 es detalla un esquema de les caixes o *boxes* que intervenen en la regulació dels gens contràctils:

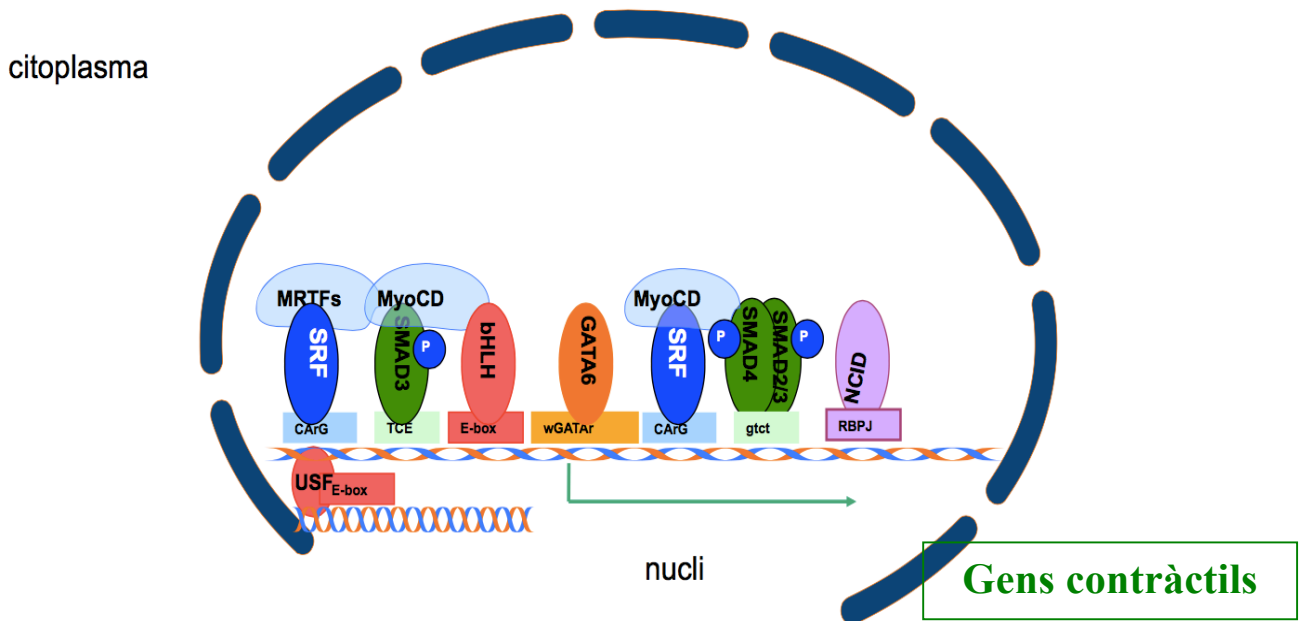


Figura 5. Esquema representatiu dels factors transcripcionals que intervenen en la diferenciació de la SMC. Trobem les *CarG boxes* que estan ocupades per SRF i els seus cofactors MRTF/MyoCD. Els TCE estan ocupats per factors com les proteïnes SMADS activades mitjançant la unió de cofactors com la MyoCD. A les *E-boxes* trobem units activadors de la família de les *bHLH* i *USF*. També trobem GATA6 unit a la regió GATA.

3.1.2 Modulació fenotípica de la SMC

La SMC mostra una plasticitat elevada per canviar d'un fenotip madur/contràctil, característic del vas en l'adult, a un fenotip proliferatiu/dediferenciat, característic del remodelat vascular pulmonar. Aquesta modulació es produeix sota l'estimulació per diferents factors de creixement o inhibidors com estrès mecànic, contacte cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu o mediadors inflamatoris. Després de patir un dany vascular es produeix un increment de mediadors que alteren el fenotip de la SMC, promovent la transició al fenotip proliferatiu i sintètic. Una cèl·lula muscular dediferenciada/sintètica es caracteritza per una alta capacitat de migració, alta taxa de proliferació, alta activitat sintètica de components de matriu extracel·lular com col·làgen, elastina, proteoglicans, cadherines o integrines. Tanmateix, una cèl·lula diferenciada expressa gran quantitat de proteïnes, receptors i molècules de senyalització implicades en la contracció, una baixa taxa de proliferació i una baixa activitat sintètica. (Owens et al., 2004) (Owens, 1995) (Figura 6).

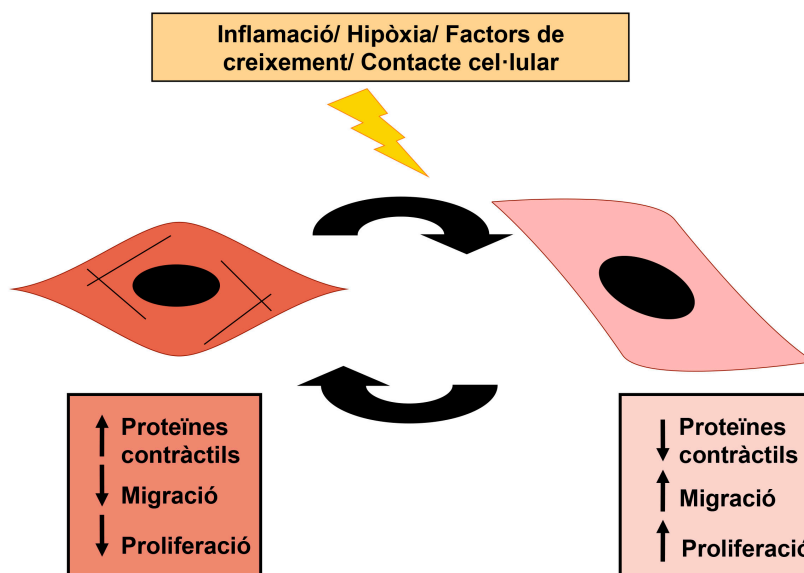


Figura 6 . Característiques de cada fenotip durant la modulació fenotípica de la SMC. Fenotip diferenciada/contràctil a l'esquerra i el fenotip dediferenciada/proliferatiu a la dreta.

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

La majoria de marcadors de SMC madura tenen als seus promotors més d'una *CArG*, *TCE*, *E-boxes* (explicats en l'apartat 3.1.1) i altres caixes properes als seus promotors que actuen cooperativament promovent la transcripció de gens contràctils. La modulació fenotípica de la SMC, però, no només es el resultat de la manca d'activació i la pèrdua d'aquests signes positius, sinó també una repressió controlada d'altres vies (Kawai-Kowase and Owens, 2007).

Un dels més estudiats és la família de repressors *Kruppel like zinc finger factors* (KLF) com KLF4 o KLF5. KLF4 és un factor de transcripció de la família dels posseïdors dels dits de zinc com a dominis d'unió a l'ADN, que juga un paper important en la diferenciació i la proliferació cel·lular (Bieker, 2001) (Katz et al., 2002) (Aksoy et al., 2014) (Yoshida et al., 2010). A nivell de la SMC, aquest factor regula negativament la diferenciació de SMC, tan *in vitro*, com *in vivo* (Yoshida et al., 2008). KLF4 es troba absent a la SMC diferenciada i després d'un dany vascular és capaç d'inhibir l'expressió de MyoCD, Sm22- α (Yoshida et al., 2008) (Salmon et al., 2012) (Wang et al., 2011) (Liu et al., 2005) o els cofactors MRTFA/B (Yoshida et al., 2007). Específicament, KLF4 inhibeix la interacció de MyoCD amb el SRF i s'uneix a les TCE impedit la seva activació (Liu et al., 2005) (Shankman et al., 2015).

Prop dels promotors dels gens contràctils també existeix la regió repressora rica en G/C. S'ha demostrat que les mutacions en aquesta zona provoquen una disminució de Sm22- α (Yamamura et al., 1997). També KLF4 s'uneix a aquesta regió i pot actuar reprimint l'expressió de sm22- α (Salmon et al., 2012) o MyoCD (Liu et al., 2005).

Seguidament, a la figura 7 es detalla un esquema de les caixes o *boxes* que intervenen en la modulació fenotípica de la SMC:

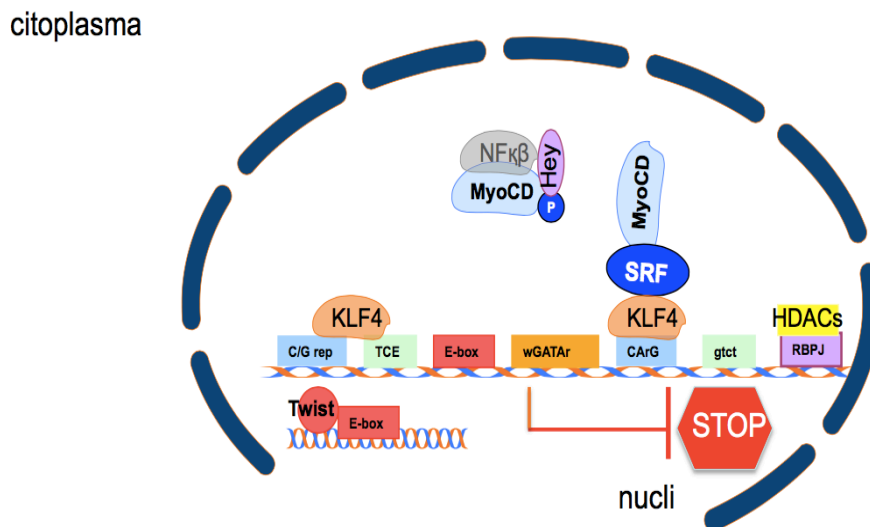


Figura 7. Esquema dels canvis que intervenen en regulació transcripcional produïts durant la modulació fenotípica de la SMC. KLF4 interacciona amb regions riques en CG, els TCE i les CARG boxes bloquejant l'expressió de gens contràctils.

3.2 La EC

3.2.1 Transició de la cèl·lula endotelial a mesenquimal (EnMT)

Com s'ha explicat anteriorment, la EC també podria estar implicada en el remodelat vascular pulmonar mitjançant EnMT. Els mecanismes implicats en l'EnMT no es coneixen amb tanta exactitud com els mecanismes implicats en la transició de la cèl·lula epitelial a mesenquimal (*epithelial to mesenchymal transition (EMT)*), tot i que se sap, que ambdós processos es troben estretament relacionats i comparteixen vies de senyalització. EMT és el procés mitjançant el qual una cèl·lula epitelial es transforma i adquireix marcadors de cèl·lula mesenquimal adoptant un fenotip proliferatiu i migratori. De la mateixa manera passa amb l'EnMT però, en aquest cas, és la cèl·lula endotelial la qui pateix la transdiferenciació.

L'EMT es va descriure inicialment en el desenvolupament embrionari durant la gastrulació (formació de les capes germinals) i la generació de cèl·lules migratòries de la cresta neural (Thiery et al., 1982) (Hay, 2005). També es relaciona en la reparació tissular, fibrosis i la metastàsis en molts càncers (De Craene and Berx, 2013), (Zeisberg and Kalluri, 2004). És

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

un procés reversible, ja que durant el desenvolupament es generen diferents rondes de EMT/MET (transdiferenciació mesenquimal a epitelial (*mesenchymal epithelial transdiferentiation*)) successives per la formació dels òrgans. A part de la seva implicació durant el desenvolupament, l'EMT té lloc com a resposta fisiològica al dany vascular (Bartis et al., 2014) (Kovacic et al., 2012). Durant aquest procés, les cèl·lules epitelials adquireixen noves funcions cel·lulars: pateixen canvis a nivell de regulació transcripcional, canvis en el citoesquelet, canvis a nivell d'adhesió cel·lular i canvis en la síntesi de components de matriu extracel·lular (Ikenouchi et al., 2003). Les citoqueratines són els filaments intermedis característics de les cèl·lules epitelials. Durant l'EMT la cèl·lula serà reprogramada a expressar vimentina. Aquest i altres canvis en el citoesquelet estaran relacionats amb una activació de la migració (Boettger et al., 2009) (Ikenouchi et al., 2003).

Diferents factors de transcripció com Slug, Snail, Zeb1, Zeb2, Twist, β -catenina i Tcf/LEF s'han vist implicats en aquest procés i s'han descrit com els principals inductors (Kalluri, 2009, p. 20)(Zeisberg and Neilson, 2009)(Cano et al., 2000). Aquests factors regulen la pèrdua de contacte cèl·lula-cèl·lula (*tight junctions*) entre cèl·lules epitelials. Aquest procés s'explica per una disminució de proteïnes com les occludines, claudines i la E-cadherina i un augment de N-cadherina i marcadors mesenquimals (Kalluri and Weinberg, 2009) (Zeisberg and Neilson, 2009). S'ha de mencionar però que, a vegades, existeix una coexpressió dels marcadors mesenquimals i els epitelials. Per això, altres mètodes que s'utilitzen per identificar EMT, és la activació de Slug/Snail, juntament amb la disminució de la E-cadherina.

De forma similar durant l'EnMT el contacte cel·lular entre les EC es perd i aquestes pateixen una reestructuració del citoesquelet. En el cas de la EC es perd l'expressió de VE-cadherina, Tie-1/2, VEGFR1/2, CD31 i augmenten marcadors mesenquimals com α -SMA, col·lagen o vimentina (Figura 8).

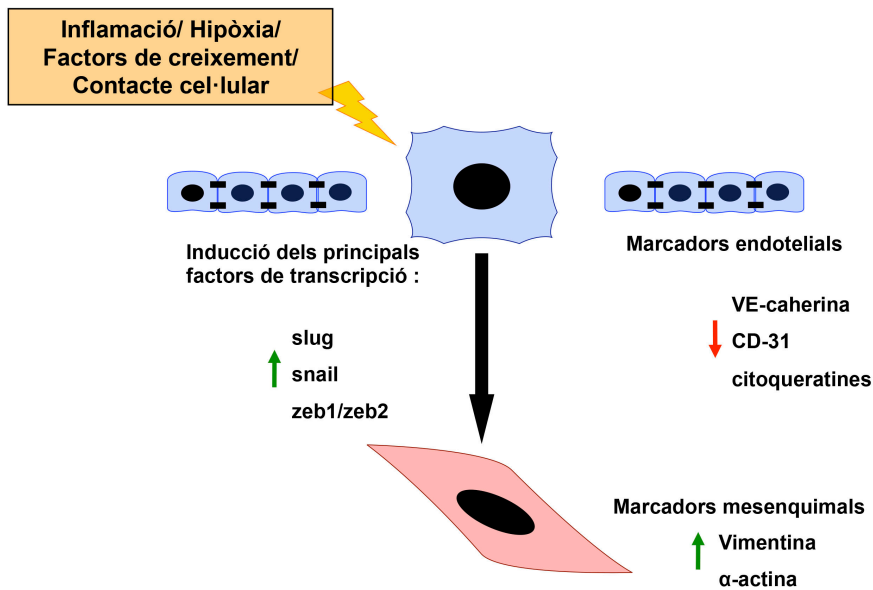


Figura 8. Esquema representatiu de la reestructuració i modificació gènica de la EC durant l'EnMT. Estímuls com la inflamació/hipòxia/factors de creixement indueixen l'expressió dels factors de transcripció Slug/Snail/Zeb1. Aquests dirigiran la reestructuració del citoesquelet amb la disminució de VE-cadherina, queratines i CD-31, i l'augment de vimentina i α -SMA.

3.2.2 Regulació transcripcional: Superfamília d'Snail

3.2.1.1 Característiques generals:

El primer membre de la família Snail, Snail, va ser descrit a *Drosophila Melanogaster*. Aquesta proteïna es va veure que era necessària per la formació del mesoderm. Després, l'expressió de Snail es va detectar en altres espècies, com els humans. La família Snail inclou els factors de transcripció del tipus dits de zinc, com Slug. Estan compostos per una regió carboxil-terminal altament conservada, la qual conté quatre o sis dits de zinc. Aquests dits de zinc són la regió d'unió a l'ADN i estan formats per 2 cadenes β i una hèlix α . Aquests factors de transcripció s'uneixen a *E-boxes*. Slug i altres membres de la família Snail reprimeixen l'expressió mitjançant el reclutament

d'histones deacetilases (HDACS) a les *E-boxes* dels promotors dels seus gens diana (Cobaleda et al., 2007).

Snail i Slug són transportats al nucli mitjançant importines, les quals s'uneixen al senyal de transport nuclear. Mentre que els dos es troben al nucli, només Snail s'ha trobat al citoplasma.

3.2.1.2 Funcions i mecanismes principals:

Estan descrits com a factors de transcripció claus en la morfogènesis, la formació del mesoderm i la cresta neural durant la embriogènesis. També estan descrits com iniciadors de processos de diferenciació cel·lular, supervivència, transició fenotípica i del EMT (Kalluri, 2009)(Thiery et al., 2009)(Tsai and Yang, 2013)(Lamouille et al., 2014) .

Les primeres referències de que Snail i Slug estan involucrats en l'EMT provenen d'estudis fets amb embrions de pollastre. La inhibició de Slug en aquests embrions va provocar una manca de laminació de la cresta neural i el mesoderm (Nieto et al., 1994). D'altra banda, un augment de l'expressió de Slug va provocar un increment en la formació de cresta neural en l'embrió de pollastre. Snail i Slug també s'observen en altres cèl·lules que pateixen EMT durant el desenvolupament de l'embrió: com la decondensació dels somites, la formació de l'endoderm o la formació del cor (del Barrio and Nieto, 2002) (Sefton et al., 1998).

Slug i Snail tenen moltes altres funcions descrites. La que s'ha estudiat més extensament és que Slug actua de repressor de la E-caherina (Cano et al., 2000) (Batlle et al., 2000). La pèrdua d'expressió de la E-caherina promou l'eliminació del component més important de les unions intercel·lulars *tight junctions*, promovent l'EMT. La E-cadherina no és l'única diana directa. S'han descrit altres molècules d'adhesió com les claudines (Martínez-Estrada et al., 2006) o les citoqueratines (Tripathi et al., 2005).

Altres estudis evidencien el paper de Slug com a regulador de la diferenciació cel·lular. En un estudi en l'epidermis de ratolí, canvis d'expressió de Slug van ser relacionats amb canvis en la diferenciació de les cèl·lules de l'epidermis, canvis en la apoptosi, proliferació

INTRODUCCIÓ

i motilitat (Newkirk et al., 2008). En un altre treball dut a terme amb fibroblastes embrionics es va relacionar l'augment de l'expressió Slug amb gens de renovació cel·lular, EMT, supervivència i cicle cel·lular (Bermejo-Rodríguez et al., 2006).

Soleimani *et al* van descriure el rol de Slug en la diferenciació de múscul esquelètic. Van demostrar que aquest factor de transcripció reprimeix la diferenciació dels mioblasts (cèl·lules progenitores de múscul esquelètic) i cèl·lules mesenquimals. A més, en mantenia l'estat dediferenciat (Soleimani et al., 2012) (Torreggiani et al., 2012). En un altre model cel·lular s'ha vist que Slug s'expressa en cèl·lules progenitores de l'epidermis i també en controla el seu estat dediferenciat (Mistry et al., 2014) (Pérez-Losada et al., 2002). L'última publicació en aquest sentit, demostra que Slug regula la proliferació i migració de les cèl·lules progenitores del múscul esquelètic (Tang et al., 2016).

4. Factors iniciadors i moduladors del remodelat vascular

Després d'un dany vascular, hi ha una agregació de plaquetes i una activació de les mateixes que secretaran factors de creixement i citocines. Aquests factors estimularan l'expressió de selectines, que promouran la infiltració de cèl·lules inflamatòries. El reclutament de leucòcits (monòcits i neutròfils) promourà la degradació de la làmina basal de l'endoteli que farà que les SMC entrin en contacte amb les citocines i factors de creixement secretats. Aquests factors podran actuar sols o convergir activant receptors tirosina-quinasa a les cèl·lules vasculars iniciant i promovent el remodelat vascular (Inoue et al., 1998) (Newby, 2005).

4.1 Superfamília dels factors de creixement transformants (TGF)

La via de senyalització de TGF β i la proteïna morfogènica de l'ós (bone morphogenic proteins (BMP)) s'ha vist que són importants en la malaltia cardiovascular, ja que les afectacions en aquestes vies, són essencials per la homeòstasi vascular.

TGF β és una citocina multifuncional, amb tres isoformes les quals modulen processos de diferenciació cel·lular, proliferació, supervivència i apoptosi.

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

TGF β -1 té un paper clau en la inducció de l'expressió de proteïnes contràctils. S'ha demostrat que és un potent inductor de la via SRF/MyoCD tant en la SMC de l'adult com en les etapes embrioniques (Sinha et al., 2004)(Wang et al., 2011). Aquest factor promou l'expressió de SM-MHC, Sm22- α i Calponina gràcies a l'activació de la MyoCD i la via de les proteïnes SMADS (Qiu et al., 2005) (Kurpinski et al., 2010).

Una altre procés en el que està implicat TGF β -1 és l'EnMT, on és un dels principals inductors (Arciniegas et al., 1992). En aquest sentit, en estudis *in vitro* del nostre grup es va demostrar que la via del TGF β -1 juga un paper clau en la migració i diferenciació de les EPC a *SM-like* contribuint al remodelat vascular. La inhibició del TGF β R1 en cocultius amb SMC aboleix la transdiferenciació d'aquestes cèl·lules afavorint el paper reparador (Díez et al., 2010). TGF β -1 té una funció dual: per una banda, activa l'acció de diferents metal·loproteïnases (MMP) com MMP1, MMP2, MMP9 que incrementaran la migració i la invasió de la matriu extracel·lular de les cèl·lules endotelials (Welch-Reardon et al., 2014); i per a l'altra, també activa la via de les proteïnes SMADS, que interaccionen amb les MRTFs, afavorint la transcripció de filaments intermedis i promovent la reorganització del citoesquelet (Arciniegas et al., 1992)(Cooley et al., 2014).

BMP: proteïna membre de la superfamília TGF. Durant el desenvolupament, les BMPs controlen processos com la miogènesi cardíaca i la vasculogènesi (Moser and Patterson, 2005).

Les mutacions en la línia germinal del receptor de les BMP tipus 2 (*bone morphogenic receptor 2* (BMPR2)), són la conseqüència de la majoria de casos de la hipertensió arterial pulmonar familiar (HAPf) (Atkinson et al., 2002). Específicament, hi ha nombrosos treballs que la seva disminució o mutacions en el receptor BMPR2 han estat relacionades amb la hiperplàsia de la íntima en la HAP (Hong et al., 2008) (Maruyama et al., 2015). S'ha demostrat que l'activació de BMPR2 intervé en la modulació fenotípica de la SMC promovent i mantenint el fenotip contràctil (Caruso et al., 2012) (Davis et al., 2008). Específicament, s'ha demostrat que la via de les BMPs activa la transcripció de

INTRODUCCIÓ

proteïnes contràctils mitjançant la translocació a nucli dels cofactors MRTFA i MRTB, els quals s'uneixen a les CARG (Lagna et al., 2007) (Caruso et al., 2012).

La via del BMPR2 també s'ha vist relacionada amb l'EnMT. Es va demostrar que mutacions en BMPR2 estaven lligades a la transició de cèl·lula endotelial a muscular afavorint el remodelat vascular pulmonar (Ranchoux et al., 2015).

4.2 PDGF

PDGF és un factor de creixement secretat per les plaquetes, encara que també pot ser secretat per les cèl·lules endotelials. Existeixen diferents isoformes (PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD), i els heterodímers d'aquestes isoformes (PDGFAA, PDGFBB, PDGFAB etc).

L'expressió del lligand de PDGFB i el seu receptor s'han trobat augmentats en pacients amb HAP (Perros et al., 2008). A més, la inhibició d'aquesta via en un model murí va tenir un efecte antiremodelat (Ten Freyhaus et al., 2015). Després d'un dany vascular es produeix una activació de PDGFB, que provocarà la modulació fenotípica de la SMC, promovent l'expressió de repressors com el KLF4 (Ali et al., 2013). KLF4 s'uneix cooperativament a Elk1 (Salmon et al., 2012) i la proteïna específica 1 (*Specific protein 1* (Sp1) (Deaton et al., 2009), un factor de transcripció que actua de repressor de SM-MHC. Altres repressors activats per aquesta via són les proteïnes *Forkhead Box* (FOXO) que actuen afavorint la dediferenciació i el remodelat (Abid et al., 2005). A la mateixa vegada, KLF5 estimula l'expressió del receptor de PDGF, la qual cosa amplificarà la resposta hiperplàsica (Nagai et al., 2005).

4.3 Notch

Notch està compost per diferents proteïnes transmembrana (Notch1, Notch2, Notch3 i Notch4) que comparteixen un domini extracel·lular amb múltiples repeticions del EGF i cinc dominis intercel·lular (Jagged 1, Jagged 2 i les proteïnes delta 1,3 i 4). La senyalització mitjançant Notch regula processos de diferenciació cel·lular i canvis de

fenotip en molts models cel·lulars. Notch 3 és la forma que s'expressa de manera majoritària a la SMC.

L'activació de la via de Notch s'ha vist indispensable pel desenvolupament de la SMC vascular a la cresta neural (High et al., 2007). Els primers articles que descriuen el paper de Notch a la cèl·lula muscular llisa, relacionen aquesta via com a via promotora de la diferenciació de la SMC (Doi et al., 2006). S'ha demostrat que el domini intercel·lular de Notch (*notch intracel·lular domain* (NICD)) podria interaccionar amb la proteïna d'unió de recombinació per la immunoglobulina Kappa J (*Recombination signal Binding protein for immunoglobulin kappa J region* (RBPJ)). Aleshores s'activaria el programa de diferenciació muscular amb un increment d'expressió de α -SMA, tant a la SMC com a la EC (Nosedá et al., 2006), i altres gens de diferenciació com la SM-MHC (Doi et al., 2006).

Existeix també una interacció entre Notch4 i la via de TGF β -1. Ambdós vies actuen cooperativament modulant la diferenciació a SMC, ja que Jagged 1 podria estimular les proteïnes SMAD que s'uniran als promotors de la α -SMA, Calponina i Sm22- α per activar-los (Tang et al., 2010).

Altres estudis, però, relacionen l'expressió de Notch amb la formació de neoíntima després d'un dany vascular (Li et al., 2009) (Redmond et al., 2014). S'ha vist que estimula un increment de proliferació i migració de les SMC (Ozasa et al., 2013). Específicament, es va demostrar que Notch pot inhibir la diferenciació mitjançant la via CBPF-1/RBP ja que inhibeix la MyoCD mitjançant l'expressió dels repressors Hey1 i Hey2 (Morrow et al., 2005) (Proweller et al., 2005). Tot i que el mecanisme no està del tot clar, es creu que inicialment Notch estimularia el fenotip contràctil de la SMC. Una mica més tard, i amb l'augment dels nivells dels repressors Heys, s'inhibiria la diferenciació (Y. Tang et al., 2008).

Les proteïnes de Notch també s'activen durant l'EnMT (Nosedá et al., 2004) (Iso et al., 2003). A la EC promou l'expressió de α -SMA (Nosedá et al., 2006) i la transdiferenciació de les cèl·lules progenitores circulants a *SM-like cells* (Doi et al., 2009).

4.4 Inflamació i quemoquines

La inflamació vascular juga un paper clau en la patogènesis de diferents malalties cardiovasculars. Els pulmons poden ser uns dels majors inductors de inflamació, ja que constantment estan exposats a partícules externes com la pol·lució i el fum del tabac (Hansson, 2005). Múltiples vies són activades per processos inflamatoris i contribueixen al desenvolupament de la HP, MPOC i altres malalties vasculars (Thunström et al., 2015) (Joppa et al., 2006).

En estudis previs del nostre grup es va demostrar que cèl·lules inflamatòries infiltraven a l'adventícia de les artèries pulmonars (Peinado et al., 1999). Nivells alts d'interleucina 6 (IL-6), factor de necrosi tumoral α (TNF- α) i interleucina 1 β (IL1- β) correlacionen amb la HP i amb els pacients amb MPOC (Domínguez-Fandos et al., 2012)(Chaouat et al., 2009)(Pizarro et al., 2014).

Algunes citocines s'han vist relacionades amb la modulació fenotípica de la SMC. IL1- β s'ha vist que bloqueja la diferenciació de la SMC promovent el fenotip sintètic d'aquestes cèl·lules (Alexander et al., 2012). Aquesta citocina és capaç de reprimir la MyoCD via KLF4 (Yoshida et al., 2013).

TNF- α també s'ha vist molt estretament relacionat amb la patologia vascular i la hiperplàsia de la íntima (Barath et al., 1990) (Pizarro et al., 2014). S'ha demostrat que és capaç d'induir la modulació fenotípica de la SMC als vasos cerebrals a través de l'activació de KLF4 (Ali et al., 2013). Un altre dels factors de transcripció estimulats per ambients inflamatoris, com el factor nuclear potenciador de las cadenes lleugeres kappa de las cèl·lules B activades (nuclear factor kappa- beta (NFk- β)), s'ha demostrat que es capaç d'inhibir la MyoCD (R.-H. Tang et al., 2008).

A la cèl·lula endotelial, s'ha demostrat que diferents citocines inflamatòries, IL1- β i TNF- α indueixen transdiferenciació de la cèl·lula endotelial a *SM-like cell*, promovent la migració i expressió de α -SMA d'aquestes cèl·lules (Rieder et al., 2011) (Fleenor et al., 2012) (Romero et al., 1997).

4.5 Hipòxia

La hipòxia ve definida com un dèficit d'aport d'oxigen als teixits. Un nombre important de malalties pulmonars estan associades amb la presència d'hipoxèmia crònica, com la MPOC (Stenmark et al., 2006b).

La hipòxia és una de les principals promotores del desenvolupament de remodelat vascular pulmonar. S'ha observat que persones que viuen a grans alçades pateixen HAP. En aquestes persones s'ha observat un increment de cèl·lules α -SMA positives a la paret vascular (Aldashev et al., 2002). Aquest engruiximent, però, és produït majoritàriament a la mèdia i difereix del produït per lesions vascular, on es produeix principalment una hiperproliferació a la íntima de les artèries (Stenmark et al., 2006b).

Es coneix que la hipòxia pot estimular la producció de citocines i juntament amb l'estrès mecànic estimula una cascada intercel·lular de MAPK, PI3K, SMADs, Rho quinases que modularan la contractibilitat de la SMC, el seu creixement i la producció de matriu extracel·lular (Stenmark et al., 2006b). La hipòxia, a més, pot induir la modulació fenotípica de la SMC promovent canvis en la proliferació i la migració d'aquestes cèl·lules (Peng et al., 2014). D'una banda, s'activen mecanismes dependents de cGMP (Zhou et al., 2009) (Yi et al., 2012) i per l'altra mecanismes que regulen l'expressió del factor induït per hipòxia (*hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1 α)). Aquest factor de transcripció s'expressa ubiquament només en condicions d'hipòxia i modula diferents respostes com la proliferació, la supervivència, el metabolisme, la inflamació, la angiogènesi i la fibrosi. HIF-1 α sembla ser un dels principals inductors del remodelat de la mèdia i s'ha demostrat que la seva supressió pot exercir un paper anti-remodelat (Imanishi et al., 2014) (Shan et al., 2014).

INTRODUCCIÓ

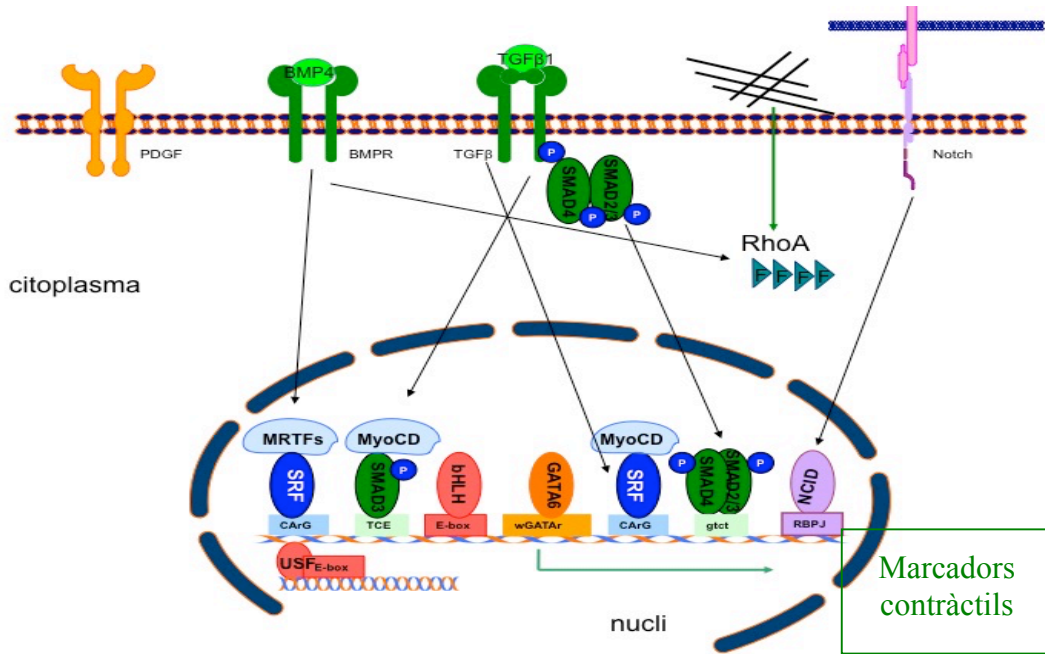
A nivell dels fibroblastes de l'adventícia, s'ha demostrat que la hipòxia pot induir expressió de α -SMA, promovent la diferenciació a miofibroblasts que migraran a la íntima (Misra et al., 2010).

A la cèl·lula endotelial, per la seva banda, la hipòxia estimula la formació d'espais subendotelials que provoquen un augment de l'extravasació de cèl·lules inflamatòries, a més, de l'augment de producció de laminines i fibronectines, elastina i menys proteoglicans que afectaran a la funció de la SMC, estimulant-ne el creixement (Rabinovitch, 2001). La hipòxia, a més, pot promoure la transdiferenciació de les cèl·lules endotelials mitjançant l'expressió de la MyoCD, que estimularà l'expressió de α -SMA (Zhu et al., 2006) (Good et al., 2015). Les cèl·lules progenitores també poden transdiferenciar-se a SMC sota estímuls d'hipòxia (Dong et al., 2011).

Seguidament, a la figura 9, es detallen les vies moleculars que intervenen en la modulació fenotípica de la SMC durant en remodelat vascular pulmonar.

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

SMC diferenciada



SMC dediferenciada

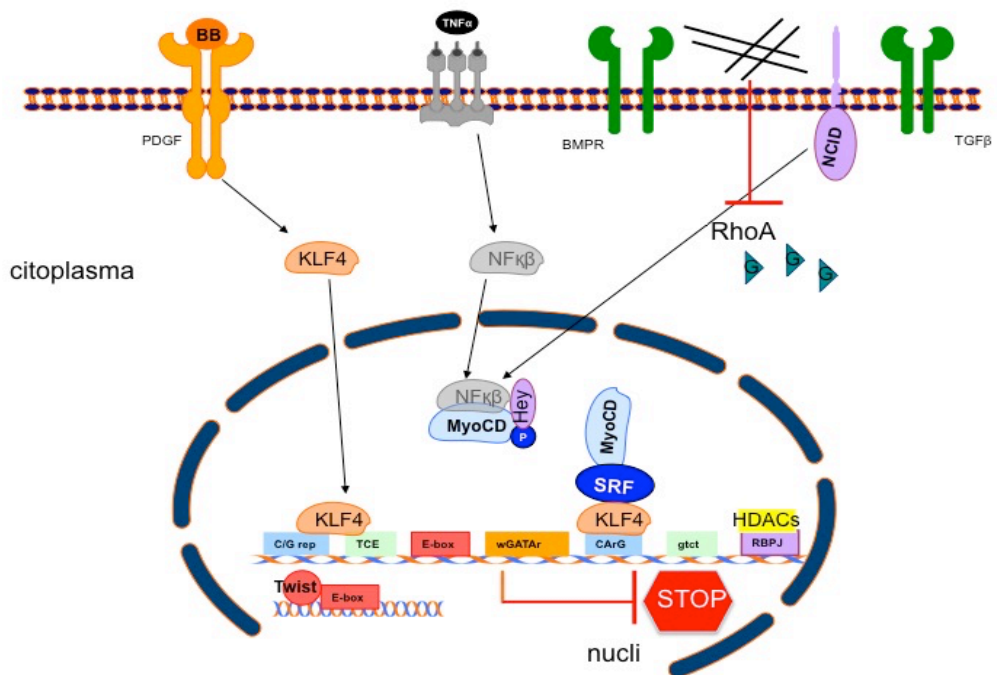


Figura 9. Esquema de les vies que s'activen durant la diferenciació i la modulació fenotípica de la SMC. A dalt, activació de la via de les BMPs, TGF-β i Notch induïent activant l'expressió dels gens contràctils. A la imatge inferior, activació de PDGF-B-KLF4 i NFκβ afavorint el canvi fenotípic de la SMC.

5. Epigenètica i malaltia: els microARNs com a reguladors post-transcripcionals

En els últims anys s'han fet grans avenços en l'anàlisi del transcriptoma. Un d'ells ha estat el projecte ENCODE, un programa consorci, que va permetre descriure diferents tipus de ARNs no codificants de proteïnes (ncARNs). Aproximadament, el 98% de tots els ARNs transcrits són ncARNs i actuen com a reguladors transcripcionals. Els ncARNs es divideixen en els petits ncARNs (menys de 200nt) i els llargs ncARNs (més de 200 nucleòtids (nt)). La família més ben caracteritzada dels ncARNs són els microARNs (miRNAs) (Jacquier, 2009) (Ghildiyal and Zamore, 2009). Els miRNAs modulen l'expressió d'aproximadament del 30% de tots els gens codificants per proteïnes (Berezikov, 2011)(Lewis et al., 2005).

Els miRNA són un tipus de petits ARNs no codificants endògens conservats en el procés evolutiu i, en general, d'uns 21 nucleòtids de longitud. Aquests ARNs regulen la seva pròpia expressió i la de gens codificants: promouen la degradació de l'ARNm diana o bé la supressió de traducció (Ambros, 2004) (He and Hannon, 2004). En la majoria dels mamífers, els miRNAs s'uneixen de forma imperfecta i no totalment complementària als extrems 3'UTR dels seus gens diana. Existeix, però, una seqüència anomenada *seed sequence* (2-8 nucleòtids) que és essencial pel reconeixement del gen diana, tenint en compte que la unió d'aquests nucleòtids ha de ser totalment complementària (Lewis et al., 2005). Bartel *et al* van descriure que la unió de la *seed sequence* ha de seguir les lleis d'aparellament Watson i Crick, és a dir, unions canòniques. D'altra banda, s'han descrit unions imperfectes i formant petits *loops* que segueixen interaccions no canòniques i no basades en llei de Watson i Crick (Lal et al., 2009).

Els primers miRNA que es van descriure van ser *lin4* i *let7*, com a components del control de l'expressió gènica en el desenvolupament de la larva de *C.elegans* (Lee et al., 1993) (Wightman et al., 1993) (Moss et al., 1997). Les principals funcions dels miRNAs són regular l'expressió gènica en processos de diferenciació, l'apoptosis, la proliferació i el metabolisme (Albinsson et al., 2010) (Alvarez-Garcia and Miska, 2005). Per això, els miRNA s'han pogut relacionar com a moduladors i/o inductors de diferents patologies humanes (Guil and Esteller, 2009).

La majoria de miRNAs són codificats de manera policistrònica o bicistrònica, és a dir, es poden generar diversos miRNAs a partir d'un únic gen (Bartel, 2004). Segons el seu lloc de transcripció, es classifiquen en miRNAs intergènics (en regions externes a gens codificadors) o intragènics (regions ubicades dins de gens codificadors de proteïnes). Aquests últims inclouen els miRNAs intrònics i exònics (Baskerville and Bartel, 2005) (Rodriguez et al., 2004). Estudis recents mostren que la majoria de miRNAs exònics i intrònics expressats es regulen de la mateixa manera que el gen al que ells mateixos regulen.

5.1 Biogènesi i funció dels miRNA

Tal i com passa amb els gens codificadors de proteïnes, l'expressió, el processament i la funció de cada miRNA, és regulada per factors de transcripció, modificacions epigenètiques i per proteïnes específiques de la via dels miRNAs, estrès cel·lular i determinats factors de creixement (Lee et al., 2004).

L'ARN polimerasa II transcriu un ARN primari (pri-miRNA), el qual pot incloure un o més miRNAs. El pri-miRNA és processat per l'endonucleasa Drosha, una ribonucleasa de tipus III i el seu cofactor *DiGorge* (DGCR8), a un intermediari pre-miRNA (*stem-loop* amb un aparellament de bases imperfectes). Aquest pre-miRNA és transportat cap al citoplasma a través de la exportina 5/Ran. Al citoplasma, el *loop* o superenrotllament de l'ARN és fragmentat pel Dicer I (una ribonucleasa tipus III) associada a la proteïna TAR (*Immunodeficiency virus transactivació response element*) i la proteïna d'unió al ARN tipus 2 que formaran un miRNA de doble cadena. Hi ha alguns miRNAs que són independents de Dicer. Aquest processament de l'ARN de doble cadena està format per la cadena guia o *guide-strand* (miRNA-5p) i la cadena acompanyadora o *passenger strand* (miRNA-3p). Posteriorment, el complex proteic Argonata (Ago2) interacciona amb el miRNA i es formarà el miRISC (*miRNA induced silencing complex*) el qual és l'encarregat d'orientar el miRNA madur a l'extrem 3'UTR dl'ARNm diana (Bartel, 2004) (Figura 10). Els miRISC es concentren en grànuls citoplasmàtics (*GW/p-bodies*) des d'on exerciran la seva funció inhibidora.

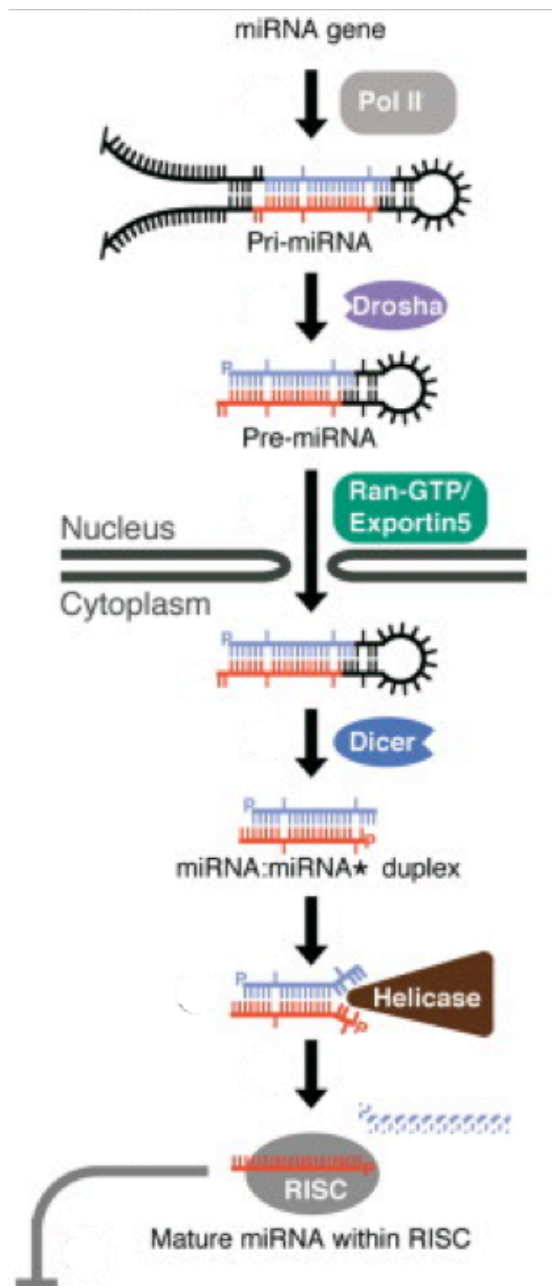


Figura 10. Esquema de la biogènesi dels miRNAs. *Nature Reviews Genetics* 5, 522-531 (July 2004)

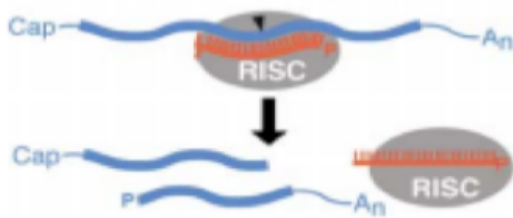
Els miRNAs poden exercir la seva funció repressora de diferents maneres:

1. Fragmentació d'ARNm diana

Després d'un aparellament perfecte entre RISC i ARNm es produirà un tall de l'ARNm entre la posició 10 i 11. Després de la fragmentació, el complex romandrà intacte i

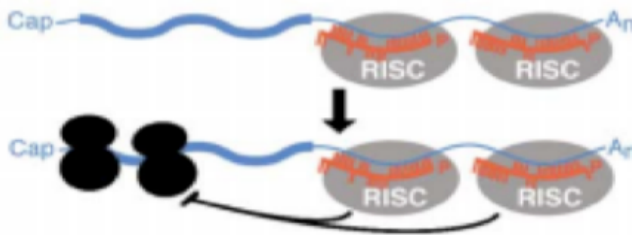
Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

procedirà a la destrucció d'altres ARNm diana (Elbashir et al., 2001) (Hutvagner and Zamore, 2002) .



Fragmentació de l'ARNm diana per complementarietat total del miRNA amb l'ARNm

2. Repressió de la traducció



Repressió de la traducció per un miRNA per aparellament de bases imperfecte.

2.1 Repressió del estat inicial de la traducció

Existeixen factors que s'uneixen al extrem 3'UTR, específicament al m7cap, i exerceixen la inhibició de la traducció reclutant proteïnes que interfereixen en la unió de eIF4E i eIF4G (factors implicats en el reclutament de ribosomes per iniciar la traducció). Ago2 té una seqüència homòloga a la seqüència on s'uneixen el factors eIF4E. Això provoca una competició entre aquests factors. La unió amb l'Ago2 provocarà la inhibició de la traducció (Kiriakidou et al., 2007).

També s'ha vist que el miRNAs promouen deadenilació de la cua poliA (adenines situades de forma seqüencial al extrem dels ARNms) o interfereixen

en la interacció del m7cap amb la cua poliA, la qual cosa promourà una inhibició de la traducció (Wakiyama et al., 2007). Per la deanilació i la posterior degradació dels ARNms intervé una altra proteïna *Tnrc6* (*Trinucleotide repeat containing 6*) que s'uneix directament a una proteïna d'unió de poliAs (*PoliA binding protein*), que reclutarà un complex deadelinasa al extrem 3'UTR promovent la degradació de la cua poliA (Bartel, 2004).

Aquest mecanismes només són vàlids per ARNms que es tradueixen de forma dependent cua poliA i no dependents de IRES (*internal ribosomes entry site*). Els IRES són seqüències en forma de *loop* on el ribosoma s'adhereix per iniciar la traducció.

2.2 Repressió després de la iniciació de la traducció (*drop off model*)

Específic de gens amb traducció mitjançada per IRES. Durant la traducció es formen uns complexos formats per ARNm i més d'un ribosoma anomenats poliribosomes o polisomes. S'ha demostrat que els miRNAs i les proteïnes Agos poden interaccionar amb els polisomes i cosedimentar causant una finalització prematura de la traducció (Kim et al., 2004).

5.2 Estratègies per l'anàlisi funcional dels miRNAs i els seus gens diana

Estudis funcionals indiquen que els miRNAs participen en la regulació de gairebé tots els processos cel·lulars i en la majoria de patologies humanes són descrits canvis en la seva expressió (Bushati and Cohen, 2007)(Kloosterman and Plasterk, 2006)(Guil and Esteller, 2009). Conèixer específicament els processos i els gens diana que regulen esdevé de gran importància en l'estudi de la fisiopatogenia de qualsevol malaltia.

Predicció de dianes

El treball de Stark *et al* 2003 (Stark et al., 2003) és el primer dedicat a l'estudi dels animals on es va predir una llista de gens candidats per un determinat miRNA seguint

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

una combinació de criteris biològics, incloent les relacions funcionals entre les diferents dianes d'un mateix miRNA. Es van validar sis dianes de 2 miRNAs diferents a *Drosophila*.

Més endavant, es van descriure un centenar de dianes d'aquests miRNAs i l'anàlisi computacional i experimental van evidenciar que molts d'ells eren autèntics. Sembla ser, que el fet important és aparellar els 2-8 nucleòtids de la *seed sequence* amb l'ARNm del gen diana. Així doncs aquestes aproximacions només seran capaces de mostrar-nos dianes canòniques. Seguint aquest principi s'han desenvolupat algoritmes com el *TargetScan* (<http://genes.mit.edu>) que combina característiques termodinàmiques de l'ARN basades en les interaccions de diferents ARNs de doble cadena i puntuacions segons nivell de conservació en múltiples genomes de diferents espècies.

Es va desenvolupar també la base de dades *miRBase Targets* (<http://microrna.sanger.ac.uk>). Aquesta base de dades és el principal repositori de seqüències de miRNAs, d'anotació i de predicció dels seus gens diana. A més, assigna els noms dels nous miRNAs descoberts abans que siguin publicats. Totes les seqüències són enfrontades amb els extrems 3'UTR dels gens existents al *Ensembl* des de *Caenorhabditis briggsae* i *Drosophila pseudoobscura* (Hubbard et al., 2005). L'algoritme dissenyat donarà uns valors segons la unió del miRNA a la regió d'unió a l'extrem 3'UTR i la conservació de la seqüència al llarg de l'evolució (Rehmsmeier et al., 2004).

Aquestes bases de dades i repositoris poden donar-nos falsos negatius i positius degut a que no té en compte l'accessibilitat de la *seed sequence*, estructures secundàries de ARN o la proximitat d'unió d'altres miRNAs. Això fa indispensable l'aproximació mitjançant *luciferasa reporter assay*. Aquesta tècnica es basa en la unió del miRNA d'estudi, a un vector amb l'extrem 3'UTR del gen diana d'interès unit a un gen reporter com la luciferasa. La unió de miRNA al seu gen diana es tradueixen en canvis en la senyal del reporter. Tot que aquesta tècnica aporta nova informació sobre noves dianes no sempre es confirmen *in vivo*.

Estudis Funcionals

- Estudis de pèrdua de funció o *Knockouts (KO)*: estudis de mutacions i KO en proteïnes implicades en la biogènesis dels miRNAs, com pot ser Dicer o Drosha, ens donen idea dels efectes d'una deleció global dels miRNAs. Aquesta estratègia pot ser utilitzada per estudis en el desenvolupament o bé ja en l'adult mitjançant el sistema cre-loxP. Aquest sistema es basa en l'acció d'una recombinasa que genera la deleció d'un al·lel en l'adult, fet interessant pel control temporal en l'adult i de teixit específic (Sun and Lai, 2013), ja que evita mortalitats primerenques. La generació de KO per determinar la funcionalitat dels miRNAs és difícil.
- Estudis de guany de funció o *Mimics*: seqüències de doble cadena dissenyades per estimular miRNAs endògens. La introducció de mímics a les cèl·lules incrementa la proporció de miRNAs units a RISC i per tant amplifica la funció del miRNA.
- Inhibidors: s'han desenvolupat, químicament, els antisense oligonucleòtids 2'O-metil ARN complementaris als 8 nucleòtids de la *seed sequence* que podran unir-se per complementarietat al miRNA madur (Hutvagner et al., 2004) (Meister et al., 2004). Típicament, aquests inhibidors són transfectats a les cèl·lules promovent una disminució transitòria del miRNA i produïnt un augment dels seus gens diana.
- Antagomirs: s'utilitzen per silenciar un miRNA específic *in vivo*. Aquests són modificacions dels anteriors afegint un grup colesterol per augmentar la solubilitat (2'O-colesterol metil-fosfotioat) i són complementaris al miRNA d'interès. L'efecte a l'animal s'aconsegueix gràcies a altes dosis d'aquest inhibidor (Krützfeldt et al., 2005).
- Sponges de miRNAs: Aquests consisteixen en un gen reporter unit a seqüències complementàries a múltiples dianes per un miRNA en un plàsmid amb un

promotor fort, provinent de virus normalment. Aquesta tecnologia de les *sponges de miRNA* ha estat desenvolupada per una expressió intracel·lular i per inhibir la funció del miRNA per saturació. Es produeix una alta expressió d'aquestes seqüències que inhibiran ARNm diana per complementaritat i competència al miRNA endogen. Es pot fer transfecció estable o transitòria i és extremadament útil per inhibir famílies de miRNAs que tenen dianes comuns i relacionades en una sola transfecció (Ebert et al., 2007).

6. miRNAs i remodelat vascular

El tabac (Ezzie et al., 2012), la inflamació (Perry et al., 2008) i altres factors (Davis et al., 2009) se sap que indueixen perfils d'expressió específics de miRNAs que intervenen en la homeòstasi a nivell cardiovascular i pulmonar. Aquests poden controlar processos de diferenciació cel·lular de la EC i la SMC afectant a la homeòstasi del vas arterial i exercint un paper clau durant el remodelat vascular pulmonar (Sessa and Hata, 2013)(McDonald et al., 2012)(Ji et al., 2007).

Al sistema respiratori, la primera evidència de la importància dels miRNA, es va demostrar durant el desenvolupament embrionari i formació del pulmó. Un KO de Dicer a ratolí, és a dir, on el processament dels miRNAs estava abolit, va provocar una mort prematura del embrió durant la gastrulació. El KO condicional (utilitzant el sistema Cre-loxP) va esdevenir en una formació del pulmó deficient provocant malformacions de les ramificacions dels vasos i un epitelí disfuncionants (Harris et al., 2006).

Albinson *et al* (Albinsson et al., 2010) van publicar un treball on en un model murí de KO de Dicer en un sistema Cre-LoxP del promotor de Sm22- α , és a dir, durant l'activació del promotor de Sm22- α el processament de miRNAs estava abolit, va resultar en una disminució de la pressió vascular. Aquesta disminució la va demostrar el mateix autor posteriorment, on en els KO de Dicer presentaven una disminució de la pressió arterial, que l'explicava per una disminució de les proteïnes contràctils (Albinsson et al., 2011). Problemes en la diferenciació de la SMC, una formació

INTRODUCCIÓ

anormal dels vasos sanguinis i una hemorràgia interna letal van corroborar el paper indispensable dels miRNAs en la maduració del sistema vascular (Albinsson et al., 2010). Altres treballs s'han fet per identificar miRNAs implicats en el manteniment de la homeòstasis vascular.

6.1 miR-204

Aquest miRNA constitueix un dels primers miRNAs descrits associats amb el remodelat vascular pulmonar.

Courboulin *et al.* (Courboulin et al., 2011) va demostrar que els nivells de miR-204 es trobaven disminuïts, tant en pacients amb HAP com en un model de rates amb HP induït amb monocrotalina. L'augment d'aquest miRNA reduïa la severitat de la malaltia. Concretament, es va localitzar la seva expressió a la SMC i que directament s'unia al extrem 3'UTR de SHP2 (una tirosina fosfatasa), que regulava l'activació de la proteïna transductora de senyal i activadora de la transcripció 3 (*Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)). STAT3 es un factor de transcripció que controla l'expressió de gens proliferatius a la SMC i a la vegada disminueix els nivells de miR-204 augmentant així la severitat dels seus efectes (Courboulin et al., 2011).

L'expressió de miR-204 també s'ha vist vinculada amb la hipòxia. S'ha demostrat que les SMC de pacients amb HAP tenien una expressió elevada de HIF-1 α . Aquest augment vindria donat per l'augment d'expressió RUNX2. MiR-204 controla l'expressió de RUNX2 i un augment de RUNX2 produït per la disminució del miR-204 provocaria l'augment de la proliferació i una resistència a la apoptosi (Cui et al., 2012).

6.2 Clúster miR-145/miR-143

Nombroses publicacions han demostrat la seva implicació en diferents patologies vasculars com la HAP i la arteriosclerosi (Caruso et al., 2012) (Elia et al., 2009). El miR-145 es troba disminuït en les lesions vasculars i en la neoïntima d'artèries pulmonars remodelades i s'ha vist que la seva sobreexpressió disminueix la formació de

neoíntima suggerint un paper protector i antiremodelat d'aquest miRNA (Cheng et al., 2009)(Elia et al., 2009)(Cordes et al., 2009).

El KO del clúster miR-145/miR-143 a ratolí va provocar deficiències en el sistema vascular indicant el seu paper regulador de la homeòstasi de la SMC (Elia et al., 2009)(Boettger et al., 2009) (Xin et al., 2009). Ambdós miRNAs són característics de la SMC i s'expressen a partir d'un promotor bicistrònic i altament conservat. La seva expressió ve regulada per *CArG boxes*, elements responedors d'SMADS i RBPJ on la MyoCD i SRF en són els seus principals reguladors tan *in vitro* com *in vivo*. Aquests miRNAs intervenen inhibint l'expressió de factors de transcripció responsables del canvi fenotípic de la SMC com el KLF4 i el KLF5. La inhibició d'aquests factors induiran l'expressió de MyoCD i altres factors necessaris per l'activació del set de proteïnes contràctils, i secundàriament reforçar l'expressió d'aquests miRNAs promovent la diferenciació de la SMC (Cordes et al., 2009).

En el mateix sentit, Quintavalle *et al* (Quintavalle et al., 2010) va demostrar que PDGF reduïa l'expressió de miR143/145 i estimulava migració promovent el remodelat vascular.

6.3 miR-21

miRNA intrònic altament conservat i un dels primers que es va descobrir en els mamífers com a oncomir, és a dir, com a potent estimulador de la proliferació. Durant el remodelat vascular, miR-21 s'ha descrit com un dels miRNAs determinants en els canvis fenotípics de la SMC després de dany vascular.

En un model de dany vascular a rata, miR-21 s'ha trobat augmentat i la seva inhibició disminuïa el creixement de la íntima (Ji et al., 2007). A més, la sobreexpressió de miR-21 a la SMC va provocar una modulació fenotípica cap a un fenotip proliferatiu (Sarkar et al., 2010) (Green et al., 2015). Específicament, miR-21 pot estimular la proliferació i suprimir l'apoptosis a la SMC ja que indueix l'activació de la via AKT suprimint la seva diana PTEN (enzim homòleg a la fosfatasa-tensina) i augmentant BCL-2, un potent gen

INTRODUCCIÓ

antiapoptòtic (Ji et al., 2007) (Horita et al., 2011). Més recentment, s'ha demostrat que la regulació de la oncoproteïna activadora 1 (*activator protein 1 (AP-1)*), per miR-21 resulta en un augment de la proliferació (Li et al., 2014).

D'altra banda, hi ha alguns estudis que van descriure un augment de la diferenciació mitjançant el miR-21. miR-21 augmentava gràcies a l'activació de la via BMP4 i TGF β -1 i el seu augment, inhibia a la proteïna de mort cel·lular programada (*programmed cell death 4 (PDCD4)*), la qual es l'encarregada de regular l'expressió de gens contràctils (Davis et al., 2008).

Els nivells de miR-21 s'han trobat tant augmentats (Parikh et al., 2012) (Bockmeyer et al., 2012) com disminuïts en la hipertensió pulmonar (Caruso et al., 2010). Tot i que és un dels miRNAs més estudiats, es produeix una paradoxa rellevant en l'expressió d'aquest miRNA i en la seva implicació com a regulador de la homeòstasi de la SMC durant el remodelat vascular pulmonar.

6.4 Clúster miR-17-92

Aquest clúster, també anomenat oncomiR-1 va ser identificat com a clúster inductor de tumors. Inclou miR-17, miR-18, miR19a, 20a, miR19b-1 and miR 92-1 i s'ha vist que juga un paper important en el desenvolupament del pulmó, ja que la seva deleció va ser letal en els ratolins (Ventura et al., 2008).

Diversos estudis relacionen aquest clúster amb la patogènesis de la HAP. Es va demostrar que aquests miRNAs regulen gens com HIF-1 α o BMPR2 (Brock et al., 2009)(Taguchi et al., 2008). A la cèl·lula endotelial, es va demostrar estar relacionat amb la inhibició de BMPR2, provocant un increment de la proliferació i resistència en l'apoptosis (Yan et al., 2009). A la SMC, es va veure transitòriament elevat en les primeres fases degut a l'hipòxia i promovent proliferació cel·lular, mentre que posteriorment, s'ha vist la seva expressió disminuïda promovent l'expressió de p21 factor que limitarà la proliferació. A més, la seva disminució està associada a una disminució dels marcadors contràctils com Sm22- α , Calponina i α -SMA suggerint que

Mecanismes moleculars i expressió de miRNAs durant la diferenciació de la SMC en el remodelat vascular

la seva expressió és necessària pel manteniment del fenotip diferenciat. (Chen et al., 2015).

6.5 Altres miRNAs

La família de miR-1 i miR-133 és un grup activador de la diferenciació de la SMC. Els dos miRNAs són regulats per SRF/CArG boxes. miR-1 promou la diferenciació de cèl·lules embrioniques a SMC inhibint l'expressió de KLF4 (Xie et al., 2011). El KO de miR-1 a ratolí mostra una diferenciació deficient de la SMC (Heidersbach et al., 2013).

Per la seva banda, la supressió del miR-133 va provocar una disminució dels marcadors contràctils (Liu et al., 2008). miR-133a s'ha demostrat que té com a gen diana SP1 (Madsen et al., 1997). Altres estudis han demostrat que una sobreexpressió d'aquest miRNA afavoreix l'engruiximent de la neointima, mentre que la seva inhibició té un efecte antiremodelat (Torella et al., 2011). Un altre miRNA estimulat per MyoCD és miR-24 i miR 29a, regulant proliferació i migració mitjançant la inhibició del PDGFR. A continuació a la figura 11 es descriu una taula resum dels principals miRNAs implicats en l'homeòstasi de la SMC i el remodelat vascular.

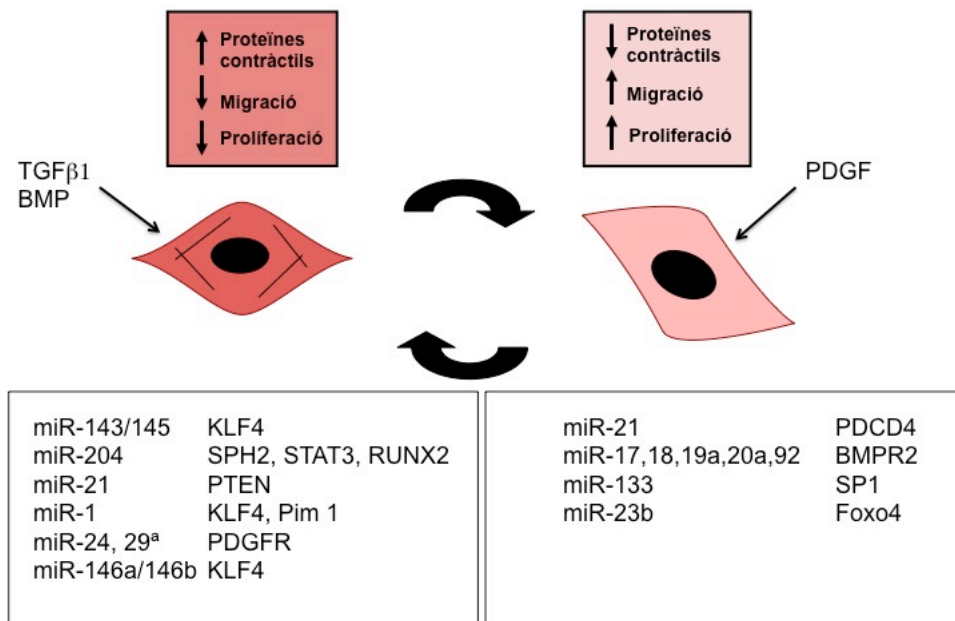


Figura11. Esquema dels principals miRNAs que intervenen en la diferenciació de la SMC.

INTRODUCCIÓ

A la Taula 1 es mostra un resum dels principals miRNAs implicats en la homeòstasi de la SMC.

miRNA	Diana	Funció	Referències
1	Pim1	(-) SMC proliferation	Chen et al. [29]
1	Unknown	(-) SMC contractility	Jiang et al. [84]
1	Klf4	(+) SMC differentiation in ES cells	Xie et al. [193]
10a	Hdac4	(+) SMC differentiation in ES cells	Huang et al. [76]
15b/16	Yap	(+) SMC differentiation	Xu et al. [195]
21	Pdc4	(+) SMC differentiation	Davis et al. [39]
21	Pten	(-) SMC differentiation/(+) neointima	Lin et al. [108]; Ji et al. [83]
21	Pten	(+) SMC proliferation	Green et al. [56]; Liu et al. [113]
21	Dock	(+) SMC proliferation	Kang et al. [87]
22	Mecp2	(+) SMC differentiation	Zhao et al. [206]
23b	Foxo4	(-) SMC proliferation/(-) migration	Iaconetti et al. [78]
24	Chi3l1	(-) SMC inflammation/(-) SMC differentiation	Maegdefessel et al. [122]
24	Trb3	(-) SMC proliferation	Chan et al. [26]
24	Pdgfrb	(-) SMC migration	Talasila et al. [166]
26a	Smad1	(+) SMC proliferation/(-) SMC differentiation	Leeper et al. [100]
26a	Smad4	(-) SMC apoptosis	Leeper et al. [100]
26a	Pdgfrb	(-) SMC migration	Talasila et al. [166]
29a/29c	Cav1	(+) insuline resistance/alterations in lipid metabolism	Chen et al. [31]
29b	Unknown	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration/(-) apoptosis necrosis ratio	Bretschneider et al. [20]
30a	Ca(v)1.2	(-) Vascular tone	Rhee et al. [154]
30b/30c	Runx2	(-) SMC calcification	Balderman et al. [7]
31	Lats2	(+) SMC proliferation	Liu et al. [110]
31	Creg	(-) SMC differentiation	Wang et al. [183]
34a	Sirt1	(+) SMC differentiation	Yu et al. [203]
34a	Notch1	(-) SMC proliferation	Chen et al. [111]
96	Trb3	(-) SMC differentiation	Kim et al. [92]
124	Nfatc1	(-) SMC proliferation/(+) SMC differentiation	Kang et al. [88]
125b	Suv39h1	(+) SMC inflammation	Villeneuve et al. [177]
126	FoxO3/Bcl2/lrs1	(+) SMC proliferation/(+) neointima	Zhou et al. [210]
130a	Meox1	(+) SMC proliferation	Wu et al. [192]
132	Lrrfp1	(-) SMC proliferation/(-) neointima	Choe et al. [33]
133a	Sp1	(-) SMC proliferation/(-) SMC migration	Torella et al. [171]
138	Mst1	(-) SMC apoptosis	Li et al. [105]
138	Sirt1	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration	Xu et al. [196]
143/145	Klf4/Etk1/Camk2d	(-) SMC proliferation/(+) SMC differentiation	Cordes et al. [87]
143/145	Klf5	(+) SMC differentiation/(-) neointima	Cheng et al. [32]
143/145	Klf4/Klf5/Add3	Cytoskeletal dynamics	Xin et al. [194]
143/145	Klf2	(+) SMC differentiation	Hergenreider et al. [70]
146a	Klf4	(+) SMC proliferation/(+) neointima	Sun et al. [164]
146b	Unknown	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration	Wang et al. [182]
195	Cdc42/Cend1	(-) SMC proliferation/(-) SMC migration	Wang et al. [186]
200	Zeb1	(+) SMC inflammation in Diabetes	Reddy et al. [153]
203	c-Abl	(-) SMC proliferation	Liao et al. [107]
204	Shp2	(-) SMC proliferation/(+) SMC apoptosis	Courboulin et al. [37]
205	Runx2	(-) SMC calcification	Quiao and Zhang [150]

Fonament de la tesi doctoral i hipòtesis

Les alteracions en la circulació pulmonar i específicament en el vascular pulmonar remodelat, representen un component important en la MPOC i en el desenvolupament de la HP. La SMC dediferenciada és un dels principals elements del engruiximent intimal característic d'aquesta patologia. Els mecanismes que condicionen aquesta dediferenciació no són coneguts, així com l'origen d'aquestes SMC, que en condicions normals no es troben a la íntima.

En aquesta tesi doctoral hem volgut profunditzar en els processos de dediferenciació de la SMC a les artèries pulmonars. Ens hem focalitzat en els membres de la família Snail i els miRNAs. Aquests factors poden ser nous candidats, ja que intervenen en la regulació de processos de diferenciació i en la proliferació cel·lular en moltes altres patologies i models cel·lulars. Creiem que la modulació d'aquestes vies són molt importants, i el seu paper en la patologia vascular i específicament en el vascular remodelat i la MPOC, no s'han estudiat mai. Seguint aquests conceptes es van generar les següents hipòtesis:

1. L'origen de la SMC característica del remodelat (SMC dediferenciada), podria ser iniciada o estimulada per l'efecte de determinades citocines inflamatòries i factors de creixement. Aquests estímuls poden actuar alterant l'expressió de factors de transcripció, específics de la família Snail, que podrien estar implicats en la regulació de la diferenciació de la SMC durant el remodelat vascular pulmonar.
2. Existeix un perfil d'expressió de miRNAs específic a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC i podrien estar associats tant a la dediferenciació com a la proliferació desmesurada de les SMC pròpies del remodelat vascular pulmonar.

Objectius

Objectius generals

1. Estudi de l'expressió de factors relacionats amb EnMT i la seva contribució en la modulació fenotípica de la SMC i la patogènia del remodelat vascular pulmonar a la MPOC.
2. Estudi del perfil d'expressió de miRNAs a les artèries pulmonars de pacients amb MPOC i estudiar la seva implicació en la proliferació i el canvi de fenotip de la SMC.

Objectius específics

1. Estudi de factors iniciadors de EnMT, específicament, els de la superfamília Snail en un model *in vitro* de diferenciació de SMC:
 - 1.1 Establir un model de diferenciació de SMC *in vitro* basat en el contacte cèl·lula-cèl·lula.
 - 1.2. Estudiar l'expressió dels gens candidats durant el remodelat i en el canvi fenotípic de SMC en un model *in vitro* de diferenciació de SMC induït per contacte cèl·lula-cèl·lula i mitjançant inducció amb TGF β -1.
 - 1.3. Avaluar els efectes de citocines inflamatòries en l'expressió dels gens candidats. Estudiar si són capaços d'induir la modulació fenotípica de la SMC.
 - 1.4. Estudis funcionals dels gens candidats per identificar vies moleculars implicades en el procés de remodelat vascular i durant la diferenciació de la SMC.
 - 1.5. Analitzar l'expressió dels gens candidats en artèries aïllades remodelades i en un model d'hipertensió pulmonar a ratolí.

2. Estudi del perfil de miRNAs en el remodelat vascular en artèries pulmonars aïllades de pacients amb MPOC:

2.1 Identificar el perfil de miRNA en artèries aïllades de pacients amb MPOC, fumadors i no fumadors.

2.2. Correlacionar el perfil de miRNA amb el grau de remodelat vascular i segons el nivell d'obstrucció al flux aeri.

2.3. Estudiar el perfil de miRNA en el procés de diferenciació de la SMC i correlacionar-lo amb la plasticitat i capacitat proliferativa d'aquestes cèl·lules.

2.4. Determinar el gen diana específic del miRNA candidat i determinar la seva implicació amb la proliferació durant el remodelat vascular.

Estudi 1: Slug augmenta en el remodelat vascular i indueix el canvi fenotípic de la SMC

Estudi publicat:

Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. *PLoS One*. 2016 Aug 25;11(8):e0162117.

Fl, 3,2 1Q

Material i mètodes

Cultius de cèl·lules primàries

Es van utilitzar cèl·lules musculars d'artèria pulmonar (SMC) i cèl·lules endotelial d'artèria pulmonar (EC) proveïdes per Lonza (Colònia, Alemanya). Les cèl·lules van ser cultivades amb medi específic SmBm i medi EGM2 proveïts per la mateixa companyia i suplementats per factors de creixement (BulletKit)(Lonza) i 10% de sèrum fetal boví (FBS) (Lonza). Les cèl·lules es van utilitzar dels passatges 3 a 8 i van ser mantingudes en una atmosfera humida, a 37°C i 5% CO₂.

Models de diferenciació cel·lular *in vitro*

La diferenciació de la SMC va ser induïda per contacte cel·lular en base a un altre treball on degut al contacte cel·lular es produeixen canvis tridimensionals amb formació de filaments (Song et al., 1998). Les cèl·lules que van ser cultivades a un 70% de confluència (D0), van esdevenir cèl·lules amb un fenotip dediferenciat-proliferatiu, les cèl·lules cultivades a un 100% confluència (D2), van correspondre a cèl·lules que es troben en un estat intermig de diferenciació. Finalment, les cèl·lules totalment diferenciades es van obtenir després de quatre dies de creixement després que arribessin a la confluència (D6).

Per determinar l'estat de diferenciació de les SMC es va estudiar l'expressió de proteïnes contràctils com la MyoCD, GATA-6, Sm22- α , Calponina, Caldesmon i la disminució de KLF4 mitjançant real time PCR (qPCR). També es va estudiar la presència de filaments contràctils de α -SMA, Calponina i SM-MHC mitjançant immunofluorescència.

Model d'hipòxia i tabac

La diferenciació de la SMC sota condicions d'hipòxia es va realitzar en incubadors d'hipòxia a 1% O₂ (New Brunswick Galaxy 170R R, Eppendorf, Germany). Es van sembrar les SMC a D0 i es van deixar diferenciar les cèl·lules durant 6 dies al incubador.

Pels estudis *in vitro* amb extracte de tabac (CSE), 50 ml de medi basal van ser barrejats amb extracte de fum de tabac utilitzant l'aparell Protowerx (Vancouver, Canada).

L'extracte va ser obtingut a partir de quatre cigarretes (3RF) (Universitat de Kentucky, Lexington, KY). Cadascuna conté 0,7 mg de nicotina i 9 mg d'alquitrà segons el fabricant. El CSE es va filtrar a través de filtres de 0,22 µm (Milipore, Bedford) i immediatament va ser congelat a -80°C fins al seu ús. Es van sembrar cèl·lules a D6, es van rentar amb medi deprivat (medi sense les citocines del BulletKit i al 1% FBS inactivat) i es van estimular les cèl·lules amb CSE (1/10) diluït en medi deprivat durant 24h.

Diferenciació amb TGFβ-1

Es van sembrar cèl·lules a D0, es van rentar amb medi deprivat i es van deixar tota la nit (ON) amb aquest medi. Posteriorment, es va avaluar la diferenciació de la SMC després de l'estimulació amb TGFβ-1 (10ng/ml; Acris, Herdford, Alemanya) durant 24h i 48h amb medi deprivat. La diferenciació amb TGFβ-1 es produeix abans de la confluència ja que aquest factor de creixement és un conegut inductor de la diferenciació (Wang et al., 2011).

Dediferenciació amb TNF-α

Per altra banda, la dediferenciació de la SMC es va aconseguir després de l'estimulació de SMC diferenciades (D6) amb TNF-α (10 ng/ml, Bender Medsystems, Vienna, Austria) durant 48h amb medi deprivat.

Estudi de la proliferació cel·lular

L'estat proliferatiu de la SMC va ser avaluat segons l'expressió de Ki67 (per ARN i proteïna) i analitzat segons el percentatge (%) de cèl·lules que iniciaven la fase S del cicle cel·lular per citometria de flux.

Anàlisi del cicle cel·lular: Per l'anàlisi del cicle cel·lular es va utilitzar iodur de propidi (IP)(Sigma-Aldrich; St Louis, MO). El IP s'uneix específicament a l'ADN cosa que permet analitzar la fluorescència emesa per aquesta substància, i serà proporcional a la quantitat d'ADN. Breument, el protocol d'avaluació del cicle cel·lular, s'inicia amb una permeabilització de les cèl·lules amb etanol al 100%, i seguit d'una incubació de les

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

cèl·lules a -20°C durant 30 min. Posteriorment, es va efectuar la tinció amb RNAsa A (10 mg/ml) i IP (1 mg/ml) en la foscor i a 37°C durant 30 min més. L'anàlisi es va fer mitjançant citometria de flux amb el citòmetre BD Fortessa 4L (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). A continuació, a la Figura 12 hi ha un plot representatiu de la fase S del cicle cel·lular, la fase que es va quantificar per la valoració de la proliferació:

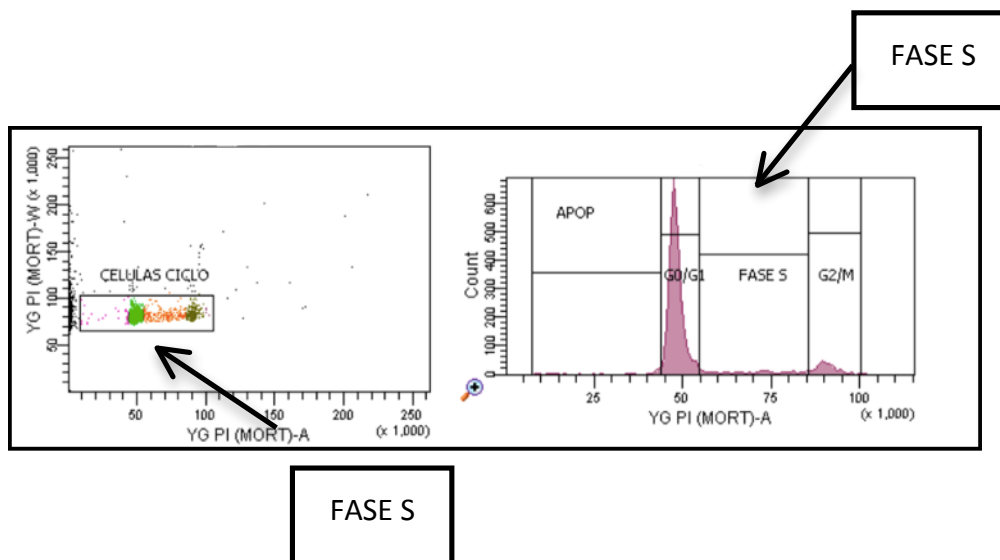


Figura 12. Plot on es pot identificar la fase S del cicle cel·lular.

Experiments de senescència

Per tal d'excloure que els canvis observats a les SMC D6 eren deguts a l'arribada a la senescència cel·lular es van comparar SMC a DO i SMC D6 a passatge 2 amb SMC a passatge 12, les quals van ser utilitzades com a control positiu de senescència. Per fer-ho, es va utilitzar el *Senescence Histochemical Staining Kit* (Sigma-Aldrich) basat en l'anàlisi de l'activitat de l'enzim β -galactosidasa, un conegut marcador de senescència cel·lular. Les cèl·lules senescentes són les úniques que poden catalitzar la hidròlisi dels β -galactòsids a monosacàrids gràcies a la presència d'aquest enzim. Així cèl·lules en creixement tenen una baixa activitat β -galactosidasa, mentre que les senescentes tenen una alta activitat enzimàtica promovent la formació d'un precipitat blau visible. El protocol consisteix en una fixació de les cèl·lules amb formaldehid i posteriorment una incubació amb el substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) a pH 6 ON. Els resultats es van expressar com a cèl·lules blaves senescentes respecte el nombre total de cèl·lules tenyides amb DAPI (colorant específic que tenyeix nuclis).

Anàlisi de l'expressió gènica: Extracció ARN i Real Time-PCR (qPCR)

ARN total cel·lular va ser aïllat utilitzant TriZol® (Invitrogen, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MS) seguint les instruccions del producte. Breument, es resuspèn el pellet de cèl·lules amb 1 ml de Trizol, es deixa incubar 5 min i s'afegeix cloroform (Sigma-Aldrich). Posteriorment, es centrifuguen les mostres a 12.000g durant 15 minuts i es separa la fase aquosa superior, evitant aspirar part de la interfase on trobem l'ADN. S'afegeix 500 µl de isopropanol (Sigma-Aldrich) i 1 µl de glicogen (Invitrogen, Life Technologies; Thermo Fisher Scientific) i es deixa precipitar l'ARN durant 30 minuts a -20°C. Després es centrifuguen les mostres a 12.000g durant 30 minuts. Es fa un rentat amb etanol al 70% i es deixen assecar els tubs on hi ha l'ARN. Finalment, van ser resuspendos en 15 µl d'aigua RNAsa free. Seguidament, es va mesurar la concentració de l'ARN mitjançant densitat òptica a 260 i 280 nm amb un espectrofotòmetre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

La síntesi d'ADNc es va realitzar a partir de 1 µg de ARNm total amb el kit *High capacity cDNA RT* (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) en el termociclador Chromo 4 real time PCR (Bio-rad, Hercules, CA). La reacció de retrotranscripció es va realitzar seguint els següents passos:

10 minuts a 25°C,

2 hores a 37°C

i 5 minuts a 85°C.

L'expressió gènica es va mesurar mitjançant qPCR amb el Chromo 4 real time PCR (Bio-rad) i el ABI Fast 7900 HT (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) utilitzant el SensiMix™ SYBR® Hi-ROX Kit (Quantace, San Mateo, CA) o sondes Taqman® (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), respectivament.

SensiMix SYBR® Hi-ROX 2x mastermix (Quantace) conté tots els components necessaris per efectuar la qPCR: SYBR® Green I dye, dNTPs i estabilitzadors. El SYBR® Green és

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

una molècula que s'uneix a l'ADN de doble cadena que s'anirà sintetitzant durant la PCR, per tant la quantitat de fluorescència emesa serà proporcional a la quantitat d'ADNc diana present a la mostra. A aquesta mastermix s'hi afegeixen els iniciadors o primers d'interès a una concentració de 10 nM juntament amb 100 ng d'ADNc aproximadament. El protocol seguit al termociclador Chromo 4 real time PCR (Bio-rad) es detalla a continuació:

10 min 95°C
40 cicles | 15s 95°C
 | 15s 55-60°C
 | 15s 72°C
5 min 72°C

Corba de Melting- Desnaturalització desde 95°C baixant 0,5°C fins 30 cicles

Es van utilitzar sondes Taqman específiques per gens únics (Taqman Gene Expression Assays: Slug (Hs00161904_m1), Snail (Hs00195591_m1) i β -actina (Hs01060665_g1) (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) i el TaqMan Universal PCR Master Mix with AmpErase UNG (Applied Biosystems, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). La sonda TaqMan[®] conté una seqüència específica per un gen i està dissenyada per unir-se a la seqüència d'interès just a la regió flanquejada entre els dos iniciadors o primers. A l'extrem 5' de la sonda s'hi troba unit un fluorocrom emissor o reporter i al extrem 3' un fluorocrom receptor o quencher, que anul·la l'emissió de fluorescència del reporter. Durant la fase d'extensió de la PCR, la sonda és hidrolitzada per l'activitat exonucleasa 5' de la Taq polimerasa, alliberant el reporter del quencher i permetent l'emissió de fluorescència. Així doncs, la fluorescència quantificada és proporcional al número de còpies del gen diana present a la mostra.

En tots dos casos l'expressió relativa de cada gen, el percentatge de canvi o *Fold change* va ser analitzada segons el mètode de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

$$\text{Expressió gen diana} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

Aquest mètode es basa en dos principis. Per una banda, la utilització d'un gen normalitzador o housekeeping que s'expressa igual en totes les condicions i per l'altra, que l'eficiència d'anellament dels primers és la mateixa per tots els gens d'estudi. En els nostres experiments, els resultats obtinguts Cts (quantitat de fluorescència) van ser normalitzats respecte els housekeepings GAPDH o β -actina. Tenint en compte aquests trets es realitzen els següents càlculs:

ΔCt : CT gen interès - CT housekeeping

$\Delta\Delta\text{Ct}$: ΔCT Grup Control – ΔCT Grup de Comparació

Fold change: $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

Els primers utilitzats es descriuen a la Taula 2:

Gen	Seqüència
Calponin F	CACGACATTTTTGAGGCCAA
Calponin R	TTTCCTTTTCGTCTTCGCCAT
Sm22v2 F	GGAAGCCTTCTTTCCCCAGA
Sm22v2 R	TCCAGCTCCTCGTCATACTTCTT
MyoCD F	GCACCAAGCTCAGCTTAAGGA
MyoCD R	TGGGAGTGGGCCTGGTTT
Slug F	GCAAGATCTGCGGCAAGG
Slug R	GCTCTGTTGCAGTGAGGGC
Snail F	CCCAGTGCCTCGACCACTAT
Snail R	CCAGATGAGCATTGGCAGC
VE- caherina F	GATGCAGACGACCCCACTGT
VE- cadherina R	CCACGATCTCATACCTGGCC
CD31 F	AAAGTCGGACAGTGGGACGT
CD31 R	GGCTGGGAGAGCATTTCACA
GAPDH F	CATCACCATCTTCCAGGAGC
GAPDH R	TGGACTCCACGACGTACTION
β actin F	CGGAACGCCTCATTGCC
β actin R	ACCCACACTGTGCCCATCTA
Ki67 F	GCAGCCTTAACTGTGACACTTGC
Ki67 R	GCCACCGTGCCCTGG
KLF4 F	GGGAGAAGACACTGCGTCA
KLF4 R	GGAAGCACTGGGGGAAGT
Caldesmon F	GGAGGTGAATGCCAGAACA
Caldesmon R	AGGAATGCGGCCTCATCATC
Mouse β actin F	GGAGGGGGTTGAGGTGTT
Mouse β actin R	GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA
Mouse Slug F	TGTATGGACATCGTCGGCAG
Mouse Slug R	ACTTACACGCCCCAAGGATG
Mouse Snail F	TGGAAAGGCCTTCTCTAGGC
Mouse Snail R	AAAGCACGGTTGCAGTGG
TIG3 F	TCTGGCTCCTCCAAGTGAGT
TIG3 R	TTTCACCTCTGCACTGTTGC
CLDN1 F	CGATGAGGTGCAGAAGATGA
CLDN1 R	AGCCAGACCTGCAAGAAGAA
GATA 6F	TTCCCATGACTCCAACCTCC
GATA 6 R	TGGGGGAAGTATTTTTGCTG
CCNA2 F	CCATACCTCAAGTATTTGCCATC
CCNA2 R	TCCAGTCTTTTCGTATTAATGATTCAG
HBEGF F	GGACCAGCTGCTACCCCTA
HBEGF R	GTGGCTTGGAGGATAAAGTGA

Taula 2. Cebadors o primers utilitzats en el primer estudi (5'-3').

Western Blotting

Una vegada obtingudes les cèl·lules, aquestes es van rentar amb PBS i es van lisar amb el buffer RIPA i inhibidors de proteases (50 mM Tris-CL, 150 mM NaCL, 1mM EDTA, 10% NP-40, 0,10% deoxicolat de sodi 1mM). El lisat obtingut es va centrifugar a 14.000g durant 15 min a 4°C. El sobrenedant ric en proteïnes es va guardar a -80°C. La concentració total de proteïna es va quantificar amb el mètode de Pierce BCA protein Assay method (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Aquest mètode consisteix en un assaig colorimètric basat en la reacció de Biuret, on els enllaços peptídics reaccionen amb els ions de coure II en solució alcalina, amb la presència de l'estabilitzant tartrat, per formar un complex blau-violeta. El kit utilitzat combina aquesta reacció amb l'àcid bicinconínic (BCA), el qual reacciona amb el complex anterior generant un nou producte de color violeta intens que té una sensibilitat molt superior. El color obtingut és proporcional a la concentració de proteïna i es pot mesurar a una longitud d'ona de 562 nm mitjançant espectrofotometria. Les concentracions de proteïna es van obtenir amb el lector de plaques Multi Modal Synergy 2 (Biotek, Instruments Inc,VT), relatives a una corba estàndard d'Albúmina Sèrica Bovina (BSA) a diferents concentracions.

Es van fer tres experiments, que corresponen a un carril del gel desnaturalitzant de poliacrilamida o SDS-PAGE. El percentatge de poliacrilamida dels gels determina el diàmetre del porus, i es selecciona en funció del pes molecular de la proteïna d'interès. En el nostre cas, per la detecció de Slug es van fer gels al 12%, proteïna d'interès de pes molecular de 30kDa, mentre que per la detecció de E2F1 es van fer de 7,5% ja que el seu pes molecular es de 50 KDa. La quantitat de proteïna (uns 60 ug) que s'havien de carregar es van diluir en tampó de càrrega 4X (200mM Tris 0,5M ph=6.8, 40% glicerol, 8% SDS i 0,4% blau de bromofenol). Just abans d'efectuar la càrrega del gel s'afegeix 1/20 de β -mercaptoetanol i s'escalfen les mostres 5 min a 95°C.

Paral·lelament a les mostres analitzades, es va fer córrer el marcador de pes molecular *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (Bio-Rad), format per diferents proteïnes de pes molecular conegudes que ens serveix per

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

indicar-nos el grau de separació de les proteïnes i per estimar el pes de les proteïnes d'interès. Després de l'electroforesi a 150V durant 1,5h, es va realitzar una transferència a membranes de fluor de polivinil de (PVDF) (GE-Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) , és a dir, membranes de 0.22 o 0.45 μm de porus on les proteïnes són transferides mitjançant la generació d'un camp elèctric. La transferència es va fer a 100V durant 2 hores amb buffer de transferència (25 mM Tris, 190 mM glicina, 10% metanol). Per veure la correcta transferència de les proteïnes a la membrana, les membranes es van tenyir amb Ponceau (0.2% (w/v) Ponceau S 5% àcid acètic glacial). Posteriorment, les membranes es van bloquejar amb 5% BSA (Sigma-Aldrich) i la incubació amb els anticossos primaris es va fer ON en TBS (200mM Tris ph 7,5 i 1'5M NaCl) en agitació. Es van utilitzar els anticossos primaris contra Slug (1/1000) (Cell signalling, Boston, MA), β -actina (1/1000) (Cell signalling) i E2F1 (1/1000) (Abcam, Cambridge, UK). Després, es va efectuar la incubació amb l'anticòs secundari apropiat segons l'espècie (anti-rabbit (1/2000) i anti-mouse (1/2000), i conjugat a HRP (Horse-redox-peroxidasa) (Life Technologies, Thermo Fischer Scientific). Les membranes es van revelar mitjançant quimioluminescència amb el kit *ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). La captura de les imatges es va fer amb l'equip LAS4000 imaging system (GE Healthcare). La detecció de quimioluminescència és possible gràcies a la reacció de la peroxidasa de HRP, un enzim que es troba unit a l'anticòs secundari i que en presència del seu substrat (proporcionat pel kit ECL Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate), reacciona i emet una senyal que pot ser detectada amb un sistema d'imatge digital. Es van quantificar les bandes mitjançant densitometria utilitzant el ImageJ software (domini públic, National Institutes of Health).

Per a la segona detecció, es van rentar les membranes amb TBS (5 min), i es van incubar 30 minuts amb una solució d'*stripping* (50nM Tris, 20% SDS i 0,7% de β -mercaptoetanol) en agitació. Aquest procediment permet eliminar els anticossos primaris i secundaris sense alterar les proteïnes de la membrana o amb una petita pèrdua. Posteriorment, es va tornar a rentar (5 minuts) amb TBS. A continuació, es van reincubar les membranes amb l'anticòs primari contra les proteïnes d'interès.

L'endemà es van rentar les membranes i es van incubar durant 1 hora en TBS a amb els anticossos secundaris apropiats a temperatura ambient i en agitació suau.

Immunodetecció

Immunofluorescència: La diferenciació de SMC va ser analitzada mitjançant immunofluorescència utilitzant els anticossos contra α -SMA (1/750), Calponina (1/75) (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA), SM-MHC (1/250) (Abcam) i CD31 (1/500) (DAKO). Per mesurar la proliferació, es va fer servir un anticòs contra l'antigen ki67 (1/50) (Novocastra, Newcastle, UK). El protocol consta d'una fixació amb 4% formaldehid durant 30 min. Després d'una permeabilització amb PBS-0,1%- Tritó, es va realitzar una incubació amb els anticossos apropiats ON i a 4°C. Després, es va fer una incubació amb els anticossos secundaris conjugats amb FITC o Alexa fluor 466 (Jackson immunoresearch, Philadelphia) durant 90 minuts i a temperatura ambient. Posteriorment, els nuclis van ser tenyits amb DAPI. El muntatge es va fer amb *ProLong* (Thermo Fisher Scientific). Totes les imatges es van obtenir amb un microscopi òptic Leica DM5000B i una càmera Leica DFC 500 8 (Leica microsystems, Wetzlar, Alemanya).

Immunohistoquímica: L'expressió de Slug a les artèries pulmonars es va mesurar mitjançant immunohistoquímica de les seccions d'artèria congelades d'artèries remodelades (n=3) i no remodelades (n=5). Inicialment i després de deixar assecar les bé les mostres, es van hidratar amb PBS, i es va procedir a una permeabilització amb PBS-Tritó 0,1%. Posteriorment, es va realitzar un primer bloqueig amb peroxidases i després amb DAKO (un diluent de soroll de fons comercial (DAKO)). La incubació amb l'anticòs de Slug es va fer a 4°C ON amb l'anticòs a una dilució (1/75) (Cell signalling). Després de dos rentats, es va fer la incubació de 45 min amb l'anticòs secundari apropiat (1/150) conjugat a biotina. Per efectuar el revelat es va utilitzar el kit *Dako envision* (DAKO) basat en afegir Streptavidina conjugada a HRP durant 8 min fins veure canviar el color de la preparació a marró. El contrast es va realitzar amb hematoxilina-eosina a temperatura ambient. Per la deshidratació de les mostres es van realitzar rentats amb alcohol a concentracions creixents: alcohol 70%, alcohol 95% i alcohol absolut i finalment, xilol. El muntatge es va fer amb Pertex

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

(Perseverance Mills; Manchester, UK). Totes les imatges es va obtenir amb un microscopi òptic Leica DM5000B i una càmera Leica DFC 500 8 (Leica microsystems).

L'àrea positiva per Slug va ser quantificada mitjançant el programa ImagePro (Media Cybernetics, Inc) i normalitzada respecte l'àrea total de la paret arterial.

Assajos funcionals: inhibicions i sobreexpressions

Per la sobreexpressió de Slug es va utilitzar el kit de transfecció transitòria Amaxa™ Nucleofector™ (Lonza). Aquest mètode està basat en una nucleofecció, és a dir, la incorporació d'ADN o ARN exogen al interior del nucli gràcies a la creació d'un voltatge i la utilització d'una solució específica. Seguint les instruccions del fabricant, es van transfectar 1 milió de cèl·lules amb 1 ug del plàsmid XL6-control o XL6-Slug (Origene Technologies, Inc). Posteriorment, es van sembrar a un 90% de confluència en plaques de 6 o 24 pous. Després de la incubació de les cèl·lules en medi complet durant 24h, aquestes van ser estimulades amb medi deprivat i TGFβ-1 (10 ng/ml) (Acris) durant 24h més.

Per la inhibició de Slug es van utilitzar uns ARNs d'interferència (siRNAs) anomenats *siPools*. Els siRNAs són ARNs de doble cadena de 21-23 nucleòtids y extrems 3' protuberants homòlegs a la seqüència del gen que volem silenciar i al qual s'uniran i n'estimularàn la degradació, així inhibint l'expressió gènica. A diferència dels siRNAs convencionals, on un siRNA pot inhibir més d'un gen diana, la utilització de la tecnologia dels *siPools* evita en gran mesura aquest fet. Aquest sistema es basa en la utilització de diversos siRNAs, que cobreixen tot l'ARNm a molt baixa concentració, i específics del teu gen diana, fet que et permet inhibir l'expressió gènica amb molt baixes concentracions de siRNA i minimitzant altres inhibicions no específiques (*off-targets*) (Hannus et al., 2014).

Les SMC no diferenciades i diferenciades i les EC van ser transfectades utilitzant Lipofectamina RNAimax® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) i seguint les instruccions del fabricant. Breument, la transfecció es va realitzar utilitzant 10 nM de

siPool contra Slug (SiToll Biotech GMBH, Martinsried) o bé una seqüència aleatòria que va ser utilitzada com a control. La transfecció es va realitzar en proporció 1:1 (Lipofectamina: ARN) diluïda en Optimem (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Una vegada transfectades les cèl·lules es van sembrar en plaques de 24 pous durant un mínim de 24h amb medi complet.

Assaig de tancament de ferida (Wound healing assay)

Es van transfectar 40.000 cèl·lules i seguidament es van sembrar en plaques de cultiu de 24 pous. Després de 48h d'incubació amb medi complet es va fer la ferida amb una punta estèril. Les fotos es van fer cada 12h i l'anàlisi del tancament de la ferida es va fer mitjançant el programa ImagePro Plus (Media Cybernetics, Inc). Es va mesurar l'àrea en creixement i es va representar respecte l'àrea total de la ferida.

Anàlisi d'expressió *Transcriptome-wide*

Es van transfectar SMC amb 10 nM *siPool* de Slug i control. Després de 48 hores es va aïllar ARN i processat pel seu anàlisi mitjançant Human Gene 2.1 St array (Affymetrix, Santa Clara, CA). L'anàlisi es va dur a terme mitjançant l'algoritme multi-xip (RMA) (Irizarry et al., 2003). L'expressió per cada gen es va analitzar en base al model lineal de normalització en base al log₂ utilitzant el paquet R lineal per Microarray (Smyth, 2004).

Canvis entre cèl·lules on s'ha fet la inhibició i les cèl·lules control, mitjançant el mètode de Benjamini-Hochberg en log₂, es van ajustar segons la taxa FDR. En el nostre array 355 de 1200 gens van mostrar una expressió diferencial amb p-valors inferiors a 0.05.

Experiments *in vivo*

Tots els procediments amb animals van ser aprovats pel Comitè d'Ètica de la Universitat de Barcelona que està en concordança amb la normativa estipulada per la

ESTUDI 1. MATERIAL I MÈTODES

Generalitat de Catalunya (Decret 214/1997, DOGC 2450) i la normativa internacional (National Institutes of Health, 85-23, 1985).

Protocol experimental

Es van utilitzar ratolins femelles de la soca C57/bl6 (Envigo, UK) amb un pes de 22-25 g a l'inici de l'experiment. Tots els animals van ser estabulats en condicions controlades de temperatura 22-24⁰C i d'humitat relativa 60-65% amb cicles alternats de llum/fosc de 12 hores, i van tenir accés *ad libitum* a menjar i aigua.

Els ratolins es van dividir en tres grups: control (CTL ; n=6), ratolins exposats a hipòxia crònica (10% O₂, 5% CO₂) durant 3 setmanes (CH, n=5) i el tercer grup va ser exposat a CH i se'ls hi va administrar setmanalment un inhibidor de VEGFR, Sugen5416 (Tocris, R&D Systems, Minneapolis, MN) durant 3 setmanes a una dosi de 20 mg/Kg (CH+SU5416; n=5).

Eutanàsia i recollida de mostres

Al finalitzar l'exposició i les administracions es va mesurar la pressió ventricular dreta (RVP) utilitzant un catèter (Millar, Houston, TX) amb un transductor de pressió al ventricle dret passant per la vena jugular després d'anestesià l'animal amb una dosi de 50mg/kg ketamina i 3mg/kg xilacina.

Els animals després van ser sacrificats per exsanguinació i el teixit pulmonar va ser processat per anàlisi histològica i d'expressió gènica. Les mostres de pulmó per l'anàlisi d'expressió van ser congelades amb RNAlater[®] (Ambion, Thermo Fisher Scientific) i la resta es van fixar en formaldehid (Sigma-Aldrich) al 4% durant 24 hores per a l'estudi histològic.

Per a l'estudi histològic, ambdós lòbuls pulmonars es va tallar sobre l'eix transversal a nivell mig abans de ser inclòs en parafina. Tots els blocs de parafina es van tallar en seccions de 4 µm amb un micròtom Leica RM2125RT (Leica microsystems).

Muscularització de vasos

Per l'anàlisi de la muscularització dels vasos es van fer tincions amb α -SMA a partir dels talls de parafina. Primer, es van desparafinar i rehidratar els talls amb rentats successius amb xilol, alcohols a concentracions decreixents (etanol absolut, 96%, 70% i aigua destil·lada). Posteriorment, es van posar a bullir les mostres amb tampó citrat pH6 durant 1 minut per realitzar l'exposició dels epítops. Seguidament, es va realitzar el primer bloqueig amb peroxidasa endògena i la permeabilització de les mostres amb PBS-Tritó 0,1%. A continuació, es va realitzar el bloqueig amb DAKO durant 30 minuts i, posteriorment, un bloqueig amb la fracció constant de l'anticòs (Fab) de ratolí (DAKO) (1/10) durant 2 hores. Tot seguit, ja la incubació amb l'anticòs primari α -SMA (DAKO) (1/75). Després de dos rentats, es va fer la incubació de 45 minuts amb l'anticòs secundari apropiat (1/150) conjugat a biotina (DAKO). Per efectuar el revelat es va utilitzar el kit *Dako envision* (Dako Cytomation) basat en afegir Streptavidina conjugada a HRP durant 8 min fins veure canviar el color de la preparació a marró. El contrast es va realitzar amb hematoxilina-eosina a temperatura ambient. Per a la deshidratació de les mostres es van realitzar rentats amb alcohol a concentracions creixents: alcohol 70%, alcohol 95% i alcohol absolut i finalment xilol. El muntatge es va fer amb Pertex (Perseverance Mills). Totes les imatges es va obtenir amb un microscopi òptic Leica DM5000B i una càmera Leica DFC 500 8 (Leica microsystems).

Es van comptar el nombre de vasos intrapulmonars amb diàmetre inferior a 50 μ m que mostraven marcatge positiu per α -SMA respecte el nombre total de vasos petits. Les imatges es van analitzar amb el programa ImagePro (Media Cybernetics). A continuació a la figura 13 tenim un esquema del que corresponen a vasos muscularitzats:

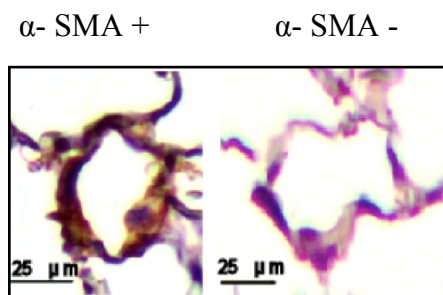


Figura 13. Foto representativa d'un vas muscularitzat respecte un no muscularitzat. Els vasos muscularitzats són positius per α -SMA.

Mesura de la hipertròfia cardíaca

Es va avaluar l'índex de Fulton (índex que mesura el pes del ventricle dret, respecte el pes del ventricle esquerre més el septum cardíac) com a mesura de la hipertròfia de ventricle dret.

Aïllament de l'ARN

A partir de 50 mg de teixit pulmonar dels ratolins es va homogeneïtzar amb un polítró Omni Tissue Homogenizer TH (Omni International) i es va realitzar l'extracció d'ARN mitjançant el kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Germany) seguint les instruccions del fabricant. La síntesi d'ADNc es va realitzar a partir de 1 μ g de ARNm total amb el kit *High capacity cDNA RT* (Applied Biosystems, Life Technologies) en el termociclador Chromo 4 real time PCR (Bio-rad, Hercules, CA) i la qPCR seguint els passos de l'apartat RT-qPCR.

Aïllament d'artèries pulmonars humanes

L'estudi va ser aprovat pel comitè d'Ètica de l'Hospital Clínic, de Barcelona. Es van obtenir segments d'artèria pulmonar (2 cm de llargada amb un diàmetre de 1-2 mm) procedents de 18 pulmons de pacients que havien anat a resecció pulmonar degut a carcinoma pulmonar. Les artèries van ser aïllades sota la lupa binocular i netejades del parènquima que l'envolta. D'aquestes artèries, uns segments es van utilitzar per analitzar la morfometria mitjançant la tinció amb orceïna.

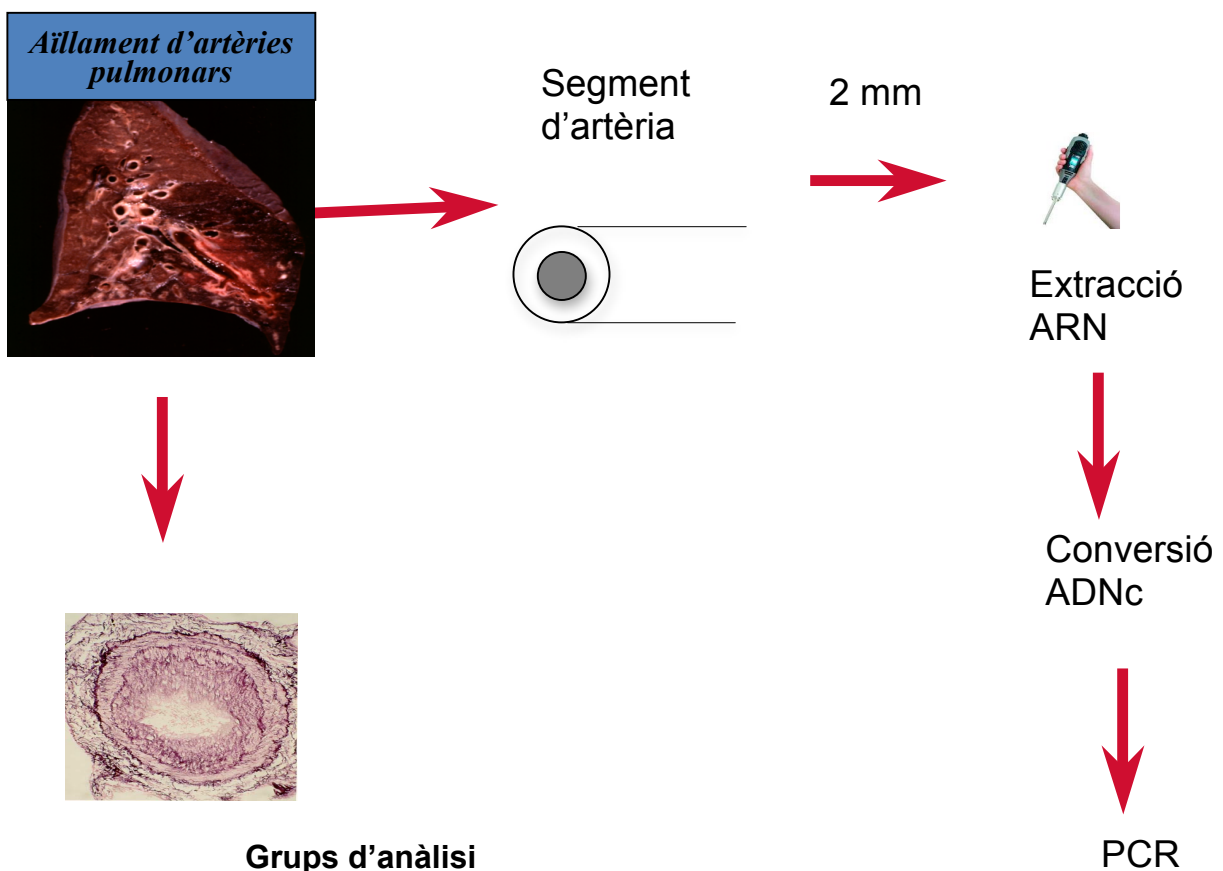
Altres segments es van preservar en RNAlater® (Ambion, Fisher Scientific) i posteriorment congelats a -80°C. Per l'extracció d'ARN es van seguir els passos descrits en l'apartat RT-PCR (pàg 56).

Morfometria

Talls de parafina de les seccions d'artèria pulmonar van ser contrastades amb orceïna, un colorant específic que tenyeix les làmines elàstiques. Artèries amb un diàmetre exterior de 100-500 μm i amb làmines elàstiques completes van ser analitzades. Es va analitzar el gruix de la íntima, i es va calcular el perímetre de l'elàstica externa i la interna tenint en compte el diàmetre de l'artèria. Els resultats es van expressar com a percentatge (%) del gruix de la íntima respecte de l'àrea total de l'artèria.

Els valors van ser dividits en tres grups establint els percentils 33 i 66 com a valors de tall. Així doncs van sortir tres grups diferenciats: artèries poc remodelades (R1), mitjanament remodelades (R2) i molt remodelades (R3).

A continuació, a la figura 14, es mostra un esquema del procediment seguit:



Grups d'anàlisi
% Íntima/total àrea
Grups: R1 < 33%
R2 -33-66%
R3 -> 66%

Format 10 (si s'usa més de 1 column)	
1	2
1	1
2	2
3	3
4	4
5	5
6	6
7	7
8	8
9	9
10	10
11	11
12	12
13	13
14	14
15	15
16	16
17	17
18	18
19	19
20	20
21	21
22	22
23	23
24	24
25	25
26	26
27	27
28	28
29	29
30	30
31	31
32	32
33	33
34	34
35	35
36	36
37	37
38	38
39	39
40	40
41	41
42	42
43	43
44	44
45	45
46	46
47	47
48	48
49	49
50	50
51	51
52	52
53	53
54	54
55	55
56	56
57	57
58	58
59	59
60	60
61	61
62	62
63	63
64	64
65	65
66	66
67	67
68	68
69	69
70	70
71	71
72	72
73	73
74	74
75	75
76	76
77	77
78	78
79	79
80	80
81	81
82	82
83	83
84	84
85	85
86	86
87	87
88	88
89	89
90	90
91	91
92	92
93	93
94	94
95	95
96	96
97	97
98	98
99	99
100	100

Figura 14. Esquema del procediment seguit en l'anàlisi d'expressió a partir d'artèries pulmonars de pacients am MPOC.

Anàlisi de la qualitat de l'ARN

De totes les mostres procedents dels experiments *in vivo* i dels pacients, es va analitzar la qualitat de l'ARN, revisada mitjançant l'observació de bandes corresponents a l'ARN ribosomal (18S i 28S) utilitzant el *LabChip Test d'Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Seguidament, es va mesurar la concentració de l'ARN mitjançant densitat òptica a 260 i 280 nm amb un espectrofotòmetre Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Anàlisi estadístic

Els valors són presentats com a mitjana \pm error estàndard (ES). Les determinacions es van realitzar en duplicats i de tres experiments independents per cada condició. Els dos grups de comparacions van ser analitzades utilitzant T-test d'aparellaments i el Mann-Whitney Rank Sum test per les dades que no segueixen una distribució normal. Les comparacions en grup es van fer mitjançant ANOVA d'una via o ANOVA de dues vies. Les comparacions Post-hoc aparellades es van fer seguin Student-Newman-Keuls test per les distribucions que segueixen la normalitat, mentre que el Kruskal-Wallis and Dunn test per les que no segueixen la normalitat. Per tots els processos, p-valor menor de 0.05 van ser considerats estadísticament significatius.

Resultats

Obtenció dels models *in vitro* de canvis fenotípics de la SMC

Primerament, es va obtenir un model de diferenciació de la SMC basat en el contacte cèl·lula-cèl·lula (Song et al., 1998). L'estat de diferenciació es va avaluar a D0, D2 i als sis dies de cultiu en confluència (D6) mitjançant l'augment de l'expressió, per qPCR, dels gens que codifiquen per proteïnes contràctils específics de SMC com la MyoCD, GATA6, Sm22- α , Calponina i Caldesmon. També es va evaluar la disminució de KLF4, un factor que bloqueja l'adquisició d'un fenotip contràctil (Kawai-Kowase and Owens, 2007) (Figura 15A). Per tal d'estudiar els nivells de proteïna es van realitzar immunofluorescències que permetien l'avaluació de la formació de fibres contràctils de α -SMA, Calponina i SM-MHC a les cèl·lules diferenciades. La disminució de l'estat proliferatiu característic de la SMC al llarg de la diferenciació va ser avaluat mitjançant l'expressió de ki67 i el nombre de cèl·lules en fase S. Els resultats mostren que al llarg de la diferenciació de la SMC, l'expressió dels marcadors contràctils augmenta, mentre que l'expressió de ki67 disminueix, al mateix temps que ho fan les cèl·lules que inicien la fase S (Figura 15B). Resultats que concorden amb l'obtenció d'un model de diferenciació de la SMC.

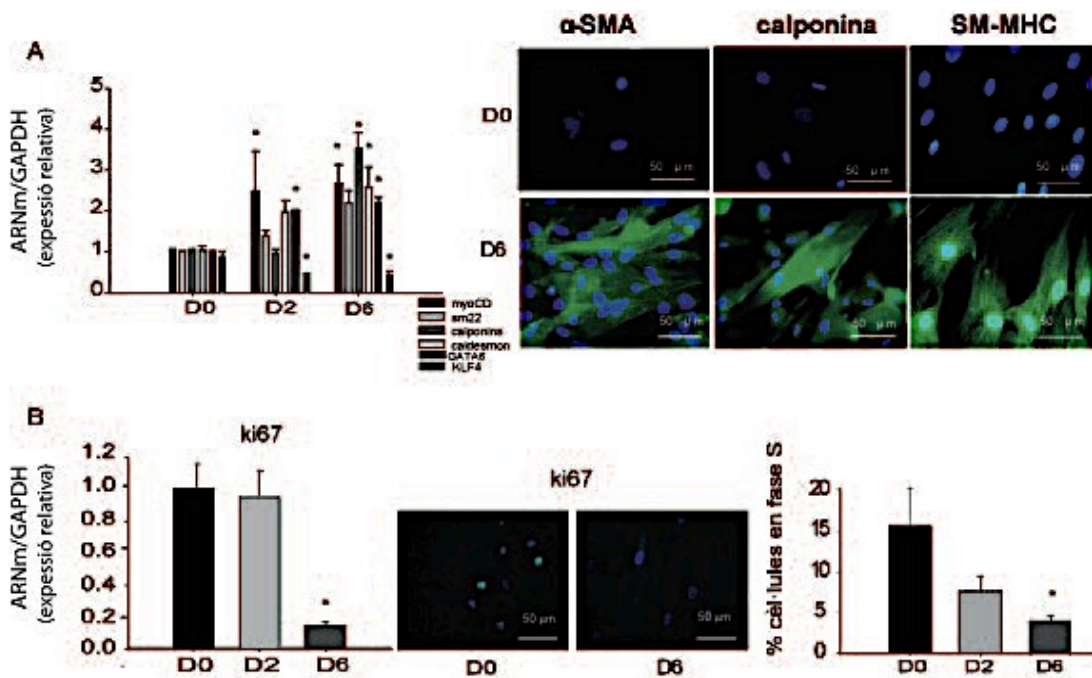


Figura 15. Models *in vitro* dels canvis de fenotip de la SMC. **A**, Anàlisi d'expressió dels principals marcadors de diferenciació i el factor de transcripció KLF4 per qPCR a D0, D2 and D6 (MyoCD, Sm22- α , calponin, Caldesmon, GATA6) i per, immunofluorescència (α -SMA, Calponina i SM-MHC) a D0 y D6. Els resultats mostren l'adquisició d'un fenotip diferenciat amb l'augment d'aquests marcadors, excepte pel factor KLF4 que disminueix la seva expressió. **B**, La

proliferació cel·lular disminueix a cèl·lules diferenciades tal i com es mostra per l'expressió de ki67 i per l'anàlisi de cicle cel·lular. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat. * $p < 0.05$ per ANOVA d'una via.

Es va avaluar si la confluència induïa senescència, i es va demostrar que l'estat de confluència no indueix senescència. Tal i com s'observa a la figura 16 no existeixen diferències significatives entre D0 i D6 de les cèl·lules en passatges 2-8. Les cèl·lules en passatge 12 tenen una elevada activitat β -galactosidasa, tal i com mostra l'augment de precipitat blau, i per tant sí són senescentes (Figura 16).

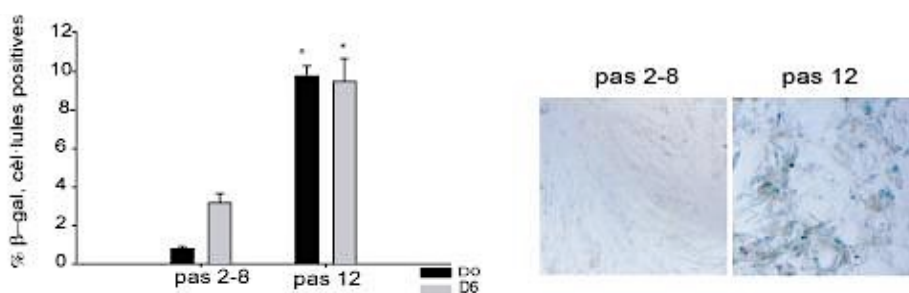


Figura 16. Anàlisi de la senescència cel·lular en un model de contacte cel·lular. Gràfic que mostra el percentatge de cèl·lules senescentes que expressen β -galactosidasa (cèl·lules positives per β -galactosidasa/cèl·lules totals). No es van observar diferències entre les cèl·lules a D0 i D6 a pase 2-8. Es van utilitzar cèl·lules a pase 12 com a control positiu de senescència. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat * $p < 0.05$ per ANOVA d'una via.

Com a model de dediferenciació es van utilitzar SMC totalment diferenciades (D6), les quals van ser estimulades amb TNF- α durant 48h. Es va demostrar que TNF- α disminueix l'expressió dels gens contràctils i estimula un increment de l'expressió de KLF4 (Figura 17A). La formació de fibres de α -SMA, Calponina i SM-MHC també disminueix. En el mateix sentit, l'augment de nombre de cèl·lules en fase S i l'increment d'expressió de ki67 van confirmar l'adquisició del fenotip proliferatiu de la SMC (Figura 17B).

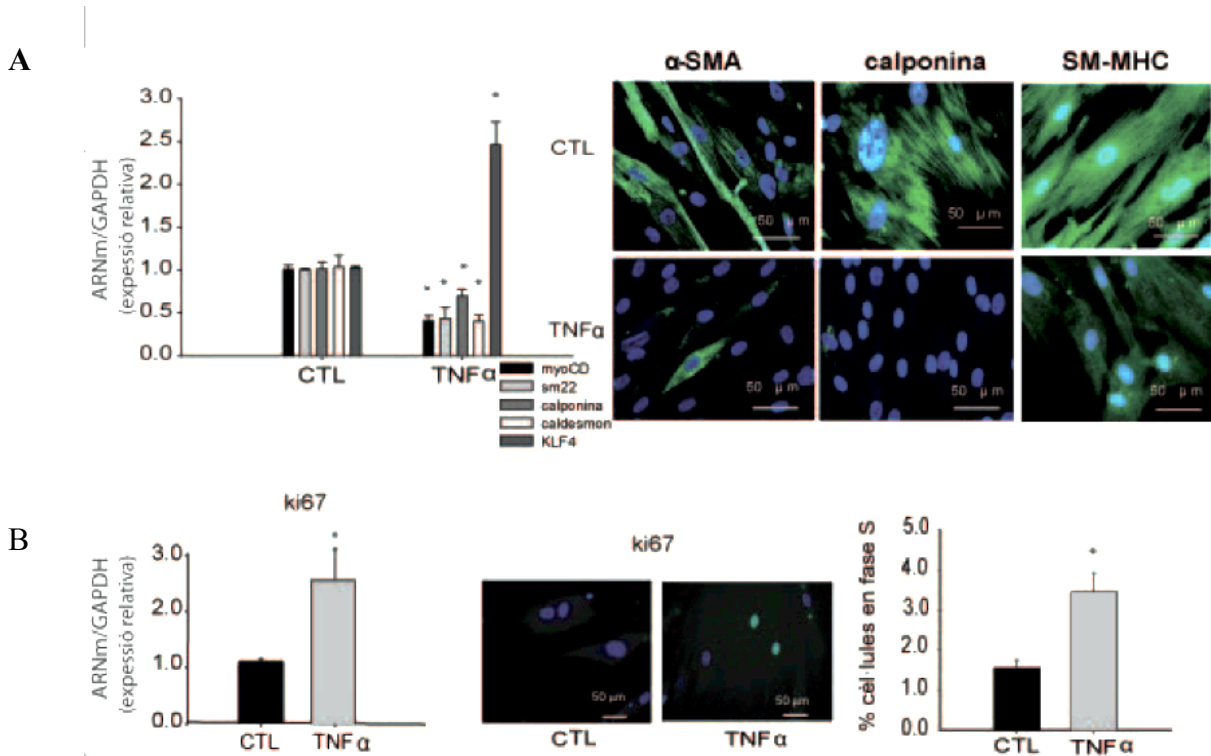


Figura 17. Models de dediferenciació amb TNF- α . **A**, Anàlisi dels marcadors de diferenciació de la SMC i KLF4 mitjançant qPCR i immunofluorescència de α -SMA, Calponina i SM-MHC. La disminució dels marcadors de diferenciació de la SMC mostra la dediferenciació de les SMC després del tractament amb TNF- α durant 48h. **B**, Nivells d'expressió gènica de Ki67 i cicle cel·lular que mostren un increment de la proliferació en les cèl·lules tractades amb TNF- α . Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat. * $p < 0.05$ per un t-test de dades aparellades.

Slug disminueix amb la diferenciació de la SMC

Es va avaluar l'expressió dels factors de transcripció Slug i Snail en els models de canvi fenotípic de SMC basats en el contacte cel·lular, induït per TGF β -1 i després de l'estimulació amb TNF- α . Slug i Snail disminueixen en els dos models de diferenciació de les SMC (Figura 19 i Figura 18A). L'avaluació de l'expressió de Slug i Snail a SMC estimulades amb TNF- α va resultar en un augment de Slug, però no Snail (Figura 18B). Aquests resultats estan en concordança amb que el fenotip proliferatiu de SMC es correlaciona amb un augment de l'expressió de Slug.

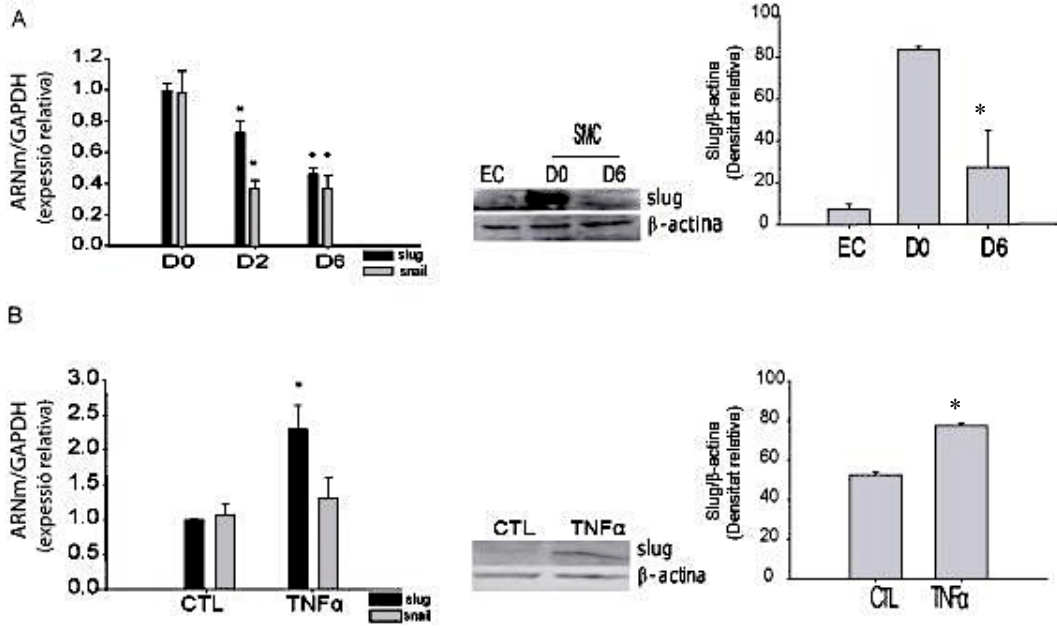


Figura 18. Slug augmenta a les SMC dediferenciades. **A**, Slug, i el seu factor de transcripció relacionat, Snail, disminueixen en SMC contràctils analitzat per RT-qPCR i western blot. **B**, RT-qPCR i western blot que mostren un increment de Slug després de l'estimulació amb TNF- α en SMC diferenciades. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat. *p < 0.05 per ANOVA d'una via i dades aparellades, respectivament.

TGF β -1 està descrit com un inductor potent de la diferenciació de la SMC. L'estimulació de SMC a D0 amb TGF β -1 durant 48h va induir un augment dels gens contràctils (Figura 19).

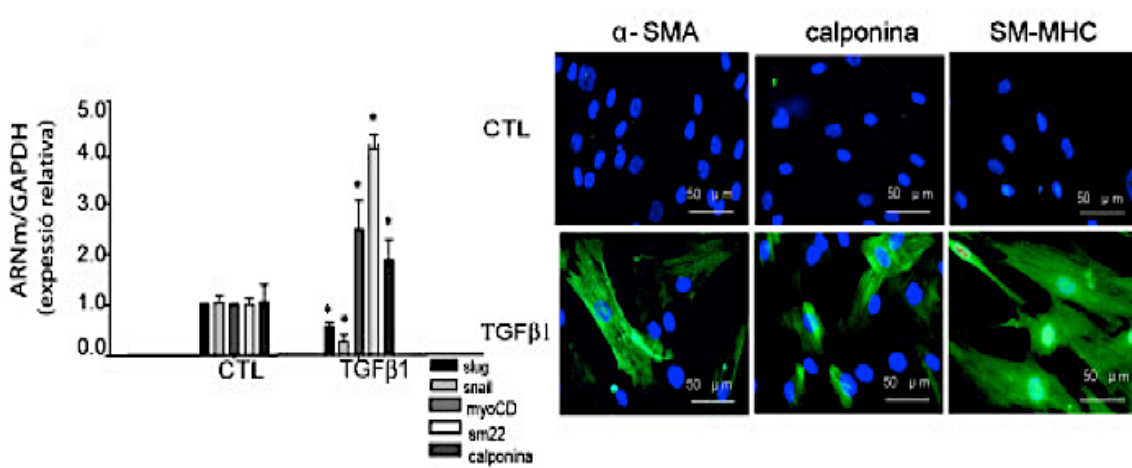


Figura 19. Model de diferenciació estimulat amb TGF β -1. RT-qPCR i immunofluorescència dels marcadors contràctils de SMC després de 48h de tractament. L'expressió de Slug i Snail van disminuir amb la diferenciació de la SMC mesurada per RT-qPCR. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat *p < 0.05 per un t-test de dades aparellades.

L'expressió de Slug regula la proliferació i la migració de la SMC

Es va estudiar si l'expressió de Slug estava associada amb canvis de fenotip de la SMC regulant el fenotip proliferatiu. Per fer-ho, es van realitzar experiments de guany i pèrdua de funció. Per la inhibició de Slug, es van utilitzar un *siPool* de Slug, un conjunt de siRNAs específics que cobreixen tot l'ARNm de Slug, els quals minimitzen els efectes secundaris de la inhibició d'altres gens (*off-targets effects*). L'eficiència de la transfecció va ser del 90% i es detalla a un gràfic a continuació (Figura 20).

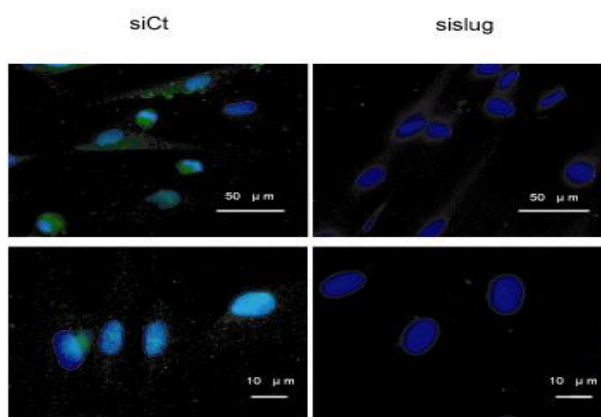


Figura 20. Eficiència de la inhibició de Slug amb siRNA. Imatge representativa d'immunofluorescència de Slug que demostra la disminució de Slug, al voltant del 90% respecte les cèl·lules control.

La disminució de Slug a cèl·lules dediferenciades (D0), és a dir, on la seva expressió és màxima, va provocar una disminució de l'expressió de ki67 i de les cèl·lules en fase S (Figura 21A) mostrant que Slug pot modular la proliferació de la SMC. D'altra banda, l'augment de l'expressió de Slug a la SMC mitjançant la transfecció d'un vector d'expressió a l'inici de la diferenciació va incrementar el nombre de cèl·lules proliferants (Figura 21B). En l'anàlisi de la migració: la inhibició de Slug va provocar una disminució de la migració, mentre que la sobreexpressió va produir-ne un augment

(Figura 21C i 21D), respectivament. Aquests resultats confirmen que el factor de transcripció Slug pot regular la migració i la proliferació de la SMC.

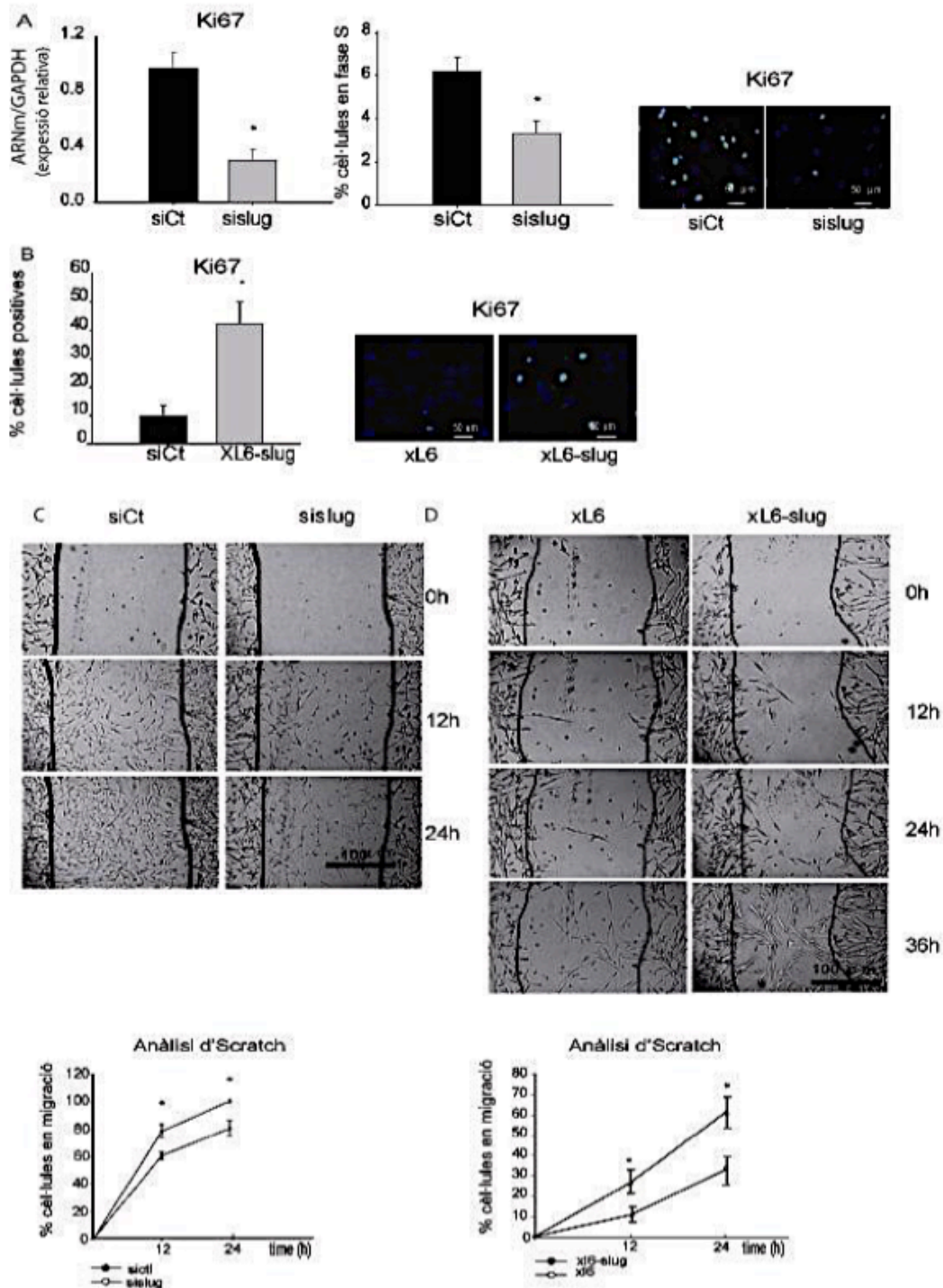


Figura 21. Slug regula la proliferació i la migració de la SMC. A, RT-qPCR i immunofluorescència que mostra que la inhibició de Slug promou la disminució de ki67, i una disminució en la fase S en l'anàlisi del cicle cel·lular. B, La sobreexpressió de Slug incrementa l'expressió de ki67. C i D, La migració cel·lular es va mesurar com a % de SMC migrades/temps. La inhibició de Slug va provocar una disminució de la taxa de migració mentre que la sobreexpressió va provocar-ne un augment. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat. * $p < 0.05$ per ANOVA d'una via.

L'expressió de Slug regula el canvi de fenotip de la SMC

Després de demostrar que Slug modulava la proliferació i la migració es van realitzar experiments per investigar si Slug regulava la diferenciació de la SMC. Primer, es va estudiar en el model de dediferenciació amb TNF- α . A SMC diferenciades a les quals s'induïa el canvi de fenotip amb TNF- α , la inhibició de Slug va restaurar l'expressió de gens contràctils com la MyoCD, GATA6, Calponina i KLF4, demostrant que Slug té un paper regulador clau d'aquest procés (Figura 22A). A les SMC estimulades mitjançant TGF β -1, on es va sobreexpressar Slug, hi va haver un bloqueig de l'expressió dels marcadors contràctils (Figura 22B i Figura 22C). Aquests resultats mostren que Slug es capaç d'incrementar la proliferació al mateix temps que també pot bloquejar la diferenciació.

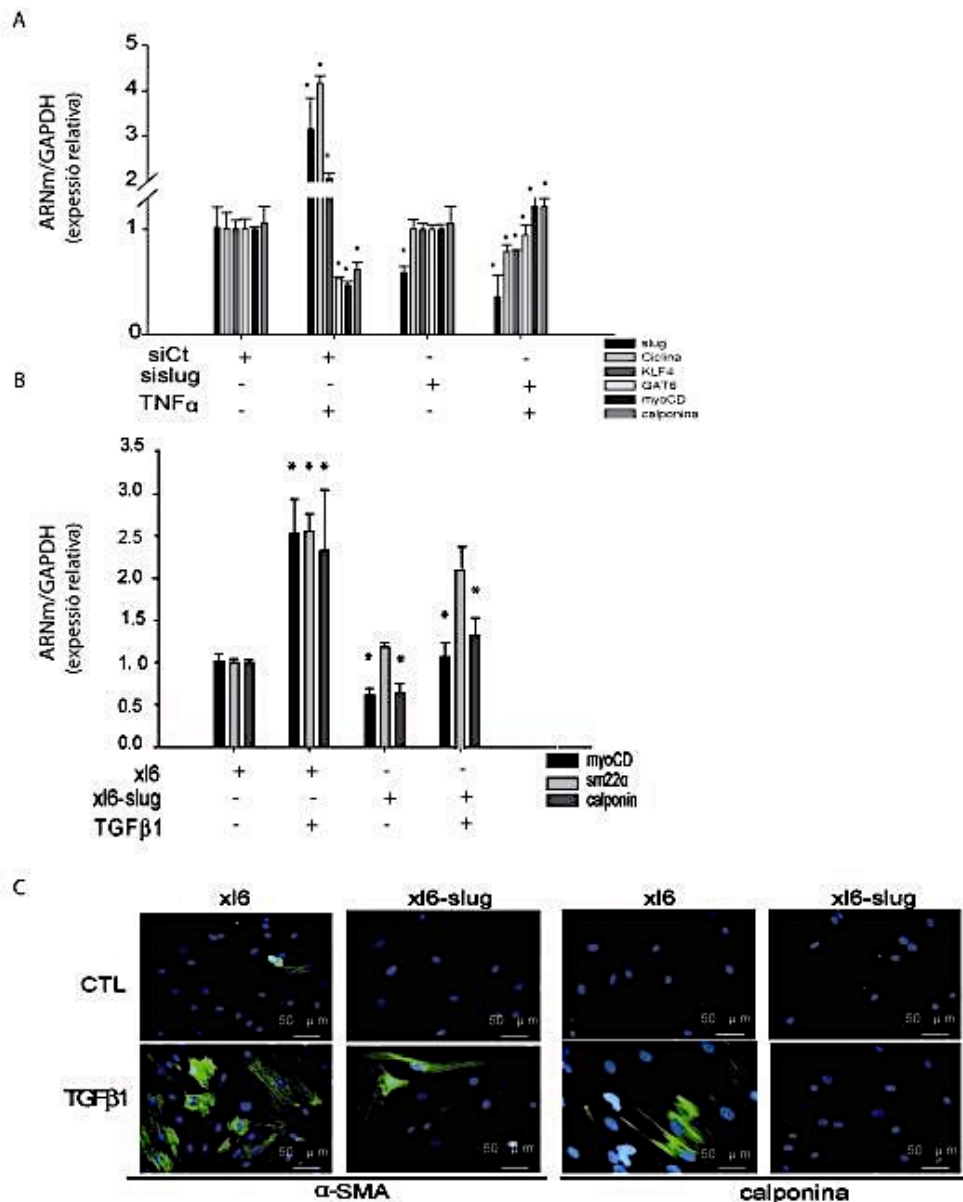


Figura 22. Slug regula ambdós fenotips: la dediferenciació induïda per TNF- α i la diferenciació per TGF β -1. **A**, L'increment de KLF4 i la disminució de marcadors contràctils de SMC analitzats per RT-qPCR mostren que la disminució de Slug inhibeix la dediferenciació de la SMC. **B-C**, La inducció dels marcadors contràctils per TGF β -1 és abolida en les cèl·lules on s'ha sobreexpressat Slug, analitzat per RT-qPCR (**B**) i immunofluorescència (**C**). Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat.* $p < 0.05$ per un t-test de dades aparellades.

Slug regula gens implicats en migració i proliferació cel·lular

Es va analitzar més en detall possibles gens diana de Slug. Per fer-ho, es va estudiar l'expressió gènica en cèl·lules control i cèl·lules transfectades amb *siPool*-Slug després de 48 hores mitjançant Affimetrix Human Gene 2.1 ST arrays. L'anàlisi GO de processos biològics va demostrar que una de les vies més alterades va ser la relacionada amb la proliferació cel·lular (Taula 3).

Term	Size	OddsRatio	Pvalue	GOBPID
cellular response to stimulus	4889	2,274211678	0,008233	GO:0051716
cell communication	4616	2,240660138	0,009362	GO:0007154
response to stress	2883	3,50146648	0,000142	GO:0006950
regulation of response to stimulus	2413	2,872706422	0,002001	GO:0048583
response to organic substance	1942	3,727620654	0,000189	GO:0010033
cell proliferation	1498	2,765109381	0,008739	GO:0008283
regulation of programmed cell death	1048	3,071960298	0,009225	GO:0043067
positive regulation of signal transduction	819	3,396551724	0,00838	GO:0009967
immune response	730	7,299385774	2,55E-05	GO:0006955
interspecies interaction between organisms	640	4,418888231	0,002165	GO:0044419
multi-organism cellular process	587	4,842672414	0,001319	GO:0044764
inflammatory response	478	4,987673344	0,002343	GO:0006954
regulation of defense response	438	5,466329966	0,001505	GO:0031347
regulation of cell motility	415	4,666427547	0,006607	GO:2000145
modification of morphology	350	5,573316283	0,003218	GO:0051817

Taula 3. Resum dels 15 top GO vies afectades després de la inhibició de Slug.

A més, l'anàlisi d'enriquiment de gens (gene set enrichment analysis (GSEA)), és a dir, estudi de les vies més modificades després de la inhibició de Slug, va mostrar un enriquiment de vies proliferatives (Figura 23B). De tots els gens modificats (Taula S1 de l'apartat Resultats addicionals) (Figura 23A) es va validar l'increment de la proteïna supressora de tumors àcid retinoic responedor 3 (RARRES3 o TIG3) després de la inhibició de Slug. També es va validar la disminució dels gens pro-proliferatius com la ciclina A2 (CCNA2) i la proteïna heparina d'unió al factor de creixement de l'epidermis (*heparin-binding epidermal growth factor (HBEGF)*) (Figura 23C). Curiosament,

ESTUDI 1. RESULTATS

RARRES3 té dos E-boxes totalment conservades al seu promotor, cosa que podria indicar que és diana directa de Slug.

L'increment de dues dianes ja descrites prèviament en altres treballs també van ser validades, la Claudina I (CCNI) i la queratina 19 (KRT19). Aquestes dues proteïnes són claus en l'adhesió cel·lular. La disminució d'ambdues, paral·lelament a l'augment de Slug, es pot relacionar amb l'augment de la migració. Snail per la banda, no es va veure modificat (Figura 23C).

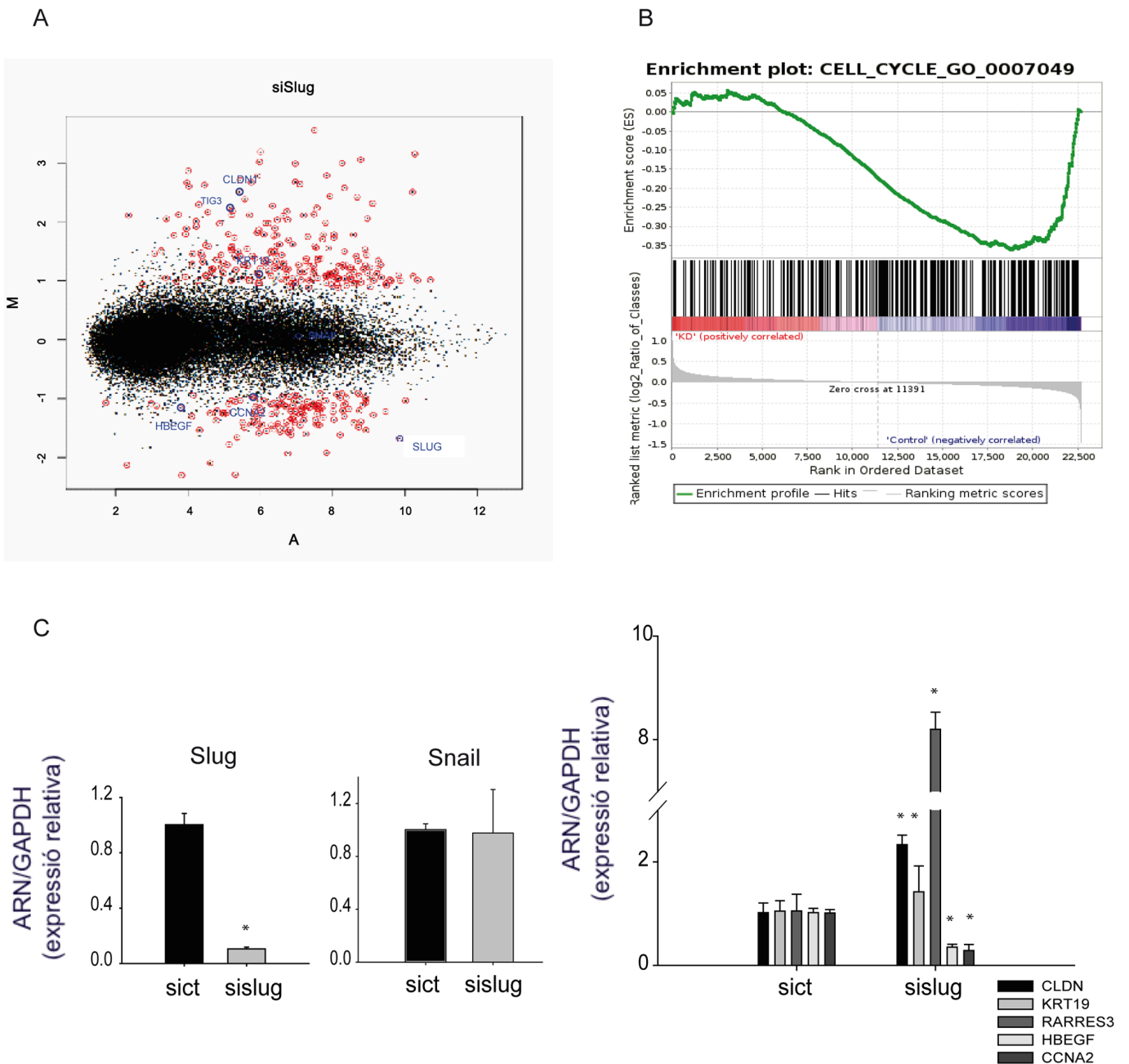


Figura 23. Slug regula gens relacionats amb vies de proliferació i migració **A**, Diagrama de punts que mostra el percentatge de canvi expressat en log2 després de la inhibició de Slug (eix resultats de l'estudi GSEA amb un enriquiment de gens proliferatius. La puntuació del

enriquiment va ser de -1,621 amb una FDR de 0.0. Existeix una alteració en gens relacionats amb cicle celular després de la disminució de Slug. **C**, Validació de l'expressió de Slug i Snail i altres gens significatius de l'array analitzats per RT-qPCR: es mostra una disminució de HBEGF, CCNA2 i un increment de CLDN1, RARRES3 i KRT9. * $p < 0.05$ per test de dades aparellades

L'expressió de Slug incrementa en un model murí d'hipertensió pulmonar

Es va utilitzar un model murí d'hipertensió pulmonar ja descrit prèviament (Ciuclan et al., 2011) on el tractament amb hipòxia crònica (CH) i hipòxia en combinació amb l'inhibidor del receptor de VEGF (VEGFR), SU5416 (CU+SU5416), reproduïx la hipertensió pulmonar observada en humans. La muscularització dels vasos (vasos totalment muscularitzats 75-100) va augmentar tant en el grup CH com el CH+SU5416 (Figura 24A). La hipertròfia del ventricle dret es va demostrar amb l'augment del índex de Fulton en els grups CH i CH+SU5416 (Figura 24B) i la pressió del ventricle dret (RVP) va incrementar també en els animals del grup CH i CH+SU5416 (Figura 24C). Aquests resultats mostren la obtenció d'un model animal d'hipertensió pulmonar. L'anàlisi d'expressió de Slug i Snail dels homogenats de pulmó d'aquests ratolins mitjançant qPCR va demostrar un augment de l'expressió de Slug al grup exposat a CH i CH+SU5416, mentre que Snail no va mostrar canvis significatius (Figura 24D). També es va observar una correlació positiva entre l'expressió de Slug tant amb la muscularització dels vasos com amb l'índex de Fulton (Figura 24E i Figura 24F), respectivament.

ESTUDI 1. RESULTATS

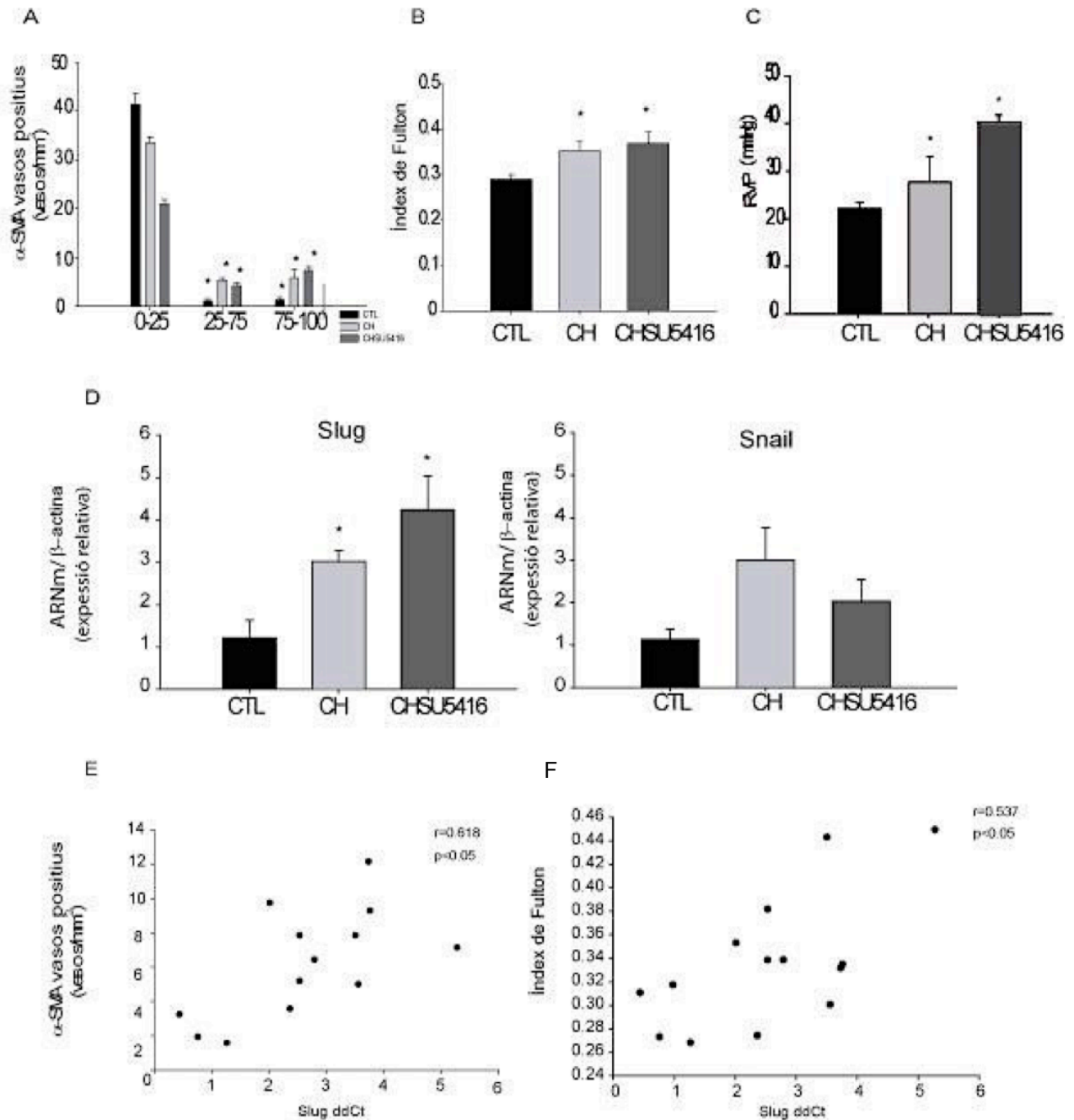


Figura 24. Anàlisi de l'expressió d' Slug als pulmons d'un model murí d'hipertensió pulmonar severa. **A**, Vasos intrapulmonars amb un diàmetre <50 µm parcialment muscularitzats (entre 25-75%) i totalment muscularitzats (entre 75-100%) al grup CTL (n=6), CH: animals exposats a hipoxia crònica (n = 5), CH+SU5416: els animals exposats a hipoxia crònica i SU5416 (n= 5) mostren més vasos positius per α-SMA en els grups CH i CH+SU5416. *p<0.05 per ANOVA d'una via. **B-C**, Índex de Fulton (**B**) i pressió ventricular dreta (*Right Right ventricular pressure* (RVP)) estan incrementades en els grups CH i CH+SU5416. **D**, RT-qPCR dels homogenats de pulmó mostren un increment de Slug, i no d'Snail en els grups exposats a CH i CH+SU5416 analitzats per ANOVA d'una via. **E**, Correlacions entre l'expressió de Slug (1/dCt) amb el nombre de vasos positius per α-SMA i (**F**), l'Índex de Fulton (feu notar que el baix 1/dCt, més elevada és l'expressió de Slug). *p < 0.05 per anàlisi Spearman.

Seguint amb aquests resultats, el tractament *in vitro* de SMC amb CH o mitjançant extracte de tabac (CSE) durant 24h va estimular l'expressió de Slug i el canvi de fenotip de la SMC (Figura 25A i 25B). Tanmateix, Snail no va augmentar després de l'estimulació amb CSE.

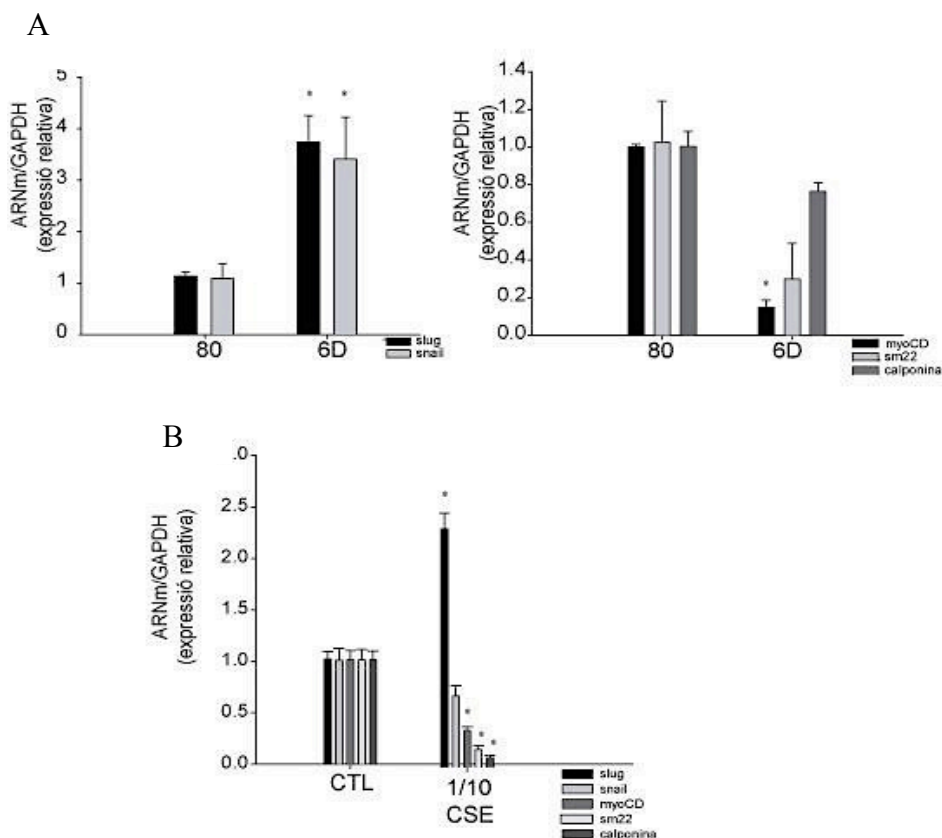


Figura 25. Expressió de Slug i Snail després de l'exposició a hipòxia o CSE. **A**, L'expressió de Slug i de Snail incrementa en SMC exposades a hipòxia correlacionant amb la dediferenciació tal i com mostra la disminució dels marcadors de SMC. **B**, L'estimulació amb CSE promou l'increment de Slug però no de Snail i la disminució dels marcadors contràctils. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat * $p < 0.05$ per un t-test de dades aparellades.

L'expressió de Slug augmenta en artèries humanes molt remodelades

Es va analitzar l'expressió de Slug a artèries pulmonars remodelades. Es van analitzar set pacients amb MPOC i onze pacients amb funció pulmonar normal (cinc no fumadors (NF) i set fumadors (F)). Els pacients amb MPOC presentaven un baix volum expiratori al primer segon (FEV_1), una relació FEV_1/FVC baixa i una capacitat de difusió del O_2 (Dlco) també disminuïda. Presentaven, també, una hipoxèmia mitjana (PaO_2) (Taula 4).

	NF (n=5)	F (n=7)	MPOC (n=7)
IMC (kg/m ²)	25 ± 5	27 ± 4	26 ± 3
FEV1 (%predictiu)	102 ± 15	90 ± 13	67 ± 11* [†]
FVC (%predictiu)	110 ± 26	119 ± 13	99 ± 19
FEV ₁ /FVC (%predictiu)	73 ± 5	74 ± 4	57 ± 9* [†]
Dlco (%predictiu)	92 ± 9	83 ± 8	71 ± 10*
PaO ₂ (mmHg)	90 ± 19	87 ± 11	75 ± 9*
Distribució R1\R2\R3	1\1\3	2\3\2	1\3\3

Taula 4 - Resum de les característiques de la població. *p < 0.05 NF vs MPOC, [†]p < 0.05 F vs MPOC

Els pacients es van dividir segons el grau de remodelat equitativament. Mitjançant l'anàlisi de RT-qPCR es va demostrar que l'expressió de Slug estava augmentada, mentre que la de Snail no mostrava canvis significatius amb el remodelat (Figura 26A). A més, l'expressió de Slug correlacionava positivament amb el grau de remodelat: artèries remodelades, analitzades segons el gruix de la íntima tenien una expressió més alta de Slug, és a dir, (ddCt) més baixa (Figura 26B). Seguidament, es va voler estudiar la localització de l'expressió de Slug a les artèries, tant per immunohistoquímica com per immunofluorescència. Aquest anàlisi va mostrar que Slug no s'expressa a les artèries poc remodelades, mentre que a les artèries molt remodelades la localització de Slug era principalment a la íntima i la capa mèdia de les artèries (Figura 26C i Figura 26D).

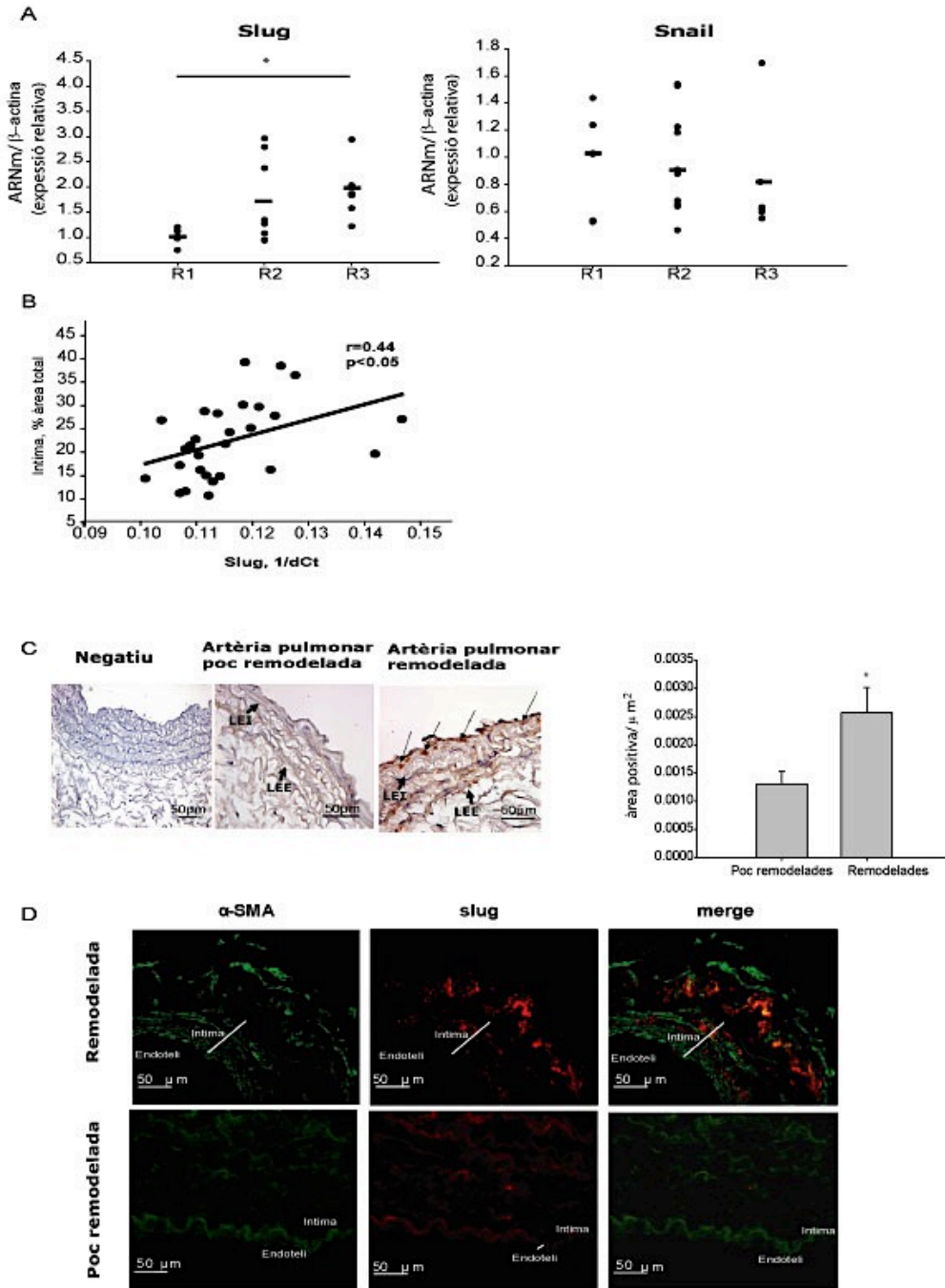


Figura 26. Anàlisi de l'expressió d'SLUG a SMC a artèries pulmonars humanes. **A**, Les mostres van ser classificades segons el grau de remodelat vascular: poc remodelades (R1), mitjanament remodelades (R2) i molt remodelades (R3). L'expressió de Slug i no Snail va resultar incrementada en el grup R3 respecte R1. * $p<0.05$ amb ANOVA d'una via. **B**, Existeix una correlació positiva de l'expressió de Slug (1/dCt) amb el gruix de la íntima arterial mesurada com a % de gruix íntima ($r=0.44$, $p<0.05$ per Pearson test). Baixos valors de 1/dCt significa més expressió. **C**, Imatges representatives de la tinció de Slug: L'expressió de Slug està localitzada a les cèl·lules de la íntima i mèdia arterial de les artèries pulmonars més remodelades (imatge dreta) comparat amb les poc remodelades (imatge del mig). El control negatiu es mostra a la imatge de la esquerra. Les àrees positives per Slug van ser quantificades a les artèries més remodelades ($n=3$) i poc remodelades ($n=4$) i normalitzades segons l'àrea de

la paret vascular. Les artèries altament remodelades mostren més cèl·lules positives per Slug comparat amb les artèries poc remodelades. * $p < 0.05$ per *t*-test. **D**, Localització de l'expressió de Slug per immunofluorescència de Slug (vermell), α -SMA (verd) i merged (groc). Slug predomina a la íntima i la mèdia de les artèries remodelades.

Slug es troba augmentat a les CE dels pacients amb artèries remodelades

Es va voler estudiar també l'expressió de Slug a la CE de les artèries remodelades. A la Figura 27 es mostra la colocalització de l'expressió de Slug (vermell) amb la cèl·lula endotelial positiva per CD31 (verd) en els pacients amb artèries remodelades. Els resultats mostren un marcatge positiu de Slug a la CE (groc) a les artèries remodelades indicant que aquestes cèl·lules poden estar patint una transdiferenciació a *SM-like cell*.

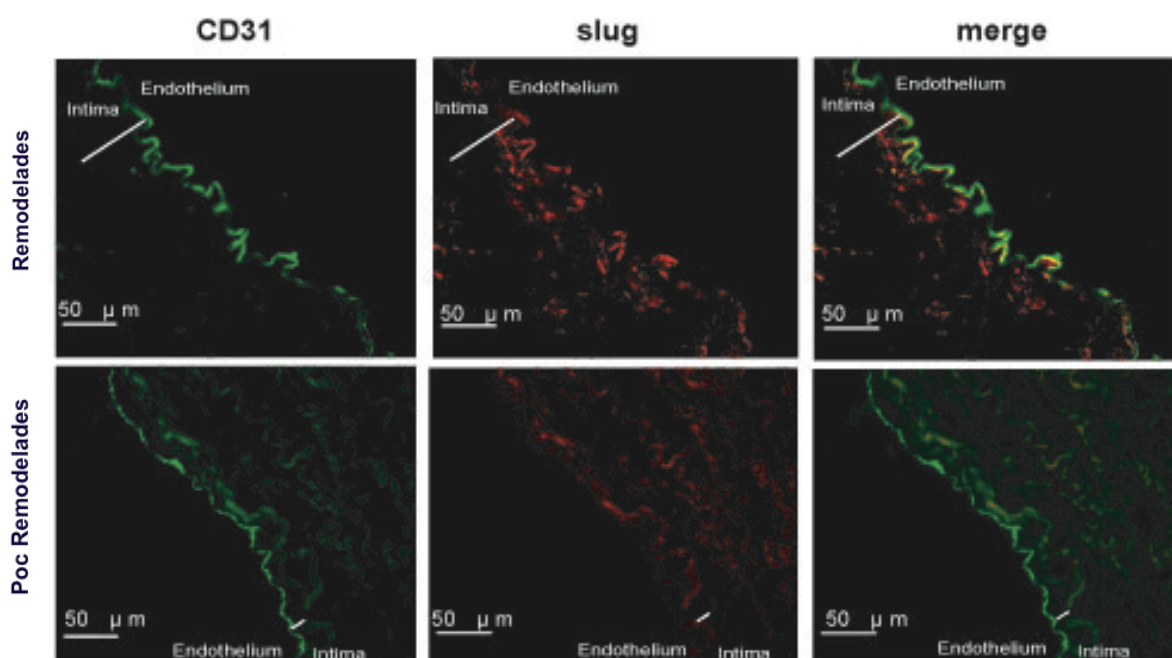


Figura 27. Anàlisi de l'expressió d'SLUG a EC a artèries pulmonars humanes. Marcatge de Slug (vermell), CD31 (verd) i merged (groc) analitzat per immunofluorescència. L'expressió de Slug predomina a les EC de les artèries més remodelades

Slug és un factor clau en el canvi de fenotip de la CE cap a *SMC-like cells*

Per tal d'esbrinar si efectivament s'estava produint un EnM T es va estimular la CE amb TNF- α . Els resultats mostren un increment de l'expressió de Slug i Snail i un canvi de morfologia de la CE fent-la més allargada (Figura 28A i Figura 28B). Aquests canvis anaven acompanyats d'una disminució dels marcadors endotelials, CD31 i VE-

Cadherina i un augment de marcadors mesenquimals com la α -SMA. Aquestes resultats van mostrar que la CE tractada amb TNF- α canviava el seu fenotip a mesenquimal (EnMT). Posteriorment, es va estudiar si la inhibició de Slug era capaç d'inhibir aquest procés i els resultats mostren que després de la transfecció, Slug, Snail i α -SMA disminueixen mentre que els marcadors endotelials augmenten, analitzats tant per qPCR com per immunofluorescència (Figura 28C i Figura 28D).

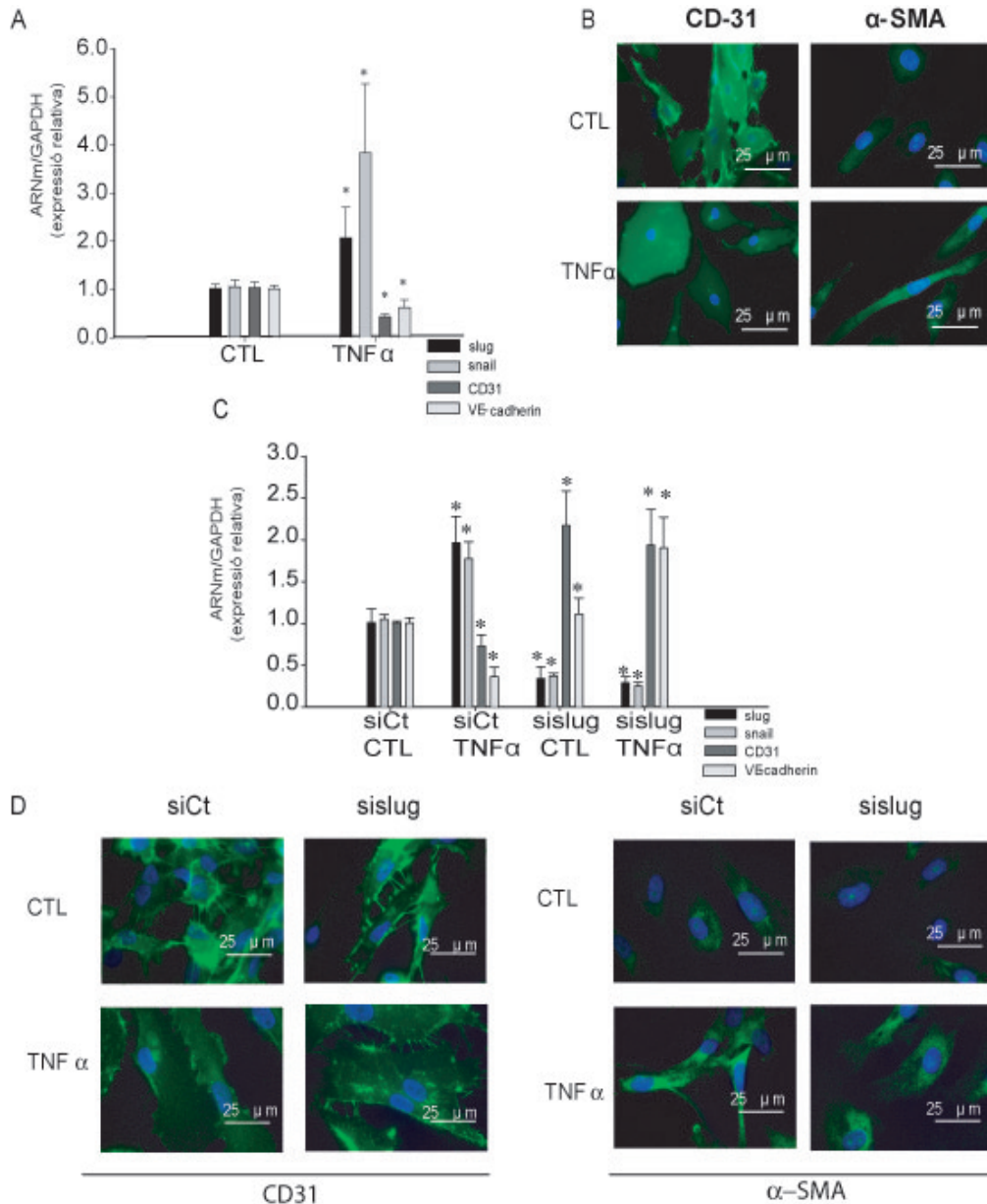


Figura 28. Slug és un factor clau en l'EnMT induïda per TNF- α . A, TNF- α induïx un augment de Slug , Snail i el marcador mesenquimal α -SMA mentre que CD31 i VE-cadherina disminueixen analitzat per qPCR i immunofluorescència. C-D, La inhibició de Slug bloqueja l'EnMT tal i com mostra la qPCR (C) i la immunofluorescència (D) amb l'augment dels marcadors endotelials i la disminució α -SMA. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat. *p<0.05 amb un t-test de dades aparellades.

RESUM DE RESULTATS PRIMER TREBALL

- Primerament, es va obtenir un model de diferenciació de la SMC basat en el contacte cèl·lula, confirmat per l'augment dels marcadors contràctils i una disminució de la proliferació. En aquest model, Slug i Snail disminueixen durant la diferenciació de la SMC, de la mateixa manera que també ho fan en un model d'inducció mitjançant TGF β -1. Així doncs, aquests gens, són específics del fenotip proliferatiu i dediferenciat de la SMC.
- TNF- α és capaç d'induir el canvi de fenotip de la SMC amb una disminució dels gens contràctils, mitjançant l'expressió de Slug i no d'Snail. En el mateix sentit, la inhibició de Slug després de l'estimulació amb TNF- α va provocar un augment dels gens contràctils demostrant el paper clau d'aquest factor de transcripció en la modulació fenotípica.
- La sobreexpressió de Slug en un model de diferenciació induït amb TGF β -1, va bloquejar la diferenciació de la SMC. D'altra banda, la disminució de Slug en SMC en estat proliferatiu no va ser capaç d'induir l'expressió dels marcadors contràctils. Slug podria estar actuant com a repressor més que com a inductor de la diferenciació de la SMC.
- S'han demostrat canvis en la proliferació després de la inhibició i la sobreexpressió de Slug. La inhibició provoca una disminució de la proliferació i la migració, mentre que la sobreexpressió un augment d'ambdós paràmetres.
- Slug té com a gens diana, majoritàriament, gens reguladors de la proliferació i l'adhesió cel·lular. Entre ells toquem la Claudina 1, la Queratina 19 o la proteïna supressora de tumors RARRES.
- En un model murí d'hipertensió pulmonar (CH+SU5416), l'expressió de Slug la trobem incrementada en el teixit pulmonar. Existeix, a més, una correlació positiva amb la muscularització dels vasos i la hipertròfia del ventricle dret,

utilitzada com a signe d'hipertensió pulmonar. Més expressió de Slug, més muscularització de vasos i més hipertròfia del ventricle dret.

- Slug també està augmentat en les artèries remodelades dels pacients amb MPOC. A més, l'expressió de Slug correlaciona positivament amb l'engruiximent de la íntima. La localització de la seva expressió la trobem principalment, a la íntima de les artèries hiperplàsiques, les SMC de la mèdia i les CE dels pacients amb les artèries més remodelades, suggerint un rol important en el desenvolupament del remodelat vascular.
- Els pacients amb artèries remodelades tenen augmentats els nivells de Slug a la CE. TNF- α es capaç d'induir un EnMT tal i com indica l'augment de l'expressió de Slug i Snail i marcadors mesenquimals com la α -SMA, i la disminució de marcadors endotelials com la VE-Cadheria i el CD31. A més, la inhibició de Slug va bloquejar la transdiferenciació de la CE.

A continuació a la figura 29 es detalla un esquema del mecanisme descrit en aquest primer treball.

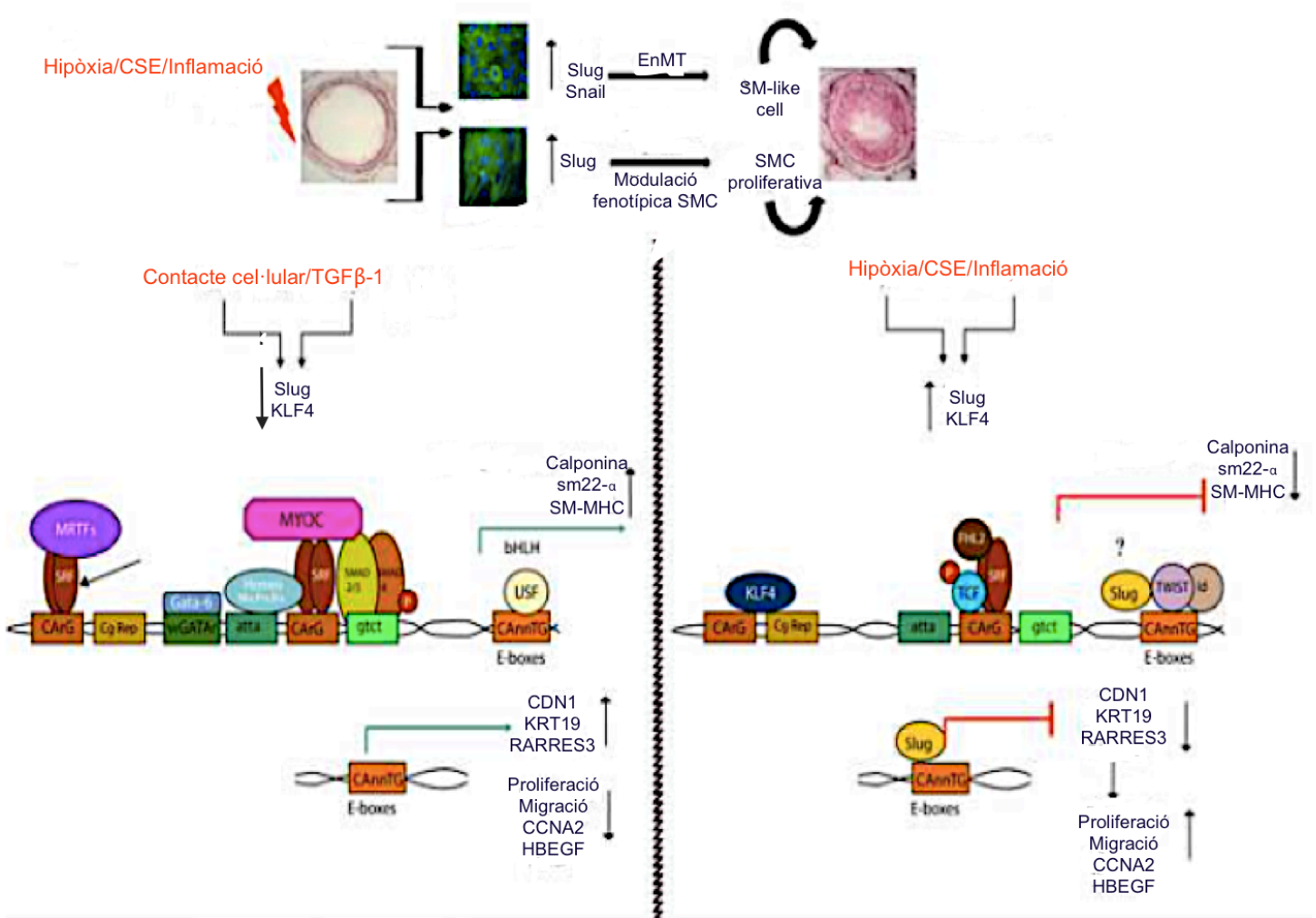


Figura 29. Resum del mecanisme dirigit per Slug en la diferenciació de la SMC i el remodelat vascular. Estímuls com la hipòxia, el tabac o la inflamació provoquen a la CE de la artèria pulmonar, un augment de Slug i Snail que conduiran a la transició de la CE a *SM-like cell*. A la SMC arterial aquests estímuls (hipòxia, tabac i inflamació) provoquen un augment de Slug que induirà la modulació fenotípica de la SMC, és a dir, cap a una SMC proliferativa. Específicament, en condicions normals, Slug està disminuït. Si Slug està inhibit, les E-boxes dels promotors dels gens contràctils es troben ocupades per activadors de la família de *bHLH*, com USF, que estimula la transcripció de gens contràctils. D'altra banda, en els promotors de les proteïnes d'adhesió com la claudina, KRT19 i supressors de tumors com RARRES3 estan lliures indicant que existeix expressió d'aquestes proteïnes. En condicions d'hipòxia, CSE o inflamació on s'indueix l'expressió d'Slug i KLF4, Slug desplaçarà els activadors *bHLH* i ambdós ocuparan les E-boxes dels gens contràctils reprimint la seva expressió. Slug ocuparà també les E-boxes dels promotors de les proteïnes d'adhesió reprimint la seva expressió i promouen, secundàriament, l'expressió de gens proliferatius com CCNA2 i HBEGF.

Estudi 2. Expressió de miRNAs durant el el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC.

COPD-associated pulmonary vascular remodeling is linked to miRNA dysregulation. Estudi enviat a publicar a l'American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.

FI 13,2, 1Q

Material i mètodes

Expressió de miRNAs a l'artèria pulmonar

Es va seguir el mateix esquema del procediment anterior (pàg 56). Breument, el teixit d'artèria pulmonar (50 mg) congelat amb RNAlater® (Ambion, Thermo Fischer Scientific), es va homogeneïtzar amb un politró *Omni Tissue Homogenizer TH* (Omni International) amb el reactiu Trizol® (Invitrogen, LifeTechnologies, Thermo Fischer Scientific). Després de purificar l'ARN per separació de la fase aquosa mitjançant centrifugació amb cloroform (Sigma-Aldrich), l'ARN es va precipitar amb 2-propanolol 100% (Sigma-Aldrich) ON. El precipitat es va a rentar amb etanol 70% y posteriorment es va a resuspendre amb H₂O lliure de RNAses.

Després de l'extracció de ARN, es va realitzar la retrotranscripció utilitzant 10 ng de ARN total utilitzant el *Taqman miRNA reverse transcription Kit* amb els primers Megaplex® (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) seguint les instruccions del fabricant. Posteriorment, es van utilitzar les plaques *Taqman array human miRNA card A* (miRNAs prèviament descrits) i *B* (miRNAs no coneguts) *set v3.0* (TLDA) (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific) per fer l'anàlisi d'expressió de miRNAs.

Anàlisi de xarxes

Mitjançant un software de tipus Bioconductor, és a dir, un software creat amb llenguatge R que s'encarrega del anàlisi estadístic de dades d'origen genòmic, es va realitzar un anàlisi de xarxes o d'interaccions gèniques. En el nostre cas es va utilitzar el biocoductor *limma* (Huber et al., 2015) (Ritchie et al., 2015).

Es van estudiar els miRNAs amb $p < 0.05$ i un percentatge de canvi (fold change) major de 1,5. Després amb la utilització de la base de dades *TargetScanHuman 7.0* es van obtenir els gens diana d'aquests miRNAs.

Pels miRNAs que tenien dianes amb llocs conservats es van considerar totes les dianes, per la resta es van incloure només les dianes amb una puntuació $\leq 0,3$. Els gens diana van ser analitzats seguidament amb la base dades *Gene Ontology (GO)* (www.geneontology.org/). Aquest anàlisi es basa en la detecció de grups de gens relacionats

amb el mateixos processos cel·lulars i ens vam centrar en els que presentaven una anotació positiva per la proliferació cel·lular. Així es va obtenir un mapa d'interaccions, amb els miRNAs diferencialment expressats a la MPOC i les seves possibles dianes relacionades amb processos proliferatius (Wang and Loscalzo, 2016) .

Models cel·lulars

S'ha utilitzat el mateix model de diferenciació de SMC descrit en el primer treball (pàg 54-55). L'avaluació dels diferents fenotips de la SMC es va dur a terme mitjançant la avaluació de l'expressió de marcadors contràctils, la proliferació i la migració de la SMC tal i com es va fer en el primer treball (pàg 55).

Anàlisi d'expressió gènica

A partir de ARN i mitjançant qPCR i western blots ja descrits en el primer estudi (pàg 56 i pàg 60) . A continuació a la Taula 6 es detallen els primers utilitzats en aquest segon estudi.

Gen	Seqüència
Calponin F	CACGACATTTTTGAGGCCAA
Calponin R	TTTCCTTTCGTCTTCGCCAT
Sm22- α - α v2 F	GGAAGCCTTCTTCCCCAGA
Sm22- α - α v2 R	TCCAGCTCCTCGTCATACTTCTT
MyoCD F	GCACCAAGCTCAGCTTAAGGA
MyoCD R	TGGGAGTGGGCCTGGTTT
GAPDH F	CATCACCATCTTCCAGGAGC
GAPDH R	TGGACTCCACGACGTACTION
β actin F	CGGAACGCCTCATTGCC
β actin R	ACCCACACTGTGCCCATCTA
Ki67 F	GCAGCCTTAACTGTGACACTTGC
Ki67 R	GCCACCGTGCCCTGG
E2F1 F	GAGAACAGGGCCACTGACTC
E2F1 R	GTTCTTGCTCCAGGCTGAGT
IGF1 F	GTGGAGACAGGGGCTTTTATT
IGF1 R	CTCCAGCCTCCTTAGATCACA

Taula 5 - Cebadors o Primers utilitzats en el segon estudi 5'-3'

Northern Blotting

L'anàlisi d'expressió de miRNAs es va realitzar mitjançant Northern Blot. Aquest assaig es basa en la separació de l'ARN de diferent tamany mitjançant electroforesi i una posterior transferència a una membrana on s'hibridarà una sonda que marcarà el nostre miRNA d'interès. Breument, 10-15 ug de ARN total es van separar en gels desnaturitzant d'Urea al 12% (UreaGel System, National diagnostics, Atlanta, GA). Com a marcador de pes molecular es va marcar ribonucleòtids amb longitud de 19, 21 i 24 nt amb fòsfor radioactiu P32. Després de l'electroforesi d'una hora de durada i a 350-450V l'ARN i en TBE buffer (90 mM Tris-Borat i 2 mM EDTA a ph 8) es va transferir en semisec a membranes de nitrocel·lulosa (GE Healthcare) a 20V durant 30 minuts. La membrana va ser fixada amb EDC (0,16M 1-etil-3-(dimetilamina propil)carbodimida a 0,13M 1-metilimidazol ph8) i incubada durant una hora a 50°C. La membrana es va rentar amb aigua abans de la prehibridació. La hibridació es va dur a terme a 50°C, amb una sonda prèviament marcada radioactivament, ON en solució d'hibridació (20x SSC (3M NaCl i 0,3M CitratNa), 1M Na₂HPO₄ ph 7,2 10% SDS i 50X Denhardt's solution). La sonda va ser marcada a una concentració de 20 pmolar d'ADN amb 20 iCi de P32 mitjançant l'enzim T4 PNK (Fermentas, Thermo Fischer Scientific) i purificada mitjançant columnes de purificació G-25 (GE Healthcare). La membrana es va rentar amb NB buffer de rentat I (5x SSC i 1%SDS, NB buffer de rentat II (1X SSC i 1% SDS) i forrada amb paper transparent pel seu revelat mitjançant l'escàner de PMI (Bio-rad).

Inhibició d'expressió miRNAs

Per l'anàlisi funcional del miRNA-197 es va utilitzar 2' *O*-metil antisens oligonucleòtids (2'Ome-miRs) sintetitzats químicament (Pierce Chemical, Thermo Fisher Scientific). Aquesta addició del grup metil a la ribosa 2' de la cadena de ARN li dóna estabilitat i el protegeix de la degradació. 50.000 SMC es van transfectar amb 40 nM d'inhibidor a una proporció 1:1 amb Lipofectamina 2000 (Invitrogen) i diluït en optiMEM. Es van sembrar les cèl·lules en plaques de 24 pous incubades en medi complet fins la seva recollida.

Assaig de Luciferasa: *Luciferase reporter assay*

Es va utilitzar el vector pMiR-RL miRNA reporter amb l'insert de la regió 3'UTR del gen E2F1 i el renilla luciferasa com a control de transfecció. Per generar el pMIR-REPORT (Ambion, Thermo Fisher Scientific): el gen renilla-luciferasa amb un promotor SV40 i una cua poliA va ser amplificat del plàsmid pRL-SV40 (Promega, Madison, WI) i clonat al SspI del pMIR-REPORT. També el promotor HSV-TK va ser amplificat i clonat procedent del vector pRL-TK i insertat al pMIR-REPORTER per substituir el promotor del CMV del gen luciferasa. La construcció del vector luciferasa es va fer a partir de la clonació de la regió 3'UTR del gen E2F1 al pMIR-RL descrit anteriorment. L'extrem 3'UTR va ser amplificat i insertat al llocs flanquejats per SacI i NaeI del pMIR-RL. Els primers utilitzats van ser: E2F1-Sac-for: 5' CGCTACGCGTCAGGGTTGGAGGGACCAGGGT-3' i E2F1-NaeI-rev: 5'-CGCTGCCGGCAACGTCATCAAAATATTTATTA-3'. La transfecció dels plàsmids pels assajos de luciferasa es van realitzar amb 50 ng pMIR-RL-E2F1 3'UTR i 40 pmol de 2'Ome-miR-197 inhibidor per 20000 cèl·lules en una placa de 48 pous utilitzant lipofectamina 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), tal i com es descriu anteriorment.

Anàlisi estadístic

Els valors són presentats com a mitjana \pm error estàndard (ES). Les determinacions es van realitzar en duplicats i de tres experiments independents per cada condició. Els dos grups de comparacions van ser analitzades utilitzant T-test d'aparellaments i el Mann-Whitney Rank Sum test per les dades que no segueixen una distribució normal. Comparacions en grup es van fer mitjançant ANOVA d'una via. Les comparacions Post-hoc aparellades es van fer seguin Student-Newman-Keuls test per les distribucions que segueixen la normalitat, mentre que el Kruskal-Wallis and Dunn test per les que no segueixen la normalitat. Per tots els processos, p-valor menor de 0.05 van ser considerats estadísticament significatius.

Resultats

Expressió de miRNAs durant el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC

Existeix un perfil específic d'expressió de miRNAs a les artèries pulmonars de pacients amb MPOC

Es va analitzar l'expressió de 381 miRNAs en homogenats d'artèria pulmonar obtinguts de pacients amb MPOC, F i NF. Les característiques dels pacients es mostren a la taula següent:

	No Fumadors (n=7)	Fumadors (n=9)	MPOC (n=12)
Edat	63 ± 11	64 ± 10	67 ± 9
Sexe masculí, n (%)	4 (50)	8 (88) ‡	13 (100) *
Pes (kg)	64 ± 7	73 ± 8	70 ± 8
Alçada (cm)	161 ± 8	164 ± 8	169 ± 5
IMC	25 ± 3	28 ± 4	25 ± 2
FEV₁ (% predictiu)	100 ± 6	90 ± 22	64 ± 13 *†
FVC (% predictiu)	96 ± 7	93 ± 12	84 ± 13 *
FEV₁/FVC (% predictiu)	77 ± 7	70 ± 15	55 ± 8 *†
Dosi tabàquica (paquets/any)	5 ± 8	59 ± 27 ‡	77 ± 29 *
DL_{CO} (% predictiu)	89 ± 20	75 ± 31	66 ± 11 *
PaO₂ (mmHg)	88 ± 15	81 ± 14	79 ± 16

Taula 6. Característiques de la població. *p < 0.05 NF vs MPOC, † p < 0.05 F vs MPOC i ‡ p < 0.05 NF vs F.

Una vegada realitzades les TLDA's i per obtenir els valors d'expressió dels miRNAs, es va utilitzar el bioconductor d'anàlisi estadístic *Limma*. Es va demostrar que comparant els pacients MPOC respecte els NF hi havia un augment d'expressió del miR-98, miR-139-5p, miR-146b-5p i miR-451, mentre existia una disminució de miR-197, miR-204, miR485-3p i miR-627 (Figura 30A i Figura 30B). L'expressió dels miRNAs de les artèries pulmonars dels pacients F respecte dels NF, segueixen el mateix patró que els MPOC però sense arribar a obtenir diferències significatives. Només s'obtenien diferències

ESTUDI 2. RESULTATS

significatives per l'expressió de miR- 139-5p i miR-146b-5p quan s'anализava F vs MPOC (Figura 30A). A la Taula S2 de l'apartat Resultats addicionals estan descrits tots els miRNAs estudiats.

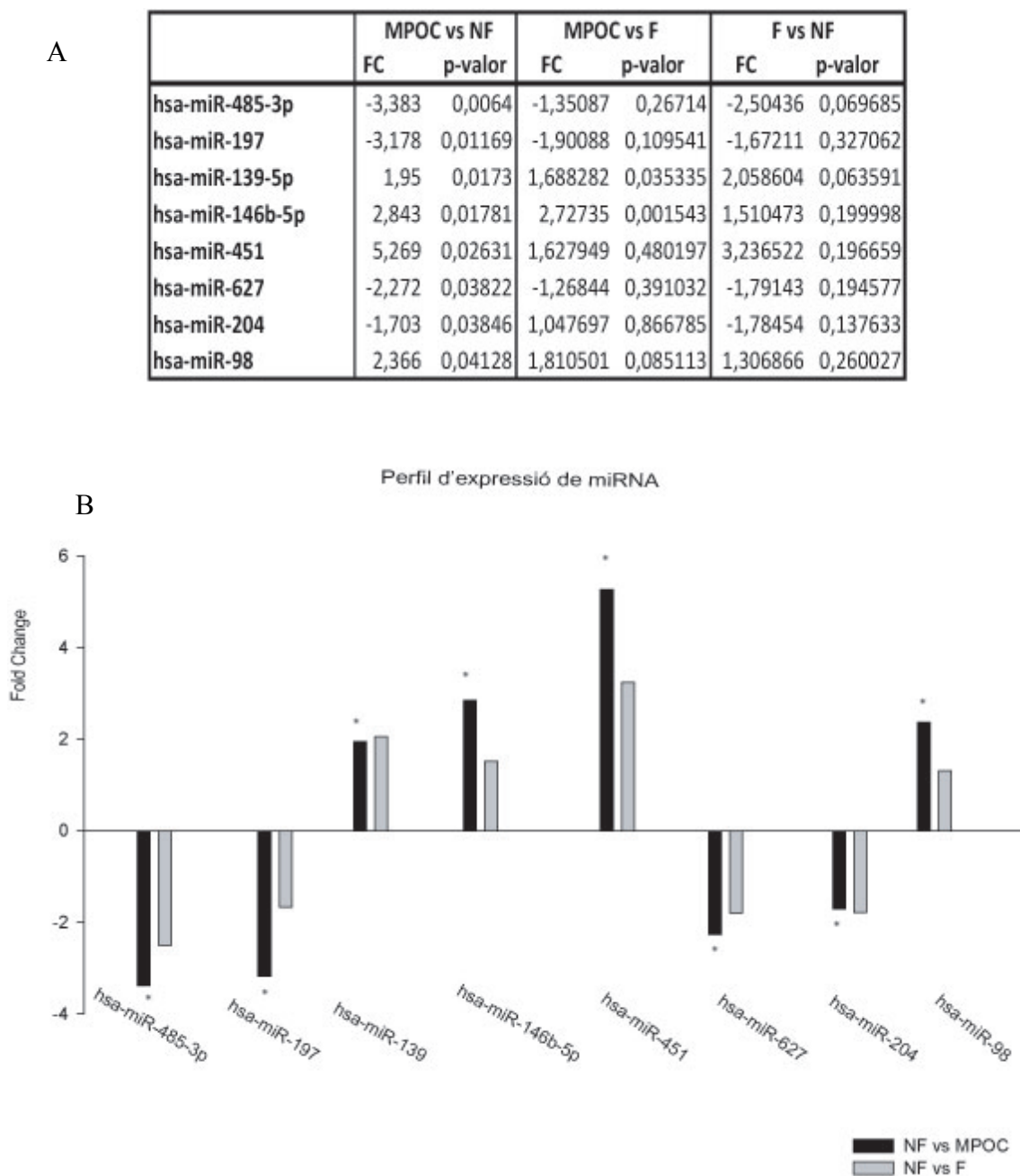


Figura 30. Perfil d'expressió de miRNAs en els pacients amb MPOC, F i NF. A, Taula que mostra els 8 miRNAs diferencialment expressats a les artèries pulmonars humanes dels pacients amb MPOC. S'expressa en fold change o percentatge de canvi dels MPOC respecte als NF i els F respecte als NF. **B,** Gràfic que mostra el *fold change* dels 8 miRNAs principals diferencialment expressats a les artèries humanes. * $p < 0.05$

Anàlisi de xarxes i interaccions

Per tal de determinar quines eren les dianes d'aquests miRNAs i quines eren les principals vies de senyalització que regulaven, es va fer un anàlisi de xarxes o interaccions. Seguint la base de dades *TargetScan*, on apareixen totes les dianes possibles per cada miRNA, nosaltres ens vam focalitzar en l'anàlisi d'aquelles dianes relacionades amb vies de proliferació cel·lular. Específicament, i tal i com es pot observar a la Figura 31, existeix un patró de miRNAs diferencialment expressats als MPOC (cercles grocs) que regulen un conjunt de gens diana relacionats amb vies proliferatives (cercles blaus) (Figura 31).

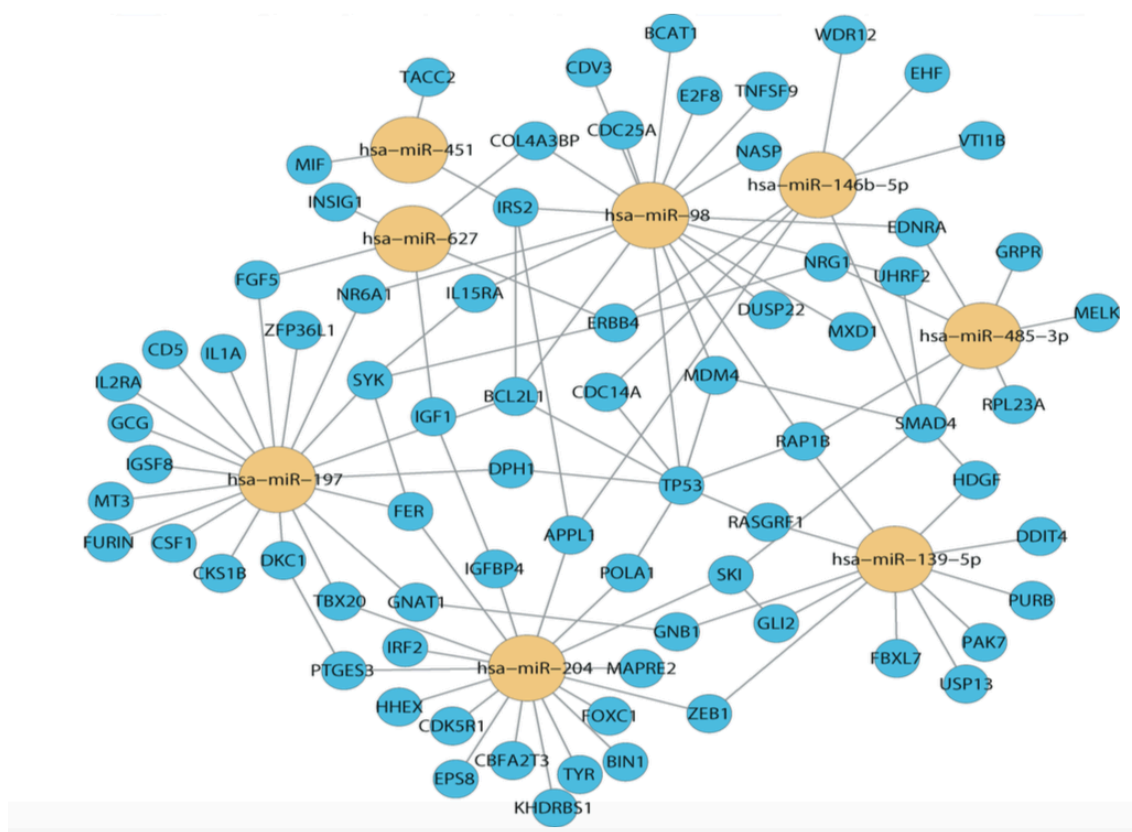


Figura 31. Xarxa d'interaccions entre miRNA a la MPOC. Els cercles grocs representen els miRNAs diferencialment expressats, mentre que els blaus representen les seves dianes. Totes les dianes estan seleccionades per la seva implicació en la proliferació cel·lular.

Correlació de l'expressió de miRNAs amb el remodelat vascular i el FEV₁

Es va analitzar si aquests miRNAs diferencialment expressats guardaven relació amb paràmetres de la malaltia i el remodelat vascular. De tots ells, els miR-139 i miR-485, van correlacionar amb FEV₁ (R=0.403, p≤0.034 i R=-0.464, p≤0.016 respectiva) (Figura 32A). L'expressió de miR-197 correlaciona amb la FEV₁ (R=-0,541, p≤0,003), menys expressió del miRNA (Cts altes) es relaciona amb menys FEV₁ i mostra una correlació inversa amb el grau de remodelat vascular mesurat com a percentatge d'íntima (R=0,41 p<0,023), menys expressió del miRNA es relaciona amb una íntima més engruixida (Figura 32B). L'expressió del miR-98 i miR-451 també correlacionaven amb FEV₁ (R=0.453, p≤0.017 i R=0.380, p≤ 0.040), respectivament i amb l'engruiximent de la íntima (R= -0.601, p≤ 0.003 i R=-0.52, p≤ 0.012), respectivament (Figura 32C i Figura 32D). Aquests miRNAs doncs són els que mostren un significat etiopatològic de la seva expressió amb la MPOC.

Expressió de miRNAs durant el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC

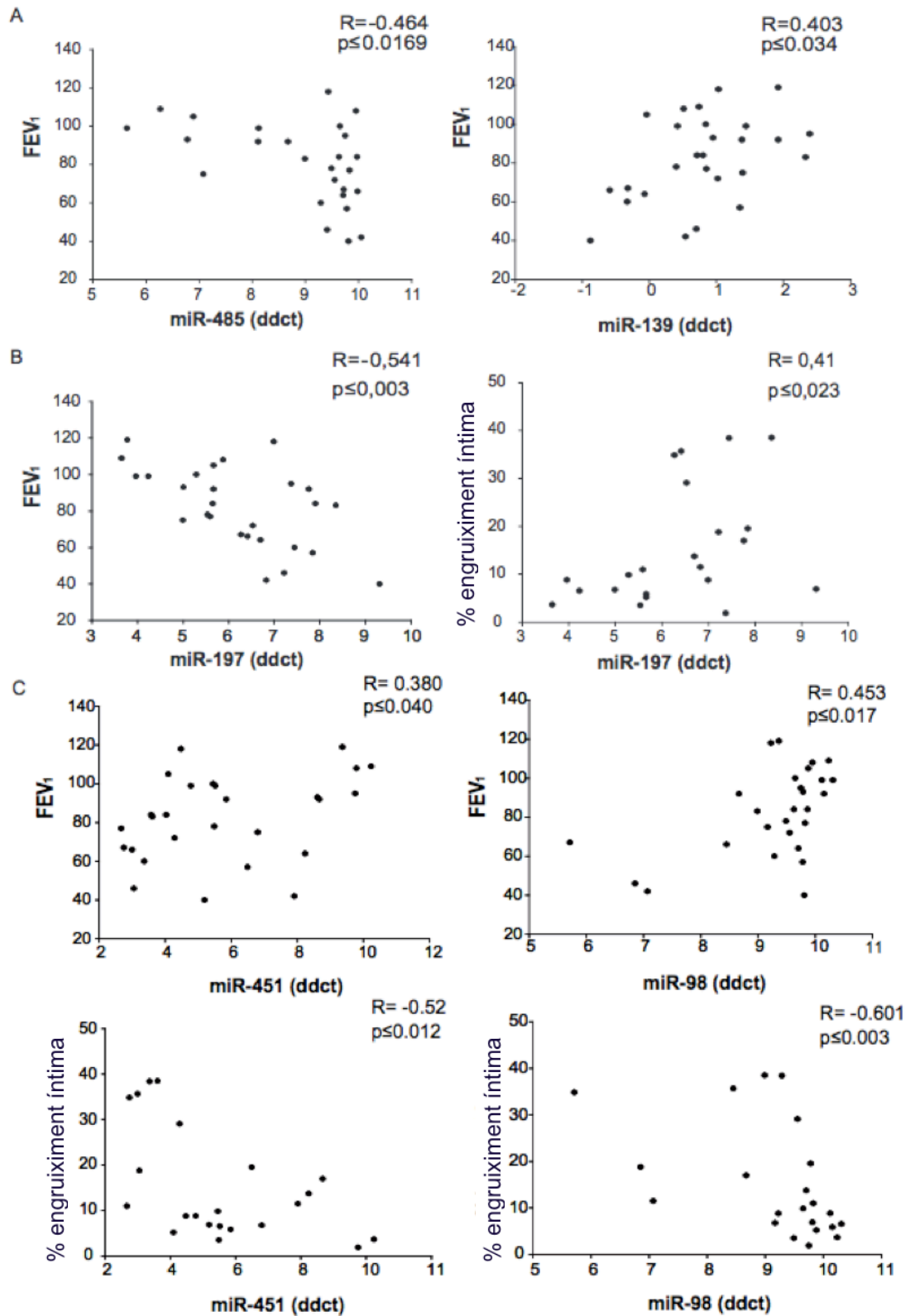


Figura 32. Anàlisi de correlacions de l'expressió de miRNAs amb la FEV₁ i l'engruiximent de la íntima. A, Correlació positiva i negativa del miR-139 i el miR-485 (ddCt) amb la FEV₁, respectivament amb anàlisi Spearman. **B,** Correlació positiva entre el miRNA 197 (ddCt) i FEV₁ (panell esquerre). *p<0.05 per anàlisi Spearman . Correlació negativa entre l'expressió de miR-197 (ddCt) i el % íntima respecte l'àrea total *p< 0.05 per anàlisi (panell de la dreta). **C,**

ESTUDI 2. RESULTATS

Correlació negativa entre l'expressió miR-451 (ddCt) i FEV₁ *p< 0.05 per anàlisi Spearman (gràfic superior esquerre) i positiva entre l'expressió de miR-451 expression (ddCt) i % intima respecte l'àrea total. *p< 0.05 per anàlisi Spearman (gràfic inferior esquerre). Correlació negativa entre el miR-98 (ddCt) i FEV₁ *p< 0.05 per anàlisi Spearman (gràfic superior dret) i positiva entre l'expressió de miR-98 (ddCt) i el % intima respecte l'àrea total *p< 0.05 per anàlisi Spearman (gràfic inferior dret).

L'expressió del miR-197 augmenta al llarg de la diferenciació de la SMC

De tots miRNAs diferencialment expressats en els pacients amb MPOC, ens vam centrar en l'estudi del miR-197. Els altres miRNAs ja hi ha alguna publicació que els relacionen amb homeòstasi de la SMC, hipertensió pulmonar o MPOC (Dmitriev et al., 2013, p. 98) (Hairong Wang et al., 2015) (Formosa et al., 2014). El miR-197 l'havien descrit disminuït i com a regulador de la proliferació en el leioma uterí, cosa que ens va semblar interessant en el nostre context (Ling et al., 2015). Seguint amb el nostre model de diferenciació de la SMC induït per contacte cel·lular, es va analitzar l'expressió d'aquest miRNA per Northern Blot durant la diferenciació D0 (SMC proliferatives), D2 i D6 (SMC diferenciades/contràctils). Aquest experiment va mostrar un increment del miR-197 a les SMC diferenciades amb fenotip contràctil (Figure 33A). A més, a les SMC aïllades de artèries pulmonars van mostrar una disminució de l'expressió d'aquest miRNA a les SMC provinents de pacients amb MPOC i F, comparat amb l'expressió en els NF (Figura 33B). També es va estudiar l'expressió del miR-204, un dels miRNAs més ampliament estudiats en el remodelat vascular pulmonar. L'expressió de miR-204 augmenta al llarg de la diferenciació i disminueix a les SMC derivades de pacients amb MPOC (Figura S1). Aquests resultats concorden amb l'adquisició del fenotip proliferatiu de la SMC a la MPOC.

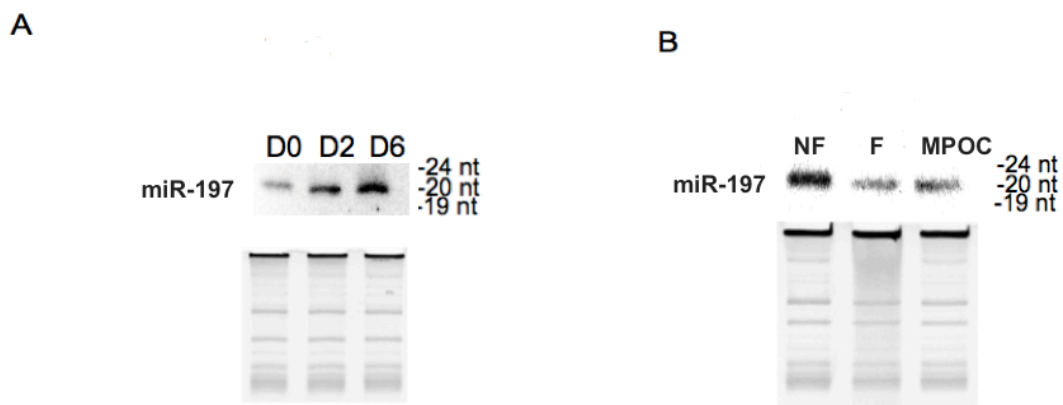


Figura 33. Anàlisi de l'expressió del miR-197 durant el canvi fenotípic de la SMC i en SMC derivades de pacients. **A**, Northern Blot representatiu que mostra un increment de l'expressió del miR-197 a les SMC completament diferenciades (D6) respecte les SMC amb fenotip proliferatiu (D0). **B**, Northern Blot representatiu que mostra una disminució de l'expressió del miR-197 a les SMC derivades de pacients mb MPOC respecte els NF i F.

La inhibició del miR-197 promou l'adquisició del fenotip proliferatiu de la SMC

Es van transfectar SMC diferenciades amb ARN antisentit 2'O-metilat (AS-miR-197) i control (AS-miR CTL) a D0, i es van deixar arribar a D6. L'eficiència del AS-miR-197 en la transfecció es mostra en la Figura 34A i es demostra que es produeix una inhibició casi total. La transfecció del AS-miR-197 en cèl·lules diferenciades va resultar en un bloqueig de la diferenciació de la SMC analitzada amb expressió dels marcadors contràctils per qPCR (Figura 34B). Els resultats mostren també una disminució d'aquests marcadors segons la valoració de la formació de fibres contràctils de α -SMA i Calponina per immunofluorescència (Figura 34B). De la mateixa manera, la transfecció del AS-miR-197 va resultar en un augment de la migració i la proliferació respecte les cèl·lules AS-miR CTL (Figura 34B i Figura 34C). Aquests resultats demostren que el miR-197 pot modular el fenotip proliferatiu de la SMC.

ESTUDI 2. RESULTATS

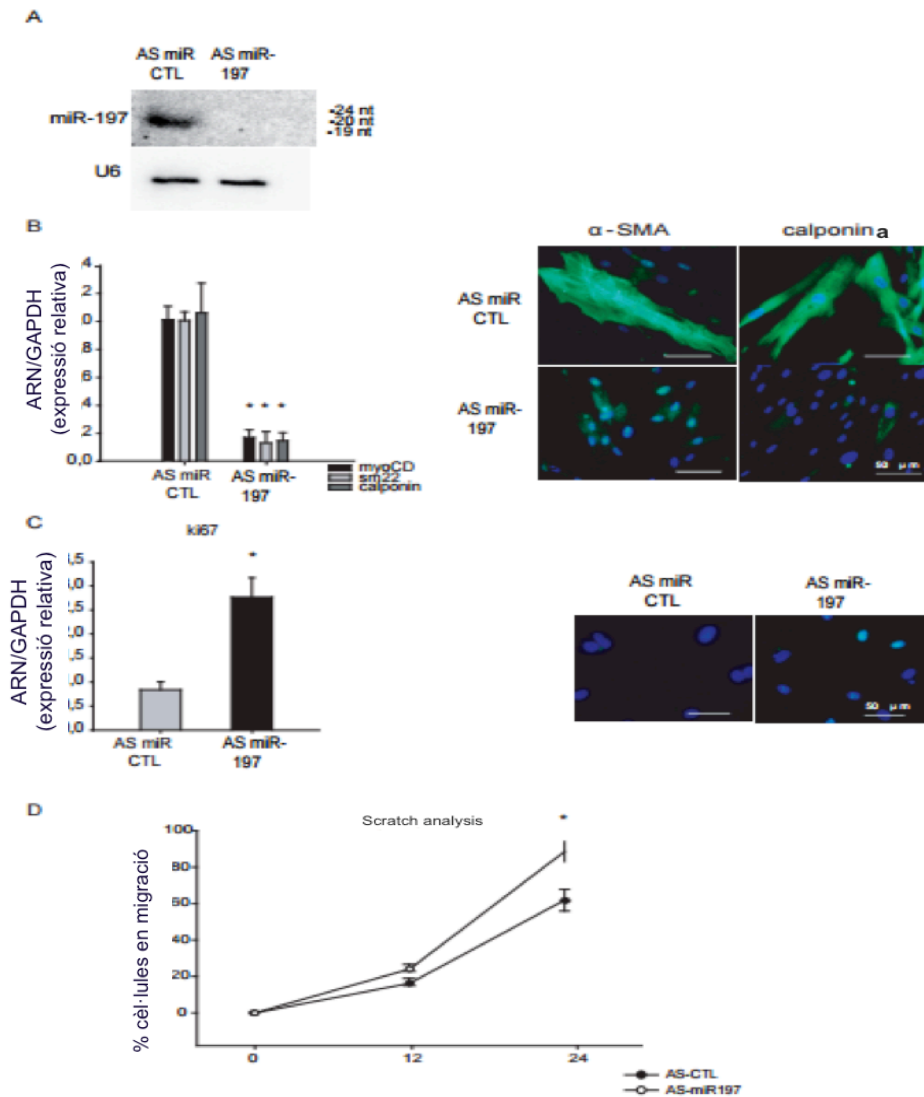


Figura 34. La inhibició del miR-197 bloqueja la diferenciació de SMC. **A**, Expressió del miR-197 analitzat per Northern blot després de 48 hores de transfecció amb AS miR-197 i el control (AS miR-CTL) a SMC. AS miR-197 inhibeix completament l'expressió de miR-197. **B**, La transfecció de AS miR-197 indueix el canvi fenotípic de la SMC com mostra la disminució dels marcadors de diferenciació MyoCD, Sm22- α , i Calponina analitzats per RT-qPCR i per la disminució de la formació de fibres α SMA i Calponina analitzades mitjançant immunofluorescència. **C**, La inhibició de miR-197 indueix l'expressió del marcador de proliferació cel·lular ki67, a nivell de ARN (panell esquerre) i proteïna (panell dret). **D**, L'anàlisi d'Scratch va mostrar un increment de la taxa de migració en SMC transfectades amb AS miR-197 respecte les AS-miR CTL, en concordança amb la dediferenciació de la SMC. Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat * $p < 0.05$ per anàlisi t-test de dades aparellades.

El gen E2F1 és diana directa del miR-197

Des de la descripció de l'existència de dianes no canòniques, és a dir, dianes que no segueixent l'aparellament de bases seguint la llei de Watson i Crick (Helwak et al.,

2013), es va estudiar si el factor de transcripció E2F1 podia ser diana de miR-197. E2F1, un factor de transcripció que regula processos de proliferació en molts models cel·lulars (Amrani et al., 2003). La cotransfecció de la regió 3'UTR del promotor del gen E2F1 lligat al gen de la luciferasa juntament amb el AS-miR-197, va confirmar que E2F1 és una diana directa de miR-197. El senyal luminescent augmentava després de la inhibició del miR-197 (Figura 35A). La qPCR i western bot van mostrar un augment de l'expressió de E2F1 després de la inhibició del miR-197 (Figura 35B). En concordança, l'avaluació de l'expressió de E2F1 en el nostre model de diferenciació va demostrar que E2F1 disminueix al llarg de la diferenciació de la SMC. Aquests resultats mostren que l'augment de l'expressió del miR-197 és paral·lela a la disminució del gen E2F1 (Figura 35C).

De les dianes canòniques descrites en l'anàlisi d'interaccions vam estudiar l'expressió del factor de creixement de la insulina (*insulin growth factor* (IGF1)). IGF1 apareix incrementat en cèl·lules proliferants d'altres models cel·lulars. La inhibició del miR-197 va provocar un augment d'aquest factor, relacionant-se amb un increment de la proliferació (Figura 36).

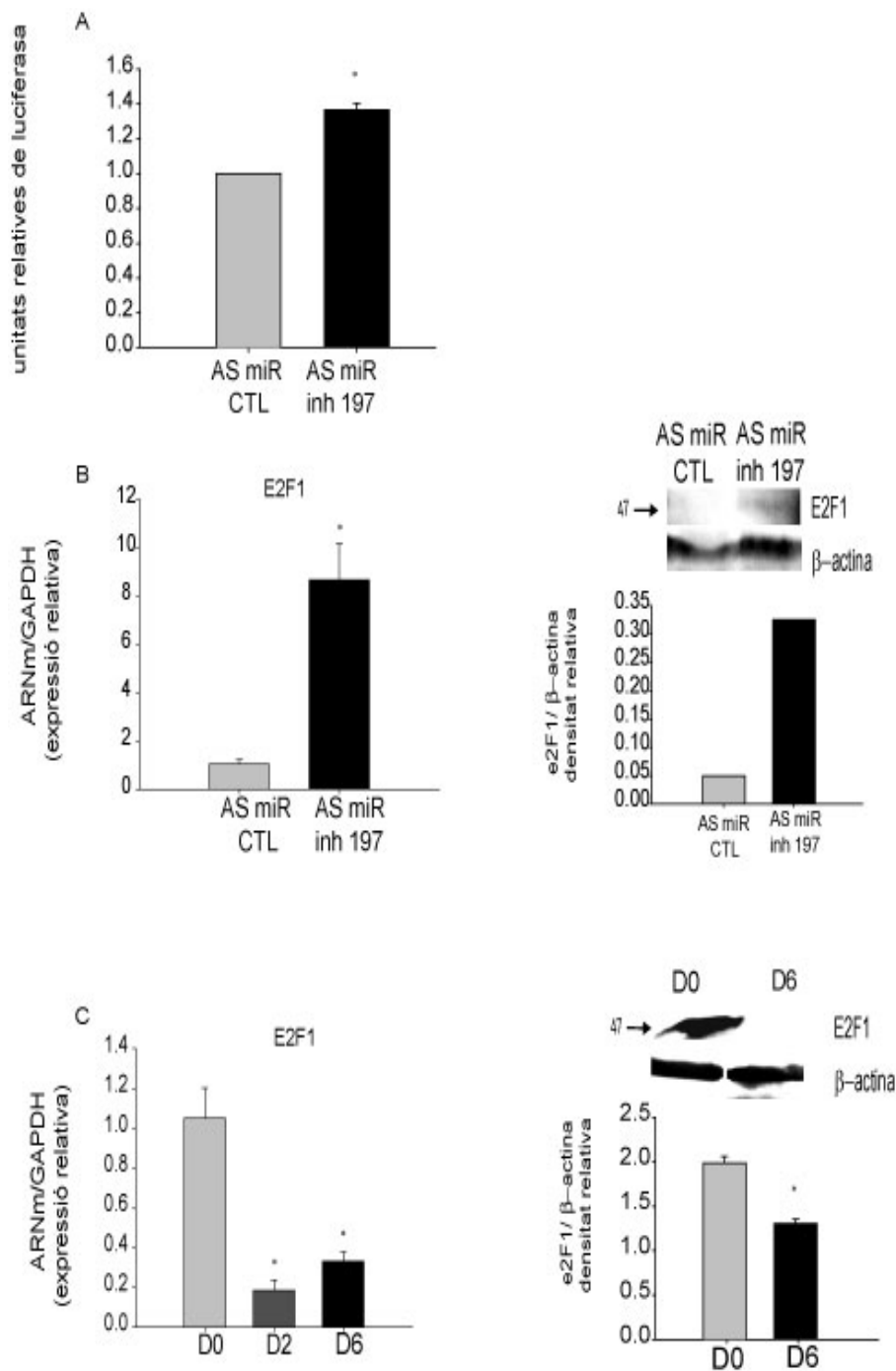


Figura 35. El factor de transcripció E2F1 és diàna directa del miR-197. **A**, L' Assaig de Luciferasa mostra un increment d' unitats de luciferasa després de la inhibició del miR-197 corroborant que E2F1 és diàna del miR-197. **B**, La inhibició del miR-197 promou l'increment de E2F1 analitzada mitjançant RT-qPCR (gràfic esquerre) i Western blot (gràfic dret) **C**, L'expressió de E2F1 disminueix al llarg de la diferenciació de la SMC analitzada per RT-qPCR (gràfic esquerre) i western blot (gràfic dret). Les dades estan expressades amb la mitjana \pm ES de 3 experiments independents per duplicat * $p < 0.05$ per t-test de dades aparellades.

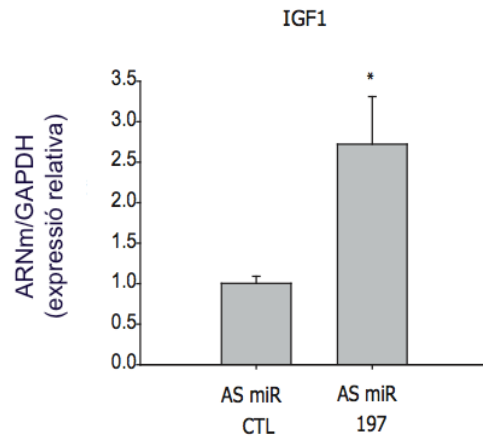


Figura 36. IGF-1 augmenta a les cèl·lules on s'ha inhibit l'expressió de miR-197. * $p < 0.05$

L'expressió de E2F1 està augmentada a les artèries dels pacients amb MPOC

Seguidament, vam raonar; si E2F1 es diana de miR-197, aquest gen s'hauria de trobar disminuït en les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC. A la Figura 37 es mostra que l'expressió de E2F1 a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC, mesurada per western blot, estava incrementada respecte els F i els NF. Aquests resultats concorden amb la disminució del miR-197 trobat a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC. En els pacients F, si bé es mostrava una tendència que l'expressió de E2F1 augmentava, aquest canvi no va ser significatiu.

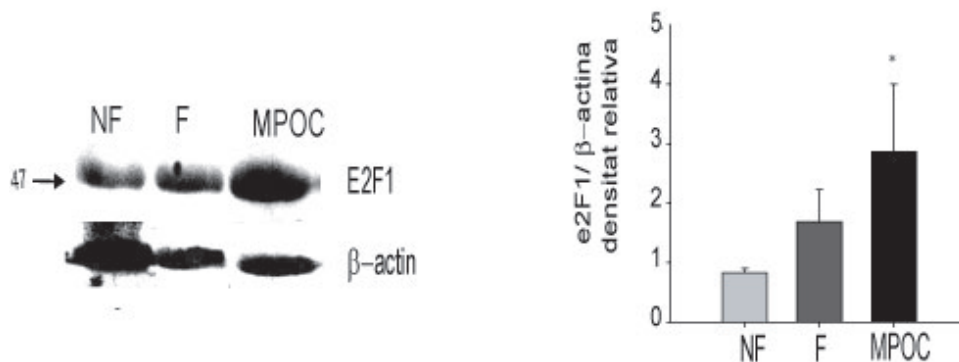


Figura 37. El factor de transcripció E2F1 està augmentat a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC. La immunodetecció mitjançant Western blot va demostrar que E2F1 estava augmentat en les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC respecte dels NF i F. $p < 0.05$ per ANOVA d'una via.

RESUM DE RESULTATS SEGON TREBALL

- Existeix un perfil de miRNAs diferencialment expressats a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC, comparat amb les artèries dels no fumadors. Una anàlisi bioinformàtic seguint el bioconductor *Limma* va identificar els següents miRNAs desregulats: hsa-miR-485-3p, hsa-miR-197, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-204, hsa-miR-627, hsa-miR-98. Les artèries dels fumadors seguien el mateix patró de miRNAs diferencialment expresats sense arribar a la significància.
- Aquests miRNAs regulen majoritàriament gens relacionats amb vies de proliferació cel·lular.
- Existeix una correlació negativa del miR-197 amb el remodelat vascular i positiva amb FEV₁, és a dir, a més remodelat, menys FEV₁ i menys expressió d'aquest miRNA.
- Seguint amb el model de diferenciació obtingut i validat en el primer treball, s'ha demostrat que el miR-197 augmenta durant la diferenciació de les SMC. Aquest resultat correlaciona amb la seva disminució a les SMC derivades de pacients amb MPOC.
- La inhibició del miR-197 disminueix l'expressió de proteïnes contràctils, resultant en la inducció del fenotip proliferatiu de la SMC amb un augment de la taxa de proliferació i migració.
- El factor de transcripció E2F1 és un gen diana directe del miR-197, tal i com es demostra amb els experiments de luciferasa i l'augment d'aquest factor proliferatiu després de la inhibició del miR-197. Tanmateix, existeix un augment d'expressió d'aquest factor de transcripció a les artèries de pacients amb MPOC, correlacionant amb la disminució d'aquest miRNA.

Expressió de miRNAs durant el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC

A continuació a la figura 38 es mostra un esquema del mecanisme descrit en aquest segon treball:

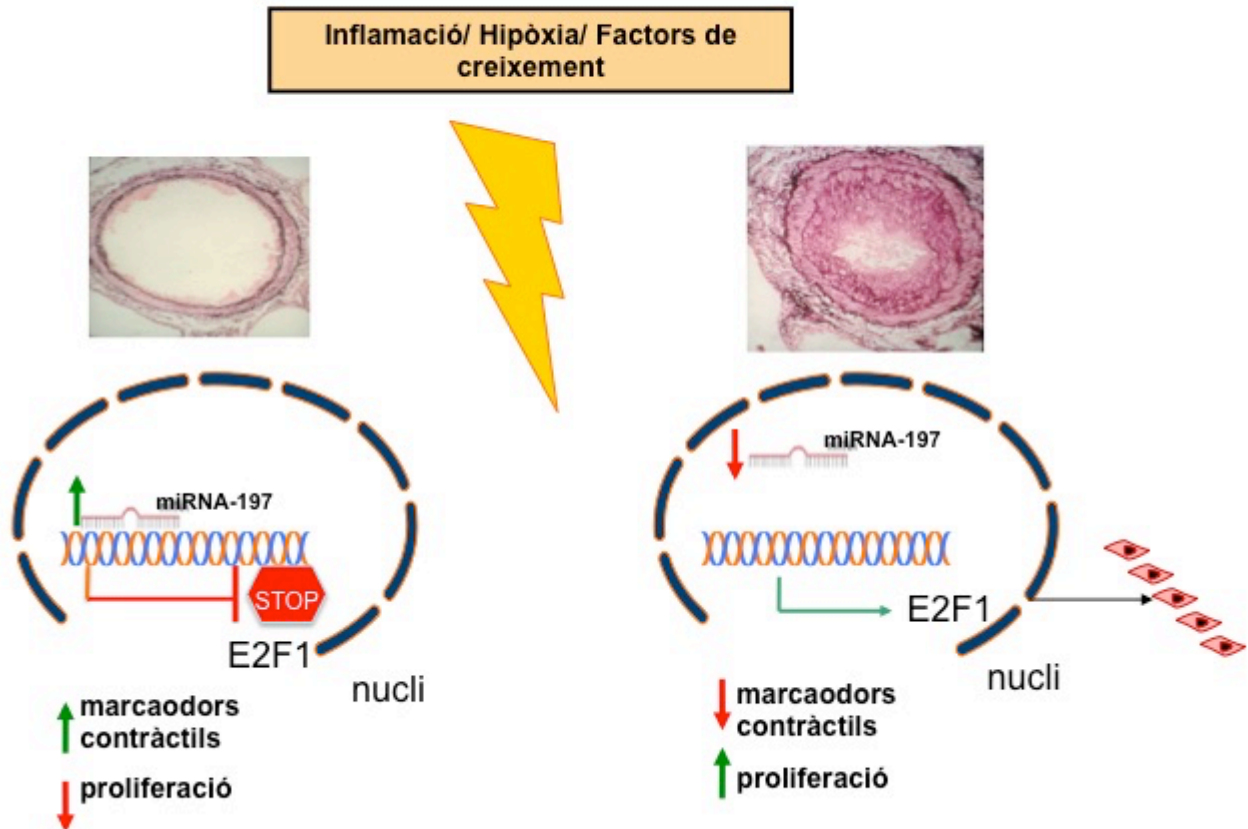


Figura 38. Resum del mecanisme pel qual miR-197 podria estar relacionat amb el remodelat vascular associat a la MPOC. A les artèries dels NF no remodelades, existeix expressió del miR-197. Aquest, per una banda, promou l'expressió de gens contràctils i per l'altra, bloqueja l'expressió del factor de transcripció pro-proliferatiu E2F1. En els individus amb MPOC i remodelat vascular, el miR-197 està disminuït induïnt un augment de la proliferació de la SMC mitjançada per factor E2F1.

Discussió

Noves dianes en el remodelat vascular

Nombrosos investigadors han descrit diferents factors implicats en la regulació de l'homeòstasi de la SMC i els seus canvis de fenotip en diferents malalties vasculars, però encara queda molta feina per fer en el remodelat vascular associat a la MPOC.

Diferents dianes terapèutiques s'han utilitzat per la inhibició de la proliferació desmesurada de les SMC durant el remodelat vascular pulmonar. Des de la inhibició de les Rho o les tirosina quinases, les quals augmenten l'apoptosi i disminueixen la proliferació mitjançant la inhibició de la via de PDGF o VEGF (Pankey et al., 2012) (Schermyly et al., 2005), fins a l'augment de cGMP mitjançant la utilització de inhibidors de fosfodiesterases (PDE) (Domínguez-Fandos et al., 2015), estimuladors de la guanilat ciclasa soluble (Weissmann et al., 2014) o el pèptid intestinal vasoactiu (VIP) (Hamidi et al., 2011). La utilització de la teràpia cel·lular mitjançant EPCs ha donat bons resultats (Yip et al., 2008) (Takahashi et al., 2004), tot i que ja hem comentat el paper dual d'aquestes cèl·lules en la reparació dels vasos. Aquest fet, fa necessari el desenvolupament de més estudis per evitar els efectes no desitjats i així poder trobar noves teràpies farmacològiques.

La descripció de noves dianes terapèutiques per aconseguir una teràpia antiremodelat esdevé clau per millorar el tractament d'aquests pacients. En aquesta tesi doctoral s'han descrit dos nous factors clau implicats en el remodelat vascular pulmonar: un regulador transcripcional, com el factor de transcripció Slug i un regulador post-transcripcional com l'ARN no codificant, el miR-197.

Paper de Slug en la diferenciació de la SMC

En el primer treball ens centrem en l'estudi de Slug i Snail. Són dos dels principals inductors de l'EnMT. Cada vegada existeixen més evidències de que l'EnMT està íntimament relacionat amb la hiperplàsia de la íntima, tant en models de hipertensió pulmonar, com en la MPOC (Arciniegas et al., 2007b) (Milara et al., 2013). Aquests dos factors a més, han estat relacionats amb processos de diferenciació cel·lular en altres models cel·lulars i com a moduladors de processos de proliferació cel·lular (Mistry et

al., 2014) (Pérez-Losada et al., 2002). Aquests fet, ens va fer hipotetitzar que també podrien estar implicats en la diferenciació i modulació fenotípica de la SMC.

En aquesta tesi s'ha demostrat que Slug està específicament augmentat a la SMC dediferenciada, és a dir, una SMC no contràctil, proliferativa i migratòria, tant a nivell de ARN com a nivell de proteïna. D'acord amb això, la inhibició de Slug va donar a lloc a una disminució de la proliferació i la migració, tant en cèl·lules proliferants com en cèl·lules diferenciades, mentre que la sobreexpressió va tenir l'efecte contrari. En el mateix sentit van anar les dianes obtingudes després de la disminució de Slug, es va confirmar una regulació per part de Slug de vies implicades en proliferació i cicle cel·lular com: HBEGF i la CCN2, o bé proteïnes supressores de tumors com RARRES (Igura et al., 1996) (Scharadin and Eckert, 2014). També es va demostrar una regulació de l'expressió de proteïnes d'adhesió com la CCN1 i la KRT19 (Tripathi et al., 2005) (Martínez-Estrada et al., 2006). Els nostres resultats concorden amb altres treballs en diferents models cel·lulars, sobretot en càncer, on també relacionen l'augment de Slug amb un fenotip migratori, proliferatiu i progenitor que confereix poder maligne i metastàtic als tumors (Aomatsu et al., 2012) (Sarrió et al., 2008).

Efecte del TNF- α , la hipòxia i el tabac en la diferenciació de la SMC

La SMC està en continu contacte amb els factors secretats per els fibroblastes de l'adventícia o les cèl·lules inflamatòries que infiltren després de dany vascular. Factors com la inflamació, la hipòxia i el tabac són importants en la diferenciació de la SMC i la resposta hiperplàsica (Starke et al., 2013). Per això, es van estimular SMC diferenciades amb diferents citocines. Es va demostrar que l'augment de Slug després de l'estimulació per TNF- α , podia actuar com un inductor de la modulació fenotípica de la SMC, de la mateixa manera que era capaç d'induir-la en cèl·lules musculars de cervell en un context d'aneurisme (Ali et al., 2013). En aquest últim treball TNF- α augmenta KLF4, que promourà la modulació fenotípica de La SMC cerebral. En el nostre treball, Slug i KLF4 augmenten la seva expressió després de l'estimulació amb TNF- α . A més, l'estudi funcional on inhibim Slug en SMC estimulades amb TNF- α , va resultar en una

inhibició del canvi de fenotip suggerint un paper important d'aquest factor de transcripció en aquest procés. També hem demostrat que TNF- α era capaç de promoure l'EnMT a la CE, augmentant Slug. La inhibició de Slug abolia la transdiferenciació, destacant el rol patològic d'aquest factor sota estímuls inflamatoris en els dos tipus cel·lulars predominants a l'artèria pulmonar.

Els resultats obtinguts en l'anàlisi de Slug van portar a analitzar un altre membre de la família, com Snail. Tot i que els dos estan disminuïts a la SMC diferenciada, s'ha vist que com a mínim a la SMC, Slug i Snail tenen funcions diferents. La inhibició de Slug no va tenir efecte en l'expressió Snail ni tampoc hi va haver correlació amb el remodelat, ni inducció després de l'estimulació amb TNF- α .

Per primera vegada s'han descrit diferents funcions d'aquests factors a la SMC. Aquestes resultats concorden amb altres treballs, on en altres models cel·lulars s'han descrit funcions diferents d'aquests factors: Snail s'ha descrit com el regulador principal de l'EMT. Slug sembla ser que actua durant les fases inicials del procés de transdiferenciació, i després Snail, és qui dirigirà tot el procés (Cano et al., 2000) (Savagner et al., 1997) (Moreno-Bueno et al., 2006). També s'ha descrit que el KO de Slug en un model murí era viable, mentre que el de Snail moria durant la gastrulació (Murray and Gridley, 2006). Shirley et al van descriure canvis d'expressió d'aquests factors segons el tipus cel·lular i morfologia: Slug s'expressava més en cèl·lules epitelials de carcinoma esquamós, mentre que Snail a cèl·lules amb un fenotip més allargat i mesenquimal (Shirley et al., 2010).

D'altra banda, HIF-1 α s'ha vist implicat en la proliferació de SMC i en canvis d'expressió Slug en altres models cel·lulars (Zhang et al., 2013). En condicions d'hipòxia descrivim que existeix una diferenciació aberrant al mateix temps que existeix un augment de l'expressió de Slug i de Snail. El tabac, en canvi, veiem que estimula l'expressió de Slug i no d'Snail i s'indueix el canvi de fenotip de la SMC. Aquests resultats correlacionen bé amb un context de remodelat vascular associat a la MPOC on el tabac, la hipòxia i la inflamació se sap que són els principals inductors de les alteracions vasculars.

Mecanisme molecular de la diferenciació de la SMC

Quin és el mecanisme pel qual Slug regula la homeòstasi de la SMC roman per aclarir. Segons el nostre treball, i veient que la inhibició de Slug en cèl·lules en estat proliferatiu, no va resultar en un augment dels marcadors contràctils suggerim un paper repressor d'aquest factor de transcripció, no tant com inductor. En aquest sentit, Slug sí que va ser capaç de bloquejar la diferenciació en un model d'inducció amb TGF β -1, reforçant la idea que actua com a repressor. De fet, està descrit que Slug es un factor de transcripció que s'uneix a les E-boxes, com a repressor i que recluta HDACs que inhibiran l'expressió gènica. Solemani *et al* (Soleimani et al., 2012) van demostrar que MyoD, factor de transcripció del tipus *bHLH* que actua com inductor de gens contràctils en múscul esquèletic, i Slug competeixen per la unió a les E-boxes. Si hi ha unió de Slug s'inhibeix la diferenciació. En els promotors dels gens contràctils hi ha més d'una E-box, on es poden unir tant MyoD o Slug i regular així la activació de la diferenciació muscular (Hsieh et al., 1999).

Twist un factor de tipus *bHLH* i que també s'expressa en processos de diferenciació cel·lular com l'EMT i podria esdevenir important regulant la SMC. És possible que Slug i Twist actuïn cooperativament inhibint la diferenciació. Kumar *et al* (Kumar et al., 2003) van descriure que Twist segrestava altres factors de transcripció *bHLH* del promotor de α -SMA i actuava com a inhibidor de la diferenciació de la SMC. També s'ha demostrat que Slug regula Runx2, un factor de transcripció que s'ha vist incrementat a les calcificacions de les artèries pulmonars en malalts amb HAP (Ruffenach et al., 2016). Futurs estudis s'han de desenvolupar per demostrar aquests fets.

Slug i el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC

En el nostre treball doncs s'ha demostrat que Slug pot jugar un paper important *in vitro*, però no tenim dades funcionals en un model *in vivo*. Sí s'ha demostrat però, que Slug està augmentat en el teixit pulmonar d'un model murí d'hipertensió pulmonar i les artèries remodelades de pacients amb MPOC. La seva expressió correlaciona amb

la muscularització dels vasos i el grau de remodelat. Tot i que manquen els estudis funcionals en un model animal, els resultats són força prometedors ja que per primera vegada es descriu la implicació d'aquest factor de transcripció en la modulació fenotípica de la SMC i el remodelat vascular.

Slug és el factor clau en en la homeòstasi vascular, ja que no veiem augment de Snail ni a les artèries de pacients remodelades, ni en el model murí d'hipertensió pulmonar. L'augment d'Slug podria indicar que majoritàriament les cèl·lules del remodelat vascular pulmonar provenen d'una dediferenciació massiva de SMC de la mèdia cap a la íntima, més que de processos de EnMT. Aquest fet estaria en concordança amb una publicació recent on la majoria de SMC (més del 80%) de la capa mèdia patien dediferenciació i proliferació cap a la íntima (Shankman et al., 2015). D'altra banda, les progenitores de medul·la òssia circulants també poden transdiferenciar-se a SMC durant el remodelat vascular, però el seu aporta real *in vivo* es creu que és menor. Kokudo et al van demostrar un paper diferencial de l'expressió de Slug i Snail durant la transdiferenciació de cèl·lules embrioniques derivades de EC. Va demostrar que era Snail qui induïa el procés mitjançant l'activació de TGFBR1 (Kokudo et al., 2008). En el treball de Díez i Musri *et al* (Díez et al., 2010) es va demostrar la inhibició tant d'Snail com de Slug inhibia la transdiferenciació de les progenitores a SMC. Nosaltres també observem augment d'Snail quan induïm EnMT amb TNF- α i observem una disminució quan inhibim Slug durant la transdiferenciació, indicant una disminució per una via indirecta d'aquest factor. Ambdós jugarien un paper destacat en la transdiferenciació de CE i progenitores, però només Slug en la dediferenciació de la SMC de la mèdia.

Segons el resultat del primer treball veiem que es clau inhibir la modulació fenotípica de la SMC de la mèdia per disminuir el remodelat vascular pulmonar. La descripció de noves dianes en aquest sentit és de gran interès. En el segon treball ens vam centrar en descriure altres factors que poguessin influir en la dediferenciació de la SMC en la MPOC. Factors com els miRNAs, poden esdevenir importants, ja que aquestes molècules se sap que són moduladores de vies de senyalització i poden coordinar diferents vies moleculars. A més, la seva implicació en processos de diferenciació

cel·lular, la proliferació i la migració les fa atractives a nivell terapèutic pel control de la homeòstasi vascular.

miRNAs com a dianes terapèutiques

Recentment, la utilització dels miRNAs com a teràpia gènica està donant resultats esperançadors. La introducció dels mítics han servit per reactivar vies que estaven inhibides degut a la malaltia. Existeixen estudis que ha donat bons resultats, com la nebulització de miR-204 a un model animal de HAP va ser capaç de revertir la malaltia (Courboulin et al., 2011). Un altre estudi dut a terme per Kim *et al* (Kim et al., 2013), on l'administració mitjançant lentivirus de mítics de miR-424 i miR-503 en un model de rata, va reduir la pressió sistòlica i una disminució del nombre de cèl·lules proliferants. Una altra aproximació és la utilització dels antagomiRs. Aquests poden produir més efectes secundaris, ja que s'uneixen de manera irreversible al miRNA endogen que poden provocar inhibicions inespecífiques. De totes maneres s'han obtingut bons resultats; com l'administració de miR-17, el qual va millorar la funció cardíaca i pulmonar en un model animal de HP induït per monocrotalina i hipòxia (Pullamsetti et al., 2012).

Els miRNAs en la MPOC

Nombrosos treballs descriuen miRNAs desregulats a la MPOC, sobretot en teixit pulmonar (Sessa and Hata, 2013) (Ezzie et al., 2012). D'altra banda, l'estudi directe en artèries pulmonars i determinar quin és el seu paper real en la hiperplàsia de la íntima i el canvi de fenotip de la SMC no es pot dir el mateix. D'aquí l'objectiu del segon estudi d'aquesta tesi doctoral.

El segon treball de la present tesi doctoral pretén descriure un nou perfil d'expressió de miRNA implicats en el remodelat vascular associat a la MPOC basant-nos en l'anàlisi d'extractes totals d'artèries pulmonars. Els resultats obtinguts demostren que existeix una expressió diferencial de miRNAs en els MPOC respecte els no fumadors. En el

fumadors hi ha una tendència similar tot i no obtenir diferències significatives respecte els no fumadors. D'aquest anàlisi també cal remarcar que la majoria de miRNAs modificats: el miR-451, miR-197, miR-204, miR485-3p and miR-627 estan implicats en vies de proliferació cel·lular i els altres miR-98, miR-146b miR-139 implicats en processos antiinflamatoris i antiproliferatius.

Específicament, el miR-204, ha estat àmpliament estudiat a la HAP, i s'ha vist disminuït a les SMC de ratolins amb HAP induint proliferació i afavorint el remodelat vascular (Courboulin et al., 2011). Curiosament, el factor de transcripció Slug és un dels gens diana del miR- 204. La disminució del miR- 204 augmenta l'expressió de Slug, la qual cosa concorda amb que el trobem disminuït en els pacients amb MPOC i amb el nostre primer treball, on hem vist que aquest factor promou la hiperproliferació de la SMC i correlaciona amb el remodelat vascular pulmonar.

Una primera aproximació per establir possibles dianes d'aquests miRNAs es va obtenir mitjançant l'anàlisi d'enriquiment d'origens gènics (GO enrichment) el qual va mostrar un enriquiment de dianes específiques relacionades amb vies proliferatives. D'aquestes vies, es van descriure un conjunt de possibles gens diana dels miRNAs diferencialment expressats.

Paper del miR-197 en la diferenciació de la SMC

De tots els miRNAs diferencialment expressats, ens vam centrar en l'anàlisi del miR-197 per l'estudi de potencials dianes. Aquest miRNA correlacionava amb els principals paràmetres de la malaltia, com són el remodelat vascular (Santos et al., 2002) i el FEV₁. A més, el miR-197 havia estat descrit prèviament com a supressor de tumors, regulant la supressió d'un gran nombre gens proliferatius. Específicament, es va trobar disminuït en cèl·lules de leioma uterí, un tumor benigne de la SMC, on la seva disminució va resultar en un augment de la proliferació (Ling et al., 2015) (Wu et al., 2015). Aquesta característica el va fer especialment interessant com a candidat d'estudi en l'estudi del remodelat vascular associat a la MPOC.

L'estudi de l'expressió del miR-197 en el nostre model de diferenciació de SMC, va demostrar que miR-197 augmentava amb la diferenciació. Al mateix temps la seva inhibició amb AS-miR-197 en cèl·lules en diferenciació estimulava la proliferació i migració. En les SMC procedents de pacients amb MPOC el miRNA 197 estava disminuït corroborant l'especificitat d'expressió amb el fenotip contràctil. Aquests resultats encaixen amb l'anàlisi de l'expressió del miR-204. En el nostre estudi també vam validar la disminució d'aquest miRNA a les SMC i en les artèries dels pacients amb MPOC.

Per la cerca del gen diana d'aquest miRNA, ens vam voler centrar en un gen lligat en la regulació de la proliferació, ja que els nostres resultats ens direccionaven en aquest sentit. Des de la descripció que el 60% de les unions miRNA-ARN podien ser no-canòniques es van buscar dianes d'aquest tipus. En el treball de Aleksandra Helwak *et al* (Helwak *et al.*, 2013) van demostrar que el miR-197 estava unit al extrem 3'UTR del factor de transcripció E2F1. Els experiments de luciferasa van demostrar la regulació de l'expressió de E2F1 per part de miR-197. Aquest factor de transcripció ha estat relacionat tant amb la inducció de cicle cel·lular com amb vies d'apoptosi (Crosby and Almasan, 2004) (DeGregori and Johnson, 2006). Concretament, E2F1 promou l'entrada en fase S mitjançant la inducció de gens com les ciclines, c-myc o p53 i per l'altra banda reguladors de la apoptosi com Bcl2, p73 o reguladors de p53. A més, d'acord amb la seva relació amb la via proliferativa es va trobar que E2F1 estava augmentat en SMCs dediferenciades. La inhibició d'aquest miRNA en les SMCs en diferenciació va provocar un augment de l'expressió de E2F1, correlacionant amb la sobreexpressió d'aquest gen en artèries humanes de pacients amb MPOC. Aquests resultats concorden amb els trobats en altres treballs on l'expressió de E2F1 estava relacionada amb proliferació de SMC (Goukassian *et al.*, 2003)(Amrani *et al.*, 2003)(Kim *et al.*, 2005)(Yang *et al.*, 2013). També es va validar el factor de creixement de la insulina (Insulin growth factor-1 (IGF-1)), una diana canònica obtinguda en l'anàlisi de xarxes. Aquest gen és un factor pro-proliferatiu en altres models cel·lulars i que concorda amb l'increment de proliferació després de la inhibició de miR-197 (Deng *et al.*, 2006)

miR-197 i MPOC

Són necessaris més estudis per aclarir el mecanisme pel qual miR-197 es troba disminuït als pacients amb MPOC. El tabac podria ser un dels agents causals ja que s'ha vist que els fumadors també mostren una disminució, encara que no arriba a ser significativa. La nicotina pot induir l'activació STAT3 a les SMC i a les cèl·lules inflamatòries (Li et al., 2004). Segons la revisió de Kim *et al.* (Kim et al., 2015), STAT3 també pot promoure la disminució de miR-204 per modificacions epigenètiques. En un model de carcinoma hepatocel·lular, IL6 i STAT3 indueixen una disminució de miR-197 i STAT3 promovent la disseminació del càncer (Huamin Wang et al., 2015). La hipòxia podria ser un altre factor que podria disminuir l'expressió de miR-197. La hipòxia i la IL6 s'han vist incrementades en les SMC dediferenciades en la HP (Frid et al., 2009). Per tant, aquests factors podrien afavorir la hipermetilació de l'ADN provocant una disminució de miRNAs supressors de tumors, com el miR-197 (Lujambio et al., 2008).

Finalment s'ha establert una nova relació entre proliferació i remodelat vascular pulmonar mitjançada pel miRNA-197. La disminució d'aquest miRNA podria fer augment el factor E2F1 i IGF1 provocant un augment del fenotip proliferatiu de la SMC pròpia del remodelat vascular associat a la MPOC.

En aquesta tesis es demostra el paper que tenen el tabac, la hipòxia i la inflamació en l'activació de vies relacionades amb la modulació fenotípica de la SMC promovent la proliferació i la migració de les mateixes durant el remodelat vascular associat a la MPOC. S'ha demostrat que la inducció d'un factor de transcripció com Slug o bé la disminució del miRNA 197 tenen un efecte important en aquest procés estimulants la transició fenotípica de la SMC i promovent la proliferació cel·lular responsable del engruiximent intimal.

Conclusions

1. Per primera vegada s'ha obtingut un model *in vitro* de diferenciació de la SMC. Aquest model cel·lular ha permès analitzar diferents factors que alteren la homeòstasi de la SMC en el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC.
2. S'ha demostrat que el remodelat pulmonar vascular va associat a una dediferenciació de la SMC cap a un fenotip proliferatiu i migratori.
3. La modulació fenotípica de la SMC ve induïda per un ambient inflamatori, la hipòxia i el tabac. Aquests factors, provocaran, tan *in vitro* com *in vivo*, un augment de l'expressió del factor de transcripció Slug.
4. L'expressió de Slug es troba associada a l'estat proliferatiu de la SMC regulant un conjunt de gens relacionats amb vies de proliferació i migració. Al mateix temps, actua de repressor de la diferenciació de la SMC, promovent i mantenint el fenotip proliferatiu de la SMC característic del remodelat vascular pulmonar.
5. Els factors de transcripció Slug i Snail són els principals inductors de la transdiferenciació de la CE cap a *SM-like cell*, durant el remodelat vascular pulmonar.
6. A les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC existeix un perfil específic de miRNAs diferencialment expressats. Aquests miRNAs estan majoritàriament relacionats amb la regulació de vies involucrades amb la proliferació cel·lular.
7. L'expressió del miRNA-197 es troba disminuït a les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC i correlaciona amb dos dels principals paràmetres de la malaltia.
8. L'expressió d'aquest miRNA és característica de la SMC amb fenotip contràctil inhibint processos de proliferació i migració. S'ha demostrat que regula

l'expressió del factor de transcripció pro-proliferatiu E2F1, l'augment del qual, promou la proliferació i migració de la SMC durant el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC.

Resultats addicionals

Taula S1. Resum de 30 gens modificats després de la inhibició de Slug

Cell cycle (GO:0007049)	
Gene symbol	Rank metric score
MAD2L1	-0.406027645
NEK2	-0.391486853
BIRC5	-0.360862374
TTK	-0.345425099
DLGAP5	-0.340312243
KIF23	-0.330975831
NDC80	-0.318150222
CENPF	-0.306908071
BUB1B	-0.303575546
CENPE	-0.300727546
UBE2C	-0.299725682
BUB1	-0.285587072
MLF1	-0.285531104
KIF11	-0.283260554
PRC1	-0.259448439
CIT	-0.256977081
CDC6	-0.253449202
ZWINT	-0.252591521
ANLN	-0.252140313
KIF15	-0.247360334
RAD51	-0.246333823
AFAP1L2	-0.245889321
PRUNE2	-0.238055795
DIRAS3	-0.237249017
PLK1	-0.234444648
KIF2C	-0.226172
NCAPH	-0.225722983
NUSAP1	-0.22515744
E2F1	-0.218571082
CDC45	-0.215077609

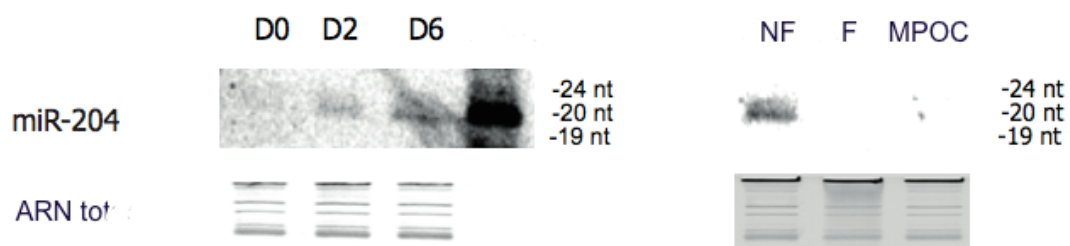


Figura S1. Expressió del miR-204 durant la diferenciació de la SMC i a les SMC derivades de pacients. miR-204 augmenta al llarg de la diferenciació i disminueix a les SMC de pacients derivades de pacients F i amb MPOC.

Bibliografia

Abid, M.R., Yano, K., Guo, S., Patel, V.I., Shrikhande, G., Spokes, K.C., Ferran, C., Aird, W.C., 2005. Forkhead transcription factors inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *J. Biol. Chem.* 280, 29864–29873. doi:10.1074/jbc.M502149200

Adam, P.J., Regan, C.P., Hautmann, M.B., Owens, G.K., 2000. Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J. Biol. Chem.* 275, 37798–37806. doi:10.1074/jbc.M006323200

Aksoy, I., Giudice, V., Delahaye, E., Wianny, F., Aubry, M., Mure, M., Chen, J., Jauch, R., Bogu, G.K., Nolden, T., Himmelbauer, H., Xavier Doss, M., Sachinidis, A., Schulz, H., Hummel, O., Martinelli, P., Hübner, N., Stanton, L.W., Real, F.X., Bourillot, P.-Y., Savatier, P., 2014. Klf4 and Klf5 differentially inhibit mesoderm and endoderm differentiation in embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 5, 3719. doi:10.1038/ncomms4719

Albinsson, S., Skoura, A., Yu, J., DiLorenzo, A., Fernández-Hernando, C., Offermanns, S., Miano, J.M., Sessa, W.C., 2011. Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PloS One* 6, e18869. doi:10.1371/journal.pone.0018869

Albinsson, S., Suarez, Y., Skoura, A., Offermanns, S., Miano, J.M., Sessa, W.C., 2010. MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1118–1126. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200873

Aldashev, A.A., Sarybaev, A.S., Sydykov, A.S., Kalmyrzaev, B.B., Kim, E.V., Mamanova, L.B., Maripov, R., Kojonazarov, B.K., Mirrakhimov, M.M., Wilkins, M.R., Morrell, N.W., 2002. Characterization of high-altitude pulmonary hypertension in the Kyrgyz: association with angiotensin-converting enzyme genotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166, 1396–1402. doi:10.1164/rccm.200204-345OC

Alexander, M.R., Murgai, M., Moehle, C.W., Owens, G.K., 2012. Interleukin-1 β modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF- κ B-dependent mechanisms. *Physiol. Genomics* 44, 417–429. doi:10.1152/physiolgenomics.00160.2011

Ali, M.S., Starke, R.M., Jabbour, P.M., Tjounmakaris, S.I., Gonzalez, L.F., Rosenwasser, R.H., Owens, G.K., Koch, W.J., Greig, N.H., Dumont, A.S., 2013. TNF- α induces phenotypic modulation in cerebral vascular smooth muscle cells: implications for cerebral aneurysm pathology. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1564–1573. doi:10.1038/jcbfm.2013.109

Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A., 2005. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Dev. Camb. Engl.* 132, 4653–4662. doi:10.1242/dev.02073

Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355. doi:10.1038/nature02871

Amrani, Y., Tliba, O., Choubey, D., Huang, C.-D., Krymskaya, V.P., Eszterhas, A., Lazaar, A.L., Panettieri, R.A., 2003. IFN-gamma inhibits human airway smooth muscle cell proliferation by modulating the E2F-1/Rb pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 284, L1063-1071. doi:10.1152/ajplung.00363.2002

Aomatsu, K., Arao, T., Abe, K., Kodama, A., Sugioka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., Nishio, K., 2012. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 751–756. doi:10.1167/iovs.11-8222

Arciniegas, E., Frid, M.G., Douglas, I.S., Stenmark, K.R., 2007a. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in

chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L1-8. doi:10.1152/ajplung.00378.2006

Arciniegas, E., Frid, M.G., Douglas, I.S., Stenmark, K.R., 2007b. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293, L1-8. doi:10.1152/ajplung.00378.2006

Arciniegas, E., Sutton, A.B., Allen, T.D., Schor, A.M., 1992. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J. Cell Sci.* 103 (Pt 2), 521–529.

Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., Isner, J.M., 1999. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 18, 3964–3972. doi:10.1093/emboj/18.14.3964

Atchley, W.R., Fitch, W.M., 1997. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 5172–5176.

Atkinson, C., Stewart, S., Upton, P.D., Machado, R., Thomson, J.R., Trembath, R.C., Morrell, N.W., 2002. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 105, 1672–1678.

Barath, P., Fishbein, M.C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R.H., Forrester, J.S., 1990. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am. J. Pathol.* 137, 503–509.

Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297.

Bartis, D., Mise, N., Mahida, R.Y., Eickelberg, O., Thickett, D.R., 2014. Epithelial-mesenchymal transition in lung development and disease: does it exist and is it important? *Thorax* 69, 760–765. doi:10.1136/thoraxjnl-2013-204608

Baskerville, S., Bartel, D.P., 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA N. Y. N* 11, 241–247. doi:10.1261/rna.7240905

Batlle, E., Sancho, E., Francí, C., Domínguez, D., Monfar, M., Baulida, J., García De Herreros, A., 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 84–89. doi:10.1038/35000034

Berezikov, E., 2011. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nat. Rev. Genet.* 12, 846–860. doi:10.1038/nrg3079

Bermejo-Rodríguez, C., Pérez-Caro, M., Pérez-Mancera, P.A., Sánchez-Beato, M., Piris, M.A., Sánchez-García, I., 2006. Mouse cDNA microarray analysis uncovers Slug targets in mouse embryonic fibroblasts. *Genomics* 87, 113–118. doi:10.1016/j.ygeno.2005.09.014

Bieker, J.J., 2001. Krüppel-like factors: three fingers in many pies. *J. Biol. Chem.* 276, 34355–34358. doi:10.1074/jbc.R100043200

Bockmeyer, C.L., Maegel, L., Janciauskiene, S., Rische, J., Lehmann, U., Maus, U.A., Nickel, N., Haverich, A., Hoeper, M.M., Golpon, H.A., Kreipe, H., Laenger, F., Jonigk, D., 2012. Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and microRNA expression. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 31, 764–772. doi:10.1016/j.healun.2012.03.010

Boettger, T., Beetz, N., Kostin, S., Schneider, J., Krüger, M., Hein, L., Braun, T., 2009. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J. Clin. Invest.* 119, 2634–2647. doi:10.1172/JCI38864

Brock, M., Trenkmann, M., Gay, R.E., Michel, B.A., Gay, S., Fischler, M., Ulrich, S., Speich, R., Huber, L.C., 2009. Interleukin-6 modulates the expression of the bone

morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ. Res.* 104, 1184–1191. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197491

Bushati, N., Cohen, S.M., 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175–205. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406

Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A., 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell Biol.* 2, 76–83. doi:10.1038/35000025

Caruso, P., Dempsie, Y., Stevens, H.C., McDonald, R.A., Long, L., Lu, R., White, K., Mair, K.M., McClure, J.D., Southwood, M., Upton, P., Xin, M., van Rooij, E., Olson, E.N., Morrell, N.W., MacLean, M.R., Baker, A.H., 2012. A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples. *Circ. Res.* 111, 290–300. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267591

Caruso, P., MacLean, M.R., Khanin, R., McClure, J., Soon, E., Southgate, M., MacDonald, R.A., Greig, J.A., Robertson, K.E., Masson, R., Denby, L., Dempsie, Y., Long, L., Morrell, N.W., Baker, A.H., 2010. Dynamic Changes in Lung MicroRNA Profiles During the Development of Pulmonary Hypertension due to Chronic Hypoxia and Monocrotaline. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 716–723. doi:10.1161/ATVBAHA.109.202028

Chaouat, A., Savale, L., Chouaid, C., Tu, L., Sztrymf, B., Canuet, M., Maitre, B., Housset, B., Brandt, C., Le Corvoisier, P., Weitzenblum, E., Eddahibi, S., Adnot, S., 2009. Role for interleukin-6 in COPD-related pulmonary hypertension. *Chest* 136, 678–687. doi:10.1378/chest.08-2420

Chen, J., Kitchen, C.M., Streb, J.W., Miano, J.M., 2002. Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 1345–1356.

Chen, T., Zhou, G., Zhou, Q., Tang, H., Ibe, J.C.F., Cheng, H., Gou, D., Chen, J., Yuan, J.X.-J., Raj, J.U., 2015. Loss of microRNA-17~92 in smooth muscle cells attenuates experimental pulmonary hypertension via induction of PDZ and LIM domain 5. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 678–692. doi:10.1164/rccm.201405-0941OC

Cheng, Y., Liu, X., Yang, J., Lin, Y., Xu, D.-Z., Lu, Q., Deitch, E.A., Huo, Y., Delphin, E.S., Zhang, C., 2009. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* 105, 158–166. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197517

Ciuculan, L., Bonneau, O., Hussey, M., Duggan, N., Holmes, A.M., Good, R., Stringer, R., Jones, P., Morrell, N.W., Jarai, G., Walker, C., Westwick, J., Thomas, M., 2011. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 1171–1182. doi:10.1164/rccm.201103-0412OC

Clowes, A.W., Reidy, M.A., Clowes, M.M., 1983. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 49, 327–333.

Clowes, A.W., Schwartz, S.M., 1985. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ. Res.* 56, 139–145.

Cobaleda, C., Pérez-Caro, M., Vicente-Dueñas, C., Sánchez-García, I., 2007. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu. Rev. Genet.* 41, 41–61. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130146

Cooley, B.C., Nevado, J., Mellad, J., Yang, D., St Hilaire, C., Negro, A., Fang, F., Chen, G., San, H., Walts, A.D., Schwartzbeck, R.L., Taylor, B., Lanzer, J.D., Wragg, A., Elagha, A., Beltran, L.E., Berry, C., Feil, R., Virmani, R., Ladich, E., Kovacic, J.C., Boehm, M., 2014. TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci. Transl. Med.* 6, 227ra34.

doi:10.1126/scitranslmed.3006927

- Cordes, K.R., Sheehy, N.T., White, M.P., Berry, E.C., Morton, S.U., Muth, A.N., Lee, T.-H., Miano, J.M., Ivey, K.N., Srivastava, D., 2009. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460, 705–710. doi:10.1038/nature08195
- Courboulin, A., Paulin, R., Giguère, N.J., Saksouk, N., Perreault, T., Meloche, J., Paquet, E.R., Biardel, S., Provencher, S., Côté, J., Simard, M.J., Bonnet, S., 2011. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* 208, 535–548. doi:10.1084/jem.20101812
- Crosby, M.E., Almasan, A., 2004. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biol. Ther.* 3, 1208–1211.
- Cui, R.-R., Li, S.-J., Liu, L.-J., Yi, L., Liang, Q.-H., Zhu, X., Liu, G.-Y., Liu, Y., Wu, S.-S., Liao, X.-B., Yuan, L.-Q., Mao, D.-A., Liao, E.-Y., 2012. MicroRNA-204 regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* 96, 320–329. doi:10.1093/cvr/cvs258
- Daniel, J.-M., Bielenberg, W., Stieger, P., Weinert, S., Tillmanns, H., Sedding, D.G., 2010. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1890–1896. doi:10.1161/ATVBAHA.110.209692
- Davani, S., Marandin, A., Mersin, N., Royer, B., Kantelip, B., Hervé, P., Etievent, J.-P., Kantelip, J.-P., 2003. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108 Suppl 1, II253-258. doi:10.1161/01.cir.0000089186.09692.fa
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., Hata, A., 2008. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56–61. doi:10.1038/nature07086
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Nguyen, P.H., Lagna, G., Hata, A., 2009. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J. Biol. Chem.* 284, 3728–3738. doi:10.1074/jbc.M808788200
- De Craene, B., Berx, G., 2013. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* 13, 97–110. doi:10.1038/nrc3447
- Deaton, R.A., Gan, Q., Owens, G.K., 2009. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 296, H1027-1037. doi:10.1152/ajpheart.01230.2008
- DeGregori, J., Johnson, D.G., 2006. Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Curr. Mol. Med.* 6, 739–748.
- del Barrio, M.G., Nieto, M.A., 2002. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Dev. Camb. Engl.* 129, 1583–1593.
- Deng, D.X.-F., Spin, J.M., Tsalenko, A., Vailaya, A., Ben-Dor, A., Yakhini, Z., Tsao, P., Bruhn, L., Quertermous, T., 2006. Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1058–1065. doi:10.1161/01.ATV.0000208185.16371.97
- Díez, M., Barberà, J.A., Ferrer, E., Fernández-Lloris, R., Pizarro, S., Roca, J., Peinado, V.I., 2007. Plasticity of CD133+ cells: role in pulmonary vascular remodeling. *Cardiovasc. Res.* 76, 517–527. doi:10.1016/j.cardiores.2007.08.007
- Díez, M., Musri, M.M., Ferrer, E., Barberà, J.A., Peinado, V.I., 2010. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc. Res.* 88, 502–511. doi:10.1093/cvr/cvq236

Dmitriev, P., Barat, A., Polesskaya, A., O'Connell, M.J., Robert, T., Dessen, P., Walsh, T.A., Lazar, V., Turki, A., Carnac, G., Laoudj-Chenivresse, D., Lipinski, M., Vassetzky, Y.S., 2013. Simultaneous miRNA and mRNA transcriptome profiling of human myoblasts reveals a novel set of myogenic differentiation-associated miRNAs and their target genes. *BMC Genomics* 14, 265. doi:10.1186/1471-2164-14-265

Doi, H., Iso, T., Sato, H., Yamazaki, M., Matsui, H., Tanaka, T., Manabe, I., Arai, M., Nagai, R., Kurabayashi, M., 2006. Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 28555–28564. doi:10.1074/jbc.M602749200

Doi, H., Iso, T., Shiba, Y., Sato, H., Yamazaki, M., Oyama, Y., Akiyama, H., Tanaka, T., Tomita, T., Arai, M., Takahashi, M., Ikeda, U., Kurabayashi, M., 2009. Notch signaling regulates the differentiation of bone marrow-derived cells into smooth muscle-like cells during arterial lesion formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 654–659. doi:10.1016/j.bbrc.2009.02.116

Domínguez-Fandos, D., Peinado, V.I., Puig-Pey, R., Ferrer, E., Musri, M.M., Ramírez, J., Barberà, J.A., 2012. Pulmonary inflammatory reaction and structural changes induced by cigarette smoke exposure in the Guinea pig. *COPD* 9, 473–484. doi:10.3109/15412555.2012.691999

Domínguez-Fandos, D., Valdés, C., Ferrer, E., Puig-Pey, R., Blanco, I., Tura-Ceide, O., Paul, T., Peinado, V.I., Barberà, J.A., 2015. Sildenafil in a cigarette smoke-induced model of COPD in the guinea-pig. *Eur. Respir. J.* 46, 346–354. doi:10.1183/09031936.00139914

Dong, J., Zhao, Y., Huang, Q., Fei, X., Diao, Y., Shen, Y., Xiao, H., Zhang, T., Lan, Q., Gu, X., 2011. Glioma stem/progenitor cells contribute to neovascularization via transdifferentiation. *Stem Cell Rev.* 7, 141–152. doi:10.1007/s12015-010-9169-7

Durocher, D., Nemer, M., 1998. Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev. Genet.* 22, 250–262. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<250::AID-DVG7>3.0.CO;2-5

Ebert, M.S., Neilson, J.R., Sharp, P.A., 2007. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* 4, 721–726. doi:10.1038/nmeth1079

Elbashir, S.M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188–200.

Elia, L., Quintavalle, M., Zhang, J., Contu, R., Cossu, L., Latronico, M.V.G., Peterson, K.L., Indolfi, C., Catalucci, D., Chen, J., Courtneidge, S.A., Condorelli, G., 2009. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ.* 16, 1590–1598. doi:10.1038/cdd.2009.153

Ergün, S., Tilki, D., Hohn, H.-P., Gehling, U., Kilic, N., 2007. Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thromb. Haemost.* 98, 930–939.

Ezzie, M.E., Crawford, M., Cho, J.-H., Orellana, R., Zhang, S., Gelinas, R., Batte, K., Yu, L., Nuovo, G., Galas, D., Diaz, P., Wang, K., Nana-Sinkam, S.P., 2012. Gene expression networks in COPD: microRNA and mRNA regulation. *Thorax* 67, 122–131. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200089

Fleenor, B.S., Marshall, K.D., Rippe, C., Seals, D.R., 2012. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation. *J. Vasc. Res.* 49, 59–64. doi:10.1159/000329681

Formosa, A., Markert, E.K., Lena, A.M., Italiano, D., Finazzi-Agro, E., Levine, A.J., Bernardini, S., Garabadgiu, A.V., Melino, G., Candi, E., 2014. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis,

migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene* 33, 5173–5182. doi:10.1038/onc.2013.451

Frid, M.G., Kale, V.A., Stenmark, K.R., 2002. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ. Res.* 90, 1189–1196.

Frid, M.G., Li, M., Gnanasekharan, M., Burke, D.L., Fragoso, M., Strassheim, D., Sylman, J.L., Stenmark, K.R., 2009. Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and prometogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 297, L1059-1072. doi:10.1152/ajplung.90611.2008

Galiè, N., Torbicki, A., Barst, R., Darteville, P., Haworth, S., Higenbottam, T., Olschewski, H., Peacock, A., Pietra, G., Rubin, L.J., Simonneau, G., Priori, S.G., Garcia, M.A.A., Blanc, J.-J., Budaj, A., Cowie, M., Dean, V., Deckers, J., Burgos, E.F., Lekakis, J., Lindahl, B., Mazzotta, G., McGregor, K., Morais, J., Oto, A., Smiseth, O.A., Barbera, J.A., Gibbs, S., Hoeper, M., Humbert, M., Naeije, R., Pepke-Zaba, J., Task Force, 2004. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 25, 2243–2278. doi:10.1016/j.ehj.2004.09.014

Ghildiyal, M., Zamore, P.D., 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* 10, 94–108. doi:10.1038/nrg2504

Gibbons, G.H., Dzau, V.J., 1994. The emerging concept of vascular remodeling. *N. Engl. J. Med.* 330, 1431–1438. doi:10.1056/NEJM199405193302008

Gojo, S., Gojo, N., Takeda, Y., Mori, T., Abe, H., Kyo, S., Hata, J., Umezawa, A., 2003. In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* 288, 51–59.

Goldberg, I.D., Stemerman, M.B., Schnipper, L.E., Ransil, B.J., Crooks, G.W., Fuhro, R.L., 1979. Vascular smooth muscle cell kinetics: a new assay for studying patterns of cellular proliferation in vivo. *Science* 205, 920–922.

Good, R.B., Gilbane, A.J., Trinder, S.L., Denton, C.P., Coghlan, G., Abraham, D.J., Holmes, A.M., 2015. Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Pathol.* 185, 1850–1858. doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.019

Goukassian, D.A., Kishore, R., Krasinski, K., Dolan, C., Luedemann, C., Yoon, Y., Kearney, M., Hanley, A., Ma, H., Asahara, T., Isner, J.M., Losordo, D.W., 2003. Engineering the response to vascular injury: divergent effects of deregulated E2F1 expression on vascular smooth muscle cells and endothelial cells result in endothelial recovery and inhibition of neointimal growth. *Circ. Res.* 93, 162–169. doi:10.1161/01.RES.0000082980.94211.3A

Green, D.E., Murphy, T.C., Kang, B.-Y., Searles, C.D., Hart, C.M., 2015. PPAR γ Ligands Attenuate Hypoxia-Induced Proliferation in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells through Modulation of MicroRNA-21. *PloS One* 10, e0133391. doi:10.1371/journal.pone.0133391

Guil, S., Esteller, M., 2009. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Directed Issue: Epigenetics and Disease 41, 87–95. doi:10.1016/j.biocel.2008.09.005

Hamidi, S.A., Lin, R.Z., Szema, A.M., Lyubsky, S., Jiang, Y.P., Said, S.I., 2011. VIP and endothelin receptor antagonist: an effective combination against experimental pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 12, 141. doi:10.1186/1465-9921-12-141

Han, Z., Li, X., Wu, J., Olson, E.N., 2004. A myocardin-related transcription factor regulates activity of serum response factor in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

101, 12567–12572. doi:10.1073/pnas.0405085101

Hannus, M., Beitzinger, M., Engelmann, J.C., Weickert, M.-T., Spang, R., Hannus, S., Meister, G., 2014. siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic Acids Res.* 42, 8049–8061. doi:10.1093/nar/gku480

Hansson, G.K., 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 352, 1685–1695. doi:10.1056/NEJMra043430

Harris, K.S., Zhang, Z., McManus, M.T., Harfe, B.D., Sun, X., 2006. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2208–2213. doi:10.1073/pnas.0510839103

Hautmann, M.B., Madsen, C.S., Owens, G.K., 1997. A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J. Biol. Chem.* 272, 10948–10956.

Hay, E.D., 2005. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 706–720. doi:10.1002/dvdy.20345

He, L., Hannon, G.J., 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522–531. doi:10.1038/nrg1379

Heidersbach, A., Saxby, C., Carver-Moore, K., Huang, Y., Ang, Y.-S., de Jong, P.J., Ivey, K.N., Srivastava, D., 2013. microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *eLife* 2, e01323. doi:10.7554/eLife.01323

Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., Tollervey, D., 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153, 654–665. doi:10.1016/j.cell.2013.03.043

Herring, B.P., Hoggatt, A.M., Burlak, C., Offermanns, S., 2014. Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vasc. Cell* 6, 21. doi:10.1186/2045-824X-6-21

Hida, W., Tun, Y., Kikuchi, Y., Okabe, S., Shirato, K., 2002. Pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease: recent advances in pathophysiology and management. *Respirol. Carlton Vic* 7, 3–13.

High, F.A., Zhang, M., Proweller, A., Tu, L., Parmacek, M.S., Pear, W.S., Epstein, J.A., 2007. An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *J. Clin. Invest.* 117, 353–363. doi:10.1172/JCI30070

Hirschi, K.K., Lai, L., Belaguli, N.S., Dean, D.A., Schwartz, R.J., Zimmer, W.E., 2002. Transforming growth factor-beta induction of smooth muscle cell phenotype requires transcriptional and post-transcriptional control of serum response factor. *J. Biol. Chem.* 277, 6287–6295. doi:10.1074/jbc.M106649200

Hirschi, K.K., Majesky, M.W., 2004. Smooth muscle stem cells. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 276, 22–33. doi:10.1002/ar.a.10128

Hong, K.-H., Lee, Y.J., Lee, E., Park, S.O., Han, C., Beppu, H., Li, E., Raizada, M.K., Bloch, K.D., Oh, S.P., 2008. Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 118, 722–730. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.736801

Horita, H.N., Simpson, P.A., Ostriker, A., Furgeson, S., Van Putten, V., Weiser-Evans, M.C.M., Nemenoff, R.A., 2011. Serum response factor regulates expression of phosphatase and tensin homolog through a microRNA network in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2909–2919. doi:10.1161/ATVBAHA.111.233585

Hsieh, C.M., Yet, S.F., Layne, M.D., Watanabe, M., Hong, A.M., Perrella, M.A., Lee, M.E., 1999. Genomic cloning and promoter analysis of aortic preferentially expressed

gene-1. Identification of a vascular smooth muscle-specific promoter mediated by an E box motif. *J. Biol. Chem.* 274, 14344–14351.

Hu, Y., Davison, F., Ludewig, B., Erdel, M., Mayr, M., Url, M., Dietrich, H., Xu, Q., 2002. Smooth muscle cells in transplant atherosclerotic lesions are originated from recipients, but not bone marrow progenitor cells. *Circulation* 106, 1834–1839.

Huang, L., Zhang, S.-M., Zhang, P., Zhang, X.-J., Zhu, L.-H., Chen, K., Gao, L., Zhang, Y., Kong, X.-J., Tian, S., Zhang, X.-D., Li, H., 2014. Interferon regulatory factor 7 protects against vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e001309. doi:10.1161/JAHA.114.001309

Hubbard, T., Andrews, D., Caccamo, M., Cameron, G., Chen, Y., Clamp, M., Clarke, L., Coates, G., Cox, T., Cunningham, F., Curwen, V., Cutts, T., Down, T., Durbin, R., Fernandez-Suarez, X.M., Gilbert, J., Hammond, M., Herrero, J., Hotz, H., Howe, K., Iyer, V., Jekosch, K., Kahari, A., Kasprzyk, A., Keefe, D., Keenan, S., Kokocinski, F., London, D., Longden, I., McVicker, G., Melsopp, C., Meidl, P., Potter, S., Proctor, G., Rae, M., Rios, D., Schuster, M., Searle, S., Severin, J., Slater, G., Smedley, D., Smith, J., Spooner, W., Stabenau, A., Stalker, J., Storey, R., Trevanion, S., Ureta-Vidal, A., Vogel, J., White, S., Woodwark, C., Birney, E., 2005. Ensembl 2005. *Nucleic Acids Res.* 33, D447–453. doi:10.1093/nar/gki138

Huber, W., Carey, V.J., Gentleman, R., Anders, S., Carlson, M., Carvalho, B.S., Bravo, H.C., Davis, S., Gatto, L., Girke, T., Gottardo, R., Hahne, F., Hansen, K.D., Irizarry, R.A., Lawrence, M., Love, M.I., MacDonald, J., Obenchain, V., Oleś, A.K., Pagès, H., Reyes, A., Shannon, P., Smyth, G.K., Tenenbaum, D., Waldron, L., Morgan, M., 2015. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat. Methods* 12, 115–121. doi:10.1038/nmeth.3252

Humbert, M., Galie, N., 2016. The Ten Commandments for 2015 European Society of Cardiology–European Respiratory Society Guidelines on Pulmonary Hypertension. *Eur. Heart J.* 37, 5.

Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., Zamore, P.D., 2004. Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function. *PLOS Biol* 2, e98. doi:10.1371/journal.pbio.0020098

Hutvagner, G., Zamore, P.D., 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056–2060. doi:10.1126/science.1073827

Igura, T., Kawata, S., Miyagawa, J., Inui, Y., Tamura, S., Fukuda, K., Isozaki, K., Yamamori, K., Taniguchi, N., Higashiyama, S., Matsuzawa, Y., 1996. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells induced by balloon injury in rat carotid arteries. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1524–1531.

Ikenouchi, J., Matsuda, M., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J. Cell Sci.* 116, 1959–1967. doi:10.1242/jcs.00389

Imanishi, M., Tomita, S., Ishizawa, K., Kihira, Y., Ueno, M., Izawa-Ishizawa, Y., Ikeda, Y., Yamano, N., Tsuchiya, K., Tamaki, T., 2014. Smooth muscle cell-specific Hif-1 α deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodelling in mice. *Cardiovasc. Res.* 102, 460–468. doi:10.1093/cvr/cvu061

Ingram, D.A., Mead, L.E., Moore, D.B., Woodard, W., Fenoglio, A., Yoder, M.C., 2005. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 105, 2783–2786. doi:10.1182/blood-2004-08-3057

Inoue, T., Sakai, Y., Hoshi, K., Yaguchi, I., Fujito, T., Morooka, S., 1998. Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation* 97, 2511–

2518.

Irizarry, R.A., Bolstad, B.M., Collin, F., Cope, L.M., Hobbs, B., Speed, T.P., 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res.* 31, e15.

Iso, T., Hamamori, Y., Kedes, L., 2003. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 543–553.

doi:10.1161/01.ATV.0000060892.81529.8F

Jacquier, A., 2009. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 10, 833–844.

doi:10.1038/nrg2683

Jeffery, T.K., Wanstall, J.C., 2001. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol. Ther.* 92, 1–20.

Ji, R., Cheng, Y., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H., Dean, D.B., Zhang, C., 2007.

MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ. Res.* 100, 1579–1588.

doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.141986

Johnson, A.D., Owens, G.K., 1999. Differential activation of the SMalphaA promoter in smooth vs. skeletal muscle cells by bHLH factors. *Am. J. Physiol.* 276, C1420–1431.

Joppa, P., Petrasova, D., Stancak, B., Tkacova, R., 2006. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 130, 326–333.

doi:10.1378/chest.130.2.326

Kalluri, R., 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417–1419. doi:10.1172/JCI39675

Kalluri, R., Weinberg, R.A., 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428. doi:10.1172/JCI39104

Katz, J.P., Perreault, N., Goldstein, B.G., Lee, C.S., Labosky, P.A., Yang, V.W., Kaestner, K.H., 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Dev. Camb. Engl.* 129, 2619–2628.

Kawai-Kowase, K., Kumar, M.S., Hoofnagle, M.H., Yoshida, T., Owens, G.K., 2005. PIAS1 activates the expression of smooth muscle cell differentiation marker genes by interacting with serum response factor and class I basic helix-loop-helix proteins. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8009–8023. doi:10.1128/MCB.25.18.8009-8023.2005

Kawai-Kowase, K., Owens, G.K., 2007. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C59–69. doi:10.1152/ajpcell.00394.2006

Kim, J., Kang, Y., Kojima, Y., Lighthouse, J.K., Hu, X., Aldred, M.A., McLean, D.L., Park, H., Comhair, S.A., Greif, D.M., Erzurum, S.C., Chun, H.J., 2013. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* 19, 74–82. doi:10.1038/nm.3040

Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., Ruvkun, G., 2004. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 360–365.

doi:10.1073/pnas.2333854100

Kim, J.-D., Lee, A., Choi, J., Park, Y., Kang, H., Chang, W., Lee, M.-S., Kim, J., 2015. Epigenetic modulation as a therapeutic approach for pulmonary arterial hypertension. *Exp. Mol. Med.* 47, e175. doi:10.1038/emm.2015.45

Kim, M.-J., Park, K.-G., Lee, K.-M., Kim, H.-S., Kim, S.-Y., Kim, C.-S., Lee, S.-L., Chang, Y.-C., Park, J.-Y., Lee, K.-U., Lee, I.-K., 2005. Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F.

Hypertens. Dallas Tex 1979 45, 552–556. doi:10.1161/01.HYP.0000158263.64320.eb

Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., Mourelatos, Z., 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2

represses translation. *Cell* 129, 1141–1151. doi:10.1016/j.cell.2007.05.016

Kloosterman, W.P., Plasterk, R.H.A., 2006. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev. Cell* 11, 441–450. doi:10.1016/j.devcel.2006.09.009

Kokudo, T., Suzuki, Y., Yoshimatsu, Y., Yamazaki, T., Watabe, T., Miyazono, K., 2008. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J. Cell Sci.* 121, 3317–3324. doi:10.1242/jcs.028282

Kovacic, J.C., Mercader, N., Torres, M., Boehm, M., Fuster, V., 2012. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 125, 1795–1808. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M., 2005. Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* 438, 685–689. doi:10.1038/nature04303

Kumar, M.S., Hendrix, J.A., Johnson, A.D., Owens, G.K., 2003. Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ. Res.* 92, 840–847. doi:10.1161/01.RES.0000069031.55281.7C

Kumar, M.S., Owens, G.K., 2003. Combinatorial Control of Smooth Muscle-Specific Gene Expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 737–747. doi:10.1161/01.ATV.0000065197.07635.BA

Kurpinski, K., Lam, H., Chu, J., Wang, A., Kim, A., Tsay, E., Agrawal, S., Schaffer, D.V., Li, S., 2010. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 28, 734–742. doi:10.1002/stem.319

Lagna, G., Ku, M.M., Nguyen, P.H., Neuman, N.A., Davis, B.N., Hata, A., 2007. Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J. Biol. Chem.* 282, 37244–37255. doi:10.1074/jbc.M708137200

Lal, A., Navarro, F., Maher, C.A., Maliszewski, L.E., Yan, N., O’Day, E., Chowdhury, D., Dykxhoorn, D.M., Tsai, P., Hofmann, O., Becker, K.G., Gorospe, M., Hide, W., Lieberman, J., 2009. miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to “seedless” 3’UTR microRNA recognition elements. *Mol. Cell* 35, 610–625. doi:10.1016/j.molcel.2009.08.020

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196. doi:10.1038/nrm3758

Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V., 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060. doi:10.1038/sj.emboj.7600385

Lewis, B.P., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035

Li, G., Chen, S.J., Oparil, S., Chen, Y.F., Thompson, J.A., 2000. Direct in vivo evidence demonstrating neointimal migration of adventitial fibroblasts after balloon injury of rat carotid arteries. *Circulation* 101, 1362–1365.

Li, J.-M., Cui, T.-X., Shiuchi, T., Liu, H.-W., Min, L.-J., Okumura, M., Jinno, T., Wu, L., Iwai, M., Horiuchi, M., 2004. Nicotine enhances angiotensin II-induced mitogenic response in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Arterioscler. Thromb. Vasc.*

Biol. 24, 80–84. doi:10.1161/01.ATV.0000104007.17365.1c

Li, Y., Takeshita, K., Liu, P.-Y., Satoh, M., Oyama, N., Mukai, Y., Chin, M.T., Krebs, L., Kotlikoff, M.I., Radtke, F., Gridley, T., Liao, J.K., 2009. Smooth muscle Notch1 mediates neointimal formation after vascular injury. *Circulation* 119, 2686–2692. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790485

Li, Y., Yan, L., Zhang, W., Hu, N., Chen, W., Wang, H., Kang, M., Ou, H., 2014. MicroRNA-21 inhibits platelet-derived growth factor-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation and migration through targeting activator protein-1. *Am. J. Transl. Res.* 6, 507–516.

Ling, J., Jiang, L., Zhang, C., Dai, J., Wu, Q., Tan, J., 2015. Upregulation of miR-197 inhibits cell proliferation by directly targeting IGFBP5 in human uterine leiomyoma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 51, 835–842. doi:10.1007/s11626-015-9887-x

Liu, N., Bezprozvannaya, S., Williams, A.H., Qi, X., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2008. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev.* 22, 3242–3254. doi:10.1101/gad.1738708

Liu, Y., Sinha, S., McDonald, O.G., Shang, Y., Hoofnagle, M.H., Owens, G.K., 2005. Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J. Biol. Chem.* 280, 9719–9727. doi:10.1074/jbc.M412862200

Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., Gallagher, W.M., Eccles, S.A., Croce, C.M., Esteller, M., 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13556–13561. doi:10.1073/pnas.0803055105

Mack, C.P., Owens, G.K., 1999. Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ. Res.* 84, 852–861.

Madsen, C.S., Hershey, J.C., Hautmann, M.B., White, S.L., Owens, G.K., 1997. Expression of the smooth muscle myosin heavy chain gene is regulated by a negative-acting GC-rich element located between two positive-acting serum response factor-binding elements. *J. Biol. Chem.* 272, 6332–6340.

Majesky, M.W., 2007. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1248–1258. doi:10.1161/ATVBAHA.107.141069

Manabe, I., Owens, G.K., 2001. CArG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *J. Clin. Invest.* 107, 823–834. doi:10.1172/JCI11385

Mano, T., Luo, Z., Malendowicz, S.L., Evans, T., Walsh, K., 1999. Reversal of GATA-6 downregulation promotes smooth muscle differentiation and inhibits intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circ. Res.* 84, 647–654.

Martínez-Estrada, O.M., Cullerés, A., Soriano, F.X., Peinado, H., Bolós, V., Martínez, F.O., Reina, M., Cano, A., Fabre, M., Vilaró, S., 2006. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem. J.* 394, 449–457. doi:10.1042/BJ20050591

Maruyama, H., Dewachter, C., Belhaj, A., Rondelet, B., Sakai, S., Rimmelink, M., Vachier, J.-L., Naeije, R., Dewachter, L., 2015. Endothelin-Bone morphogenetic protein type 2 receptor interaction induces pulmonary artery smooth muscle cell hyperplasia in pulmonary arterial hypertension. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 34, 468–478. doi:10.1016/j.healun.2014.09.011

Massa, M., Rosti, V., Ramajoli, I., Campanelli, R., Pecci, A., Viarengo, G., Meli, V., Marchetti, M., Hoffman, R., Barosi, G., 2005. Circulating CD34+, CD133+, and vascular endothelial growth factor receptor 2-positive endothelial progenitor cells in

myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 23, 5688–5695. doi:10.1200/JCO.2005.09.021

McDonald, R.A., Hata, A., MacLean, M.R., Morrell, N.W., Baker, A.H., 2012. MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 93, 594–604. doi:10.1093/cvr/cvr299

Meister, G., Landthaler, M., Dorsett, Y., Tuschl, T., 2004. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA N. Y. N* 10, 544–550.

Milara, J., Peiró, T., Serrano, A., Cortijo, J., 2013. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke. *Thorax* 68, 410–420. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201761

Misra, S., Fu, A.A., Misra, K.D., Shergill, U.M., Leof, E.B., Mukhopadhyay, D., 2010. Hypoxia-induced phenotypic switch of fibroblasts to myofibroblasts through a matrix metalloproteinase 2/tissue inhibitor of metalloproteinase-mediated pathway: implications for venous neointimal hyperplasia in hemodialysis access. *J. Vasc. Interv. Radiol. JVIR* 21, 896–902. doi:10.1016/j.jvir.2010.02.030

Mistry, D.S., Chen, Y., Wang, Y., Zhang, K., Sen, G.L., 2014. SNAI2 controls the undifferentiated state of human epidermal progenitor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 3209–3218. doi:10.1002/stem.1809

Montani, D., Perros, F., Gambaryan, N., Girerd, B., Dorfmueller, P., Price, L.C., Huertas, A., Hammad, H., Lambrecht, B., Simonneau, G., Launay, J.-M., Cohen-Kaminsky, S., Humbert, M., 2011. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 116–123. doi:10.1164/rccm.201006-0905OC

Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S.M., Villa, S., Bolós, V., Jordá, M., Fabra, A., Portillo, F., Palacios, J., Cano, A., 2006. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66, 9543–9556. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0479

Morrissey, E.E., Ip, H.S., Lu, M.M., Parmacek, M.S., 1996. GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev. Biol.* 177, 309–322. doi:10.1006/dbio.1996.0165

Morrow, D., Scheller, A., Birney, Y.A., Sweeney, C., Guha, S., Cummins, P.M., Murphy, R., Walls, D., Redmond, E.M., Cahill, P.A., 2005. Notch-mediated CBF-1/RBP-J $\{\kappa\}$ -dependent regulation of human vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, C1188-1196. doi:10.1152/ajpcell.00198.2005

Moser, M., Patterson, C., 2005. Bone morphogenetic proteins and vascular differentiation: BMPing up vasculogenesis. *Thromb. Haemost.* 94, 713–718. doi:10.1160/TH05-05-0312

Moss, E.G., Lee, R.C., Ambros, V., 1997. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 88, 637–646.

Murray, S.A., Gridley, T., 2006. Snail1 gene function during early embryo patterning in mice. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 2566–2570. doi:10.4161/cc.5.22.3502

Naeije, R., 2005. Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2, 20–22. doi:10.1513/pats.200407-037MS

Nagai, R., Suzuki, T., Aizawa, K., Shindo, T., Manabe, I., 2005. Significance of the transcription factor KLF5 in cardiovascular remodeling. *J. Thromb. Haemost. JTH* 3, 1569–1576. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01366.x

Newby, A.C., 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev.* 85, 1–31.

doi:10.1152/physrev.00048.2003

Newkirk, K.M., MacKenzie, D.A., Bakaletz, A.P., Hudson, L.G., Kusewitt, D.F., 2008. Microarray analysis demonstrates a role for Slug in epidermal homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 128, 361–369. doi:10.1038/sj.jid.5700990

Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G., Cooke, J., 1994. Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264, 835–839.

Nosedá, M., Fu, Y., Niessen, K., Wong, F., Chang, L., McLean, G., Karsan, A., 2006. Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ. Res.* 98, 1468–1470. doi:10.1161/01.RES.0000229683.81357.26

Nosedá, M., McLean, G., Niessen, K., Chang, L., Pollet, I., Montpetit, R., Shahidi, R., Dorovini-Zis, K., Li, L., Beckstead, B., Durand, R.E., Hoodless, P.A., Karsan, A., 2004. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ. Res.* 94, 910–917.

doi:10.1161/01.RES.0000124300.76171.C9

Osborn, J.K., Weissberg, P.L., Shanahan, C.M., 1995. A regulatory element downstream of the rat SM22 alpha gene transcription start point enhances reporter gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gene* 154, 249–253.

Ostriker, A., Horita, H.N., Poczobutt, J., Weiser-Evans, M.C.M., Nemenoff, R.A., 2014. Vascular smooth muscle cell-derived transforming growth factor- β promotes maturation of activated, neointima lesion-like macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 877–886. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303214

Owens, G.K., 1995. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75, 487–517.

Owens, G.K., Kumar, M.S., Wamhoff, B.R., 2004. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.* 84, 767–801. doi:10.1152/physrev.00041.2003

Ozasa, Y., Akazawa, H., Qin, Y., Tateno, K., Ito, K., Kudo-Sakamoto, Y., Yano, M., Yabumoto, C., Naito, A.T., Oka, T., Lee, J.-K., Minamino, T., Nagai, T., Kobayashi, Y., Komuro, I., 2013. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Hypertens. Res. Off. J. Jpn. Soc. Hypertens.* 36, 859–865. doi:10.1038/hr.2013.52

Pankey, E.A., Byun, R.J., Smith, W.B., Bhartiya, M., Bueno, F.R., Badejo, A.M., Stasch, J.-P., Murthy, S.N., Nossaman, B.D., Kadowitz, P.J., 2012. The Rho kinase inhibitor azaindole-1 has long-acting vasodilator activity in the pulmonary vascular bed of the intact chest rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90, 825–835. doi:10.1139/y2012-061

Parikh, V.N., Jin, R.C., Rabello, S., Gulbahce, N., White, K., Hale, A., Cottrill, K.A., Shaik, R.S., Waxman, A.B., Zhang, Y.-Y., Maron, B.A., Hartner, J.C., Fujiwara, Y., Orkin, S.H., Haley, K.J., Barabási, A.-L., Loscalzo, J., Chan, S.Y., 2012. MicroRNA-21 integrates pathogenic signaling to control pulmonary hypertension: results of a network bioinformatics approach. *Circulation* 125, 1520–1532.

doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060269

Peinado, V.I., Barberá, J.A., Abate, P., Ramírez, J., Roca, J., Santos, S., Rodríguez-Roisin, R., 1999. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1605–1611. doi:10.1164/ajrccm.159.5.9807059

Peinado, V.I., Ramírez, J., Roca, J., Rodríguez-Roisin, R., Barberà, J.A., 2006. Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34, 257–263. doi:10.1165/rcmb.2005-0255OC

Peng, X., Li, H.-X., Shao, H.-J., Li, G.-W., Sun, J., Xi, Y.-H., Li, H.-Z., Wang, X.-Y., Wang, L.-N., Bai, S.-Z., Zhang, W.-H., Zhang, L., Yang, G.-D., Wu, L.-Y., Wang, R.,

Xu, C.-Q., 2014. Involvement of calcium-sensing receptors in hypoxia-induced vascular remodeling and pulmonary hypertension by promoting phenotypic modulation of small pulmonary arteries. *Mol. Cell. Biochem.* 396, 87–98. doi:10.1007/s11010-014-2145-9

Pérez-Losada, J., Sánchez-Martín, M., Rodríguez-García, A., Sánchez, M.L., Orfao, A., Flores, T., Sánchez-García, I., 2002. Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood* 100, 1274–1286.

Perros, F., Montani, D., Dorfmüller, P., Durand-Gasselín, I., Tcherakian, C., Le Pavec, J., Mazmanian, M., Fadel, E., Mussot, S., Mercier, O., Hervé, P., Emilie, D., Eddahibi, S., Simonneau, G., Souza, R., Humbert, M., 2008. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 81–88. doi:10.1164/rccm.200707-1037OC

Perry, M.M., Moschos, S.A., Williams, A.E., Shepherd, N.J., Larner-Svensson, H.M., Lindsay, M.A., 2008. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 180, 5689–5698.

Pizarro, S., García-Lucio, J., Peinado, V.I., Tura-Ceide, O., Díez, M., Blanco, I., Sitges, M., Petriz, J., Torralba, Y., Marín, P., Roca, J., Barberà, J.A., 2014. Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PloS One* 9, e106163. doi:10.1371/journal.pone.0106163

Proweller, A., Pear, W.S., Parmacek, M.S., 2005. Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 280, 8994–9004. doi:10.1074/jbc.M413316200

Pullamsetti, S.S., Doebele, C., Fischer, A., Savai, R., Kojonazarov, B., Dahal, B.K., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Grimminger, F., Bonauer, A., Seeger, W., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., Schermuly, R.T., 2012. Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 185, 409–419. doi:10.1164/rccm.201106-1093OC

Qiao, L., Nishimura, T., Shi, L., Sessions, D., Thrasher, A., Trudell, J.R., Berry, G.J., Pearl, R.G., Kao, P.N., 2014. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension. *Circulation* 129, 692–703. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003734

Qiu, P., Li, L., 2002. Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression. *Circ. Res.* 90, 858–865.

Qiu, P., Ritchie, R.P., Fu, Z., Cao, D., Cumming, J., Miano, J.M., Wang, D.-Z., Li, H.J., Li, L., 2005. Myocardin enhances Smad3-mediated transforming growth factor-beta1 signaling in a CArG box-independent manner: Smad-binding element is an important cis element for SM22alpha transcription in vivo. *Circ. Res.* 97, 983–991. doi:10.1161/01.RES.0000190604.90049.71

Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G., Courtneidge, S.A., 2010. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* 189, 13–22. doi:10.1083/jcb.200912096

Rabinovitch, M., 2001. Pathobiology of pulmonary hypertension. *Extracellular matrix. Clin. Chest Med.* 22, 433–449, viii.

Ranchoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Péchoux, C., Bogaard, H.J., Dorfmüller, P., Remy, S., Lecerf, F., Planté, S., Chat, S., Fadel, E., Houssaini, A., Anegón, I., Adnot, S., Simonneau, G., Humbert, M., Cohen-Kaminsky, S., Perros, F., 2015. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 131, 1006–1018. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750

Redmond, E.M., Liu, W., Hamm, K., Hatch, E., Cahill, P.A., Morrow, D., 2014. Perivascular delivery of Notch 1 siRNA inhibits injury-induced arterial remodeling.

PloS One 9, e84122. doi:10.1371/journal.pone.0084122

Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., Giegerich, R., 2004. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA N. Y. N* 10, 1507–1517. doi:10.1261/rna.5248604

Rieder, F., Kessler, S.P., West, G.A., Bhilocha, S., de la Motte, C., Sadler, T.M., Gopalan, B., Stylianou, E., Fiocchi, C., 2011. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am. J. Pathol.* 179, 2660–2673. doi:10.1016/j.ajpath.2011.07.042

Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47. doi:10.1093/nar/gkv007

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 14, 1902–1910. doi:10.1101/gr.2722704

Romero, L.I., Zhang, D.N., Herron, G.S., Karasek, M.A., 1997. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 173, 84–92. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199710)173:1<84::AID-JCP10>3.0.CO;2-N

Ross, R., 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801–809. doi:10.1038/362801a0

Roy, R., Couriel, J.M., 2006. Secondary pulmonary hypertension. *Paediatr. Respir. Rev.* 7, 36–44. doi:10.1016/j.prrv.2005.11.004

Ruffenach, G., Chabot, S., Tanguay, V.F., Courboulin, A., Boucherat, O., Potus, F., Meloche, J., Pflieger, A., Breuils-Bonnet, S., Nadeau, V., Paradis, R., Tremblay, E., Girerd, B., Hautefort, A., Montani, D., Fadel, E., Dorfmueller, P., Humbert, M., Perros, F., Paulin, R., Provencher, S., Bonnet, S., 2016. Role for RUNX2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* doi:10.1164/rccm.201512-2380OC

Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakamura, K., Hirata, Y., Nagai, R., 2007. Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation* 115, 509–517. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655837

Sainz, J., Al Haj Zen, A., Caligiuri, G., Demerens, C., Urbain, D., Lemitre, M., Lafont, A., 2006. Isolation of “side population” progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 281–286. doi:10.1161/01.ATV.0000197793.83391.91

Saiura, A., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., Makuuchi, M., 2001. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat. Med.* 7, 382–383. doi:10.1038/86394

Sakao, S., Tatsumi, K., Voelkel, N.F., 2010. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 43, 629–634. doi:10.1165/rcmb.2009-0389TR

Salmon, M., Gomez, D., Greene, E., Shankman, L., Owens, G.K., 2012. Cooperative binding of KLF4, pELK-1, and HDAC2 to a G/C repressor element in the SM22 α promoter mediates transcriptional silencing during SMC phenotypic switching in vivo. *Circ. Res.* 111, 685–696. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.269811

Santos, S., Peinado, V.I., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R., Barberà, J.A., 2002. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur. Respir. J.* 19, 632–638.

Sarkar, J., Gou, D., Turaka, P., Viktorova, E., Ramchandran, R., Raj, J.U., 2010. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell

proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 299, L861-871. doi:10.1152/ajplung.00201.2010

Sarrió, D., Rodríguez-Pinilla, S.M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., Palacios, J., 2008. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 68, 989–997. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2017

Sartore, S., Chiavegato, A., Faggini, E., Franch, R., Puato, M., Ausoni, S., Pualetto, P., 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ. Res.* 89, 1111–1121.

Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y., Nagai, R., 2002. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat. Med.* 8, 403–409. doi:10.1038/nm0402-403

Savagner, P., Yamada, K.M., Thiery, J.P., 1997. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 137, 1403–1419.

Scharadin, T.M., Eckert, R.L., 2014. TIG3: an important regulator of keratinocyte proliferation and survival. *J. Invest. Dermatol.* 134, 1811–1816. doi:10.1038/jid.2014.79

Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., Grimminger, F., 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115, 2811–2821. doi:10.1172/JCI24838

Schmitt-Gräff, A., Desmoulière, A., Gabbiani, G., 1994. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 425, 3–24.

Schober, A., 2008. Chemokines in Vascular Dysfunction and Remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1950–1959. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161224

Sefton, M., Sánchez, S., Nieto, M.A., 1998. Conserved and divergent roles for members of the Snail family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Dev. Camb. Engl.* 125, 3111–3121.

Seimetz, M., Parajuli, N., Pichl, A., Veit, F., Kwapiszewska, G., Weisel, F.C., Milger, K., Egemnazarov, B., Turowska, A., Fuchs, B., Nikam, S., Roth, M., Sydykov, A., Medebach, T., Klepetko, W., Jaksch, P., Dumitrescu, R., Garn, H., Voswinckel, R., Kostin, S., Seeger, W., Schermuly, R.T., Grimminger, F., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., 2011. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 147, 293–305. doi:10.1016/j.cell.2011.08.035

Sessa, R., Hata, A., 2013. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulm. Circ.* 3, 315–328. doi:10.4103/2045-8932.114758

Seward, D.J., Haney, J.C., Rudnicki, M.A., Swoap, S.J., 2001. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C408-413.

Shan, F., Li, J., Huang, Q.-Y., 2014. HIF-1 alpha-induced up-regulation of miR-9 contributes to phenotypic modulation in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *J. Cell. Physiol.* 229, 1511–1520. doi:10.1002/jcp.24593

Shankman, L.S., Gomez, D., Cherepanova, O.A., Salmon, M., Alencar, G.F., Haskins, R.M., Swiatlowska, P., Newman, A.A.C., Greene, E.S., Straub, A.C., Isakson, B., Randolph, G.J., Owens, G.K., 2015. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat. Med.* 21, 628–637. doi:10.1038/nm.3866

Sheikh, A.Q., Misra, A., Rosas, I.O., Adams, R.H., Greif, D.M., 2015. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci. Transl. Med.*

7, 308ra159. doi:10.1126/scitranslmed.aaa9712

Shi, Y., O'Brien, J.E., Fard, A., Mannion, J.D., Wang, D., Zalewski, A., 1996a. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 94, 1655–1664.

Shi, Y., O'Brien, J.E., Fard, A., Zalewski, A., 1996b. Transforming growth factor-beta 1 expression and myofibroblast formation during arterial repair. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 1298–1305.

Shirley, S.H., Hudson, L.G., He, J., Kusewitt, D.F., 2010. The skinny on Slug. *Mol. Carcinog.* 49, 851–861. doi:10.1002/mc.20674

Simper, D., Stalboerger, P.G., Panetta, C.J., Wang, S., Caplice, N.M., 2002. Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 106, 1199–1204.

Sinha, S., Hoofnagle, M.H., Kingston, P.A., McCanna, M.E., Owens, G.K., 2004. Transforming growth factor-beta1 signaling contributes to development of smooth muscle cells from embryonic stem cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C1560–1568. doi:10.1152/ajpcell.00221.2004

Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* 3, Article3. doi:10.2202/1544-6115.1027

Soleimani, V.D., Yin, H., Jahani-Asl, A., Ming, H., Kockx, C.E.M., van Ijcken, W.F.J., Grosveld, F., Rudnicki, M.A., 2012. Snail regulates MyoD binding-site occupancy to direct enhancer switching and differentiation-specific transcription in myogenesis. *Mol. Cell* 47, 457–468. doi:10.1016/j.molcel.2012.05.046

Song, J., Rolfe, B.E., Campbell, J.H., Campbell, G.R., 1998. Changes in three-dimensional architecture of microfilaments in cultured vascular smooth muscle cells during phenotypic modulation. *Tissue Cell* 30, 324–333.

Sorrell, J.M., Caplan, A.I., 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J. Cell Sci.* 117, 667–675. doi:10.1242/jcs.01005

Stark, A., Brennecke, J., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2003. Identification of *Drosophila* MicroRNA Targets. *PLOS Biol* 1, e60. doi:10.1371/journal.pbio.0000060

Starke, R.M., Ali, M.S., Jabbour, P.M., Tjoumakaris, S.I., Gonzalez, F., Hasan, D.M., Rosenwasser, R.H., Owens, G.K., Koch, W.J., Dumont, A.S., 2013. Cigarette smoke modulates vascular smooth muscle phenotype: implications for carotid and cerebrovascular disease. *PloS One* 8, e71954. doi:10.1371/journal.pone.0071954

Stenmark, K.R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., Das, M., 2006a. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiol. Bethesda Md* 21, 134–145. doi:10.1152/physiol.00053.2005

Stenmark, K.R., Fagan, K.A., Frid, M.G., 2006b. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* 99, 675–691. doi:10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f

Strange, C., Highland, K.B., 2005. Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 11, 452–455.

Subramanian, P., Karshovska, E., Reinhard, P., Megens, R.T.A., Zhou, Z., Akhtar, S., Schumann, U., Li, X., van Zandvoort, M., Ludin, C., Weber, C., Schober, A., 2010. Lysophosphatidic acid receptors LPA1 and LPA3 promote CXCL12-mediated smooth muscle progenitor cell recruitment in neointima formation. *Circ. Res.* 107, 96–105. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.212647

Sun, K., Lai, E.C., 2013. Adult-specific functions of animal microRNAs. *Nat. Rev. Genet.* 14, 535–548. doi:10.1038/nrg3471

Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., Takahashi, T., 2008. Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res.* 68, 5540–5545. doi:10.1158/0008-

5472.CAN-07-6460

- Takahashi, M., Nakamura, T., Toba, T., Kajiwara, N., Kato, H., Shimizu, Y., 2004. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng.* 10, 771–779. doi:10.1089/1076327041348563
- Tanaka, K., Sata, M., Hirata, Y., Nagai, R., 2003. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ. Res.* 93, 783–790. doi:10.1161/01.RES.0000096651.13001.B4
- Tang, R.-H., Zheng, X.-L., Callis, T.E., Stansfield, W.E., He, J., Baldwin, A.S., Wang, D.-Z., Selzman, C.H., 2008. Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3362–3367. doi:10.1073/pnas.0705842105
- Tang, Y., Feinberg, T., Keller, E.T., Li, X.-Y., Weiss, S.J., 2016. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat. Cell Biol.* 18, 917–929. doi:10.1038/ncb3394
- Tang, Y., Urs, S., Boucher, J., Bernaiche, T., Venkatesh, D., Spicer, D.B., Vary, C.P.H., Liaw, L., 2010. Notch and transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling pathways cooperatively regulate vascular smooth muscle cell differentiation. *J. Biol. Chem.* 285, 17556–17563. doi:10.1074/jbc.M109.076414
- Tang, Y., Urs, S., Liaw, L., 2008. Hairy-related transcription factors inhibit Notch-induced smooth muscle alpha-actin expression by interfering with Notch intracellular domain/CBF-1 complex interaction with the CBF-1-binding site. *Circ. Res.* 102, 661–668. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165134
- Ten Freyhaus, H., Berghausen, E.M., Janssen, W., Leuchs, M., Zierden, M., Murmann, K., Klinke, A., Vantler, M., Caglayan, E., Kramer, T., Baldus, S., Schermuly, R.T., Tallquist, M.D., Rosenkranz, S., 2015. Genetic Ablation of PDGF-Dependent Signaling Pathways Abolishes Vascular Remodeling and Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1236–1245. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304864
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007
- Thiery, J.P., Duband, J.L., Delouvé, A., 1982. Pathways and mechanisms of avian trunk neural crest cell migration and localization. *Dev. Biol.* 93, 324–343. doi:10.1016/0012-1606(82)90121-X
- Thunström, E., Glantz, H., Fu, M., Yucel-Lindberg, T., Petzold, M., Lindberg, K., Peker, Y., 2015. Increased inflammatory activity in nonobese patients with coronary artery disease and obstructive sleep apnea. *Sleep* 38, 463–471. doi:10.5665/sleep.4510
- Tintut, Y., Alfonso, Z., Saini, T., Radcliff, K., Watson, K., Boström, K., Demer, L.L., 2003. Multilineage potential of cells from the artery wall. *Circulation* 108, 2505–2510. doi:10.1161/01.CIR.0000096485.64373.C5
- Torella, D., Iaconetti, C., Catalucci, D., Ellison, G.M., Leone, A., Waring, C.D., Bochicchio, A., Vicinanza, C., Aquila, I., Curcio, A., Condorelli, G., Indolfi, C., 2011. MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ. Res.* 109, 880–893. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.240150
- Torreggiani, E., Lisignoli, G., Manferdini, C., Lambertini, E., Penolazzi, L., Vecchiatini, R., Gabusi, E., Chieco, P., Facchini, A., Gambari, R., Piva, R., 2012. Role of Slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Mol. Med.* 16, 740–751. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01352.x
- Torsney, E., Mandal, K., Halliday, A., Jahangiri, M., Xu, Q., 2007. Characterisation of progenitor cells in human atherosclerotic vessels. *Atherosclerosis* 191, 259–264. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.05.033

Trigueros-Motos, L., González-Granado, J.M., Cheung, C., Fernández, P., Sánchez-Cabo, F., Dopazo, A., Sinha, S., Andrés, V., 2013. Embryological-origin-dependent differences in homeobox expression in adult aorta: role in regional phenotypic variability and regulation of NF- κ B activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1248–1256. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300539

Tripathi, M.K., Misra, S., Chaudhuri, G., 2005. Negative regulation of the expressions of cytokeratins 8 and 19 by SLUG repressor protein in human breast cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 508–515. doi:10.1016/j.bbrc.2005.02.006

Tsai, J.H., Yang, J., 2013. Epithelial-mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. *Genes Dev.* 27, 2192–2206. doi:10.1101/gad.225334.113

Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., Jaenisch, R., Sharp, P.A., Jacks, T., 2008. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell* 132, 875–886. doi:10.1016/j.cell.2008.02.019

Vestbo, J., Hurd, S.S., Agustí, A.G., Jones, P.W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P.J., Fabbri, L.M., Martínez, F.J., Nishimura, M., Stockley, R.A., Sin, D.D., Rodríguez-Roisin, R., 2013. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187, 347–365. doi:10.1164/rccm.201204-0596PP

Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O., Yokoyama, S., 2007. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev.* 21, 1857–1862. doi:10.1101/gad.1566707

Wang, C.-H., Cherng, W.-J., Yang, N.-I., Kuo, L.-T., Hsu, C.-M., Yeh, H.-I., Lan, Y.-J., Yeh, C.-H., Stanford, W.L., 2008. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 54–60. doi:10.1161/ATVBAHA.107.147256

Wang, D., Chang, P.S., Wang, Z., Sutherland, L., Richardson, J.A., Small, E., Krieg, P.A., Olson, E.N., 2001. Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105, 851–862.

Wang, H., Jiang, M., Xu, Z., Huang, H., Gong, P., Zhu, H., Ruan, C., 2015. miR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 12901–12907.

Wang, H., Su, X., Yang, M., Chen, T., Hou, J., Li, N., Cao, X., 2015. Reciprocal control of miR-197 and IL-6/STAT3 pathway reveals miR-197 as potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 4, e1031440. doi:10.1080/2162402X.2015.1031440

Wang, R.-S., Loscalzo, J., 2016. Illuminating drug action by network integration of disease genes: a case study of myocardial infarction. *Mol. Biosyst.* 12, 1653–1666. doi:10.1039/c6mb00052e

Wang, X., Hu, G., Betts, C., Harmon, E.Y., Keller, R.S., Van De Water, L., Zhou, J., 2011. Transforming growth factor- β 1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein. *J. Biol. Chem.* 286, 41589–41599. doi:10.1074/jbc.M111.250878

Weber, C., Noels, H., 2011. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat. Med.* 17, 1410–1422. doi:10.1038/nm.2538

Weintraub, H., Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Adam, M.A., Lassar, A.B., Miller, A.D., 1989. Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5434–5438.

Weissmann, N., Lobo, B., Pichl, A., Parajuli, N., Seimetz, M., Puig-Pey, R., Ferrer, E.,

- Peinado, V.I., Domínguez-Fandos, D., Fysikopoulos, A., Stasch, J.-P., Ghofrani, H.A., Coll-Bonfill, N., Frey, R., Schermuly, R.T., García-Lucio, J., Blanco, I., Bednorz, M., Tura-Ceide, O., Tadele, E., Brandes, R.P., Grimminger, J., Klepetko, W., Jaksch, P., Rodriguez-Roisin, R., Seeger, W., Grimminger, F., Barberà, J.A., 2014. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 189, 1359–1373. doi:10.1164/rccm.201311-2037OC
- Welch-Reardon, K.M., Ehsan, S.M., Wang, K., Wu, N., Newman, A.C., Romero-Lopez, M., Fong, A.H., George, S.C., Edwards, R.A., Hughes, C.C.W., 2014. Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug. *J. Cell Sci.* 127, 2017–2028. doi:10.1242/jcs.143420
- Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G., 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.
- Wu, X., Ling, J., Fu, Z., Ji, C., Wu, J., Xu, Q., 2015. Effects of miRNA-197 overexpression on proliferation, apoptosis and migration in levonorgestrel treated uterine leiomyoma cells. *Biomed. Pharmacother. Bioméd. Pharmacothérapie* 71, 1–6. doi:10.1016/j.biopha.2015.02.004
- Xie, C., Huang, H., Sun, X., Guo, Y., Hamblin, M., Ritchie, R.P., Garcia-Barrio, M.T., Zhang, J., Chen, Y.E., 2011. MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev.* 20, 205–210. doi:10.1089/scd.2010.0283
- Xin, M., Small, E.M., Sutherland, L.B., Qi, X., McAnally, J., Plato, C.F., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev.* 23, 2166–2178. doi:10.1101/gad.1842409
- Yamamura, H., Masuda, H., Ikeda, W., Tokuyama, T., Takagi, M., Shibata, N., Tatsuta, M., Takahashi, K., 1997. Structure and expression of the human SM22alpha gene, assignment of the gene to chromosome 11, and repression of the promoter activity by cytosine DNA methylation. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 157–167.
- Yamashita, J., Itoh, H., Hirashima, M., Ogawa, M., Nishikawa, S., Yurugi, T., Naito, M., Nakao, K., Nishikawa, S., 2000. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92–96. doi:10.1038/35040568
- Yan, H., Xue, G., Mei, Q., Wang, Y., Ding, F., Liu, M.-F., Lu, M.-H., Tang, Y., Yu, H., Sun, S., 2009. Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *EMBO J.* 28, 2719–2732. doi:10.1038/emboj.2009.214
- Yang, Y., Sun, F., Zhang, C., Wang, H., Wu, G., Wu, Z., 2013. Hypoxia promotes cell proliferation by modulating E2F1 in chicken pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 28. doi:10.1186/2049-1891-4-28
- Yi, B., Cui, J., Ning, J., Wang, G., Qian, G., Lu, K., 2012. Over-expression of PKGI α inhibits hypoxia-induced proliferation, Akt activation, and phenotype modulation of human PSMCs: the role of phenotype modulation of PSMCs in pulmonary vascular remodeling. *Gene* 492, 354–360. doi:10.1016/j.gene.2011.11.010
- Yip, H.-K., Chang, L.-T., Sun, C.-K., Sheu, J.-J., Chiang, C.-H., Youssef, A.A., Lee, F.-Y., Wu, C.-J., Fu, M., 2008. Autologous transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Crit. Care Med.* 36, 873–880. doi:10.1097/CCM.0B013E318165B7EA
- Yoon, Y., Wecker, A., Heyd, L., Park, J.-S., Tkebuchava, T., Kusano, K., Hanley, A., Scadova, H., Qin, G., Cha, D.-H., Johnson, K.L., Aikawa, R., Asahara, T., Losordo, D.W., 2005. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow

regenerate myocardium after myocardial infarction. *J. Clin. Invest.* 115, 326–338. doi:10.1172/JCI22326

Yoshida, T., Gan, Q., Franke, A.S., Ho, R., Zhang, J., Chen, Y.E., Hayashi, M., Majesky, M.W., Somlyo, A.V., Owens, G.K., 2010. Smooth and cardiac muscle-selective knock-out of Kruppel-like factor 4 causes postnatal death and growth retardation. *J. Biol. Chem.* 285, 21175–21184. doi:10.1074/jbc.M110.112482

Yoshida, T., Gan, Q., Shang, Y., Owens, G.K., 2007. Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 292, C886-895. doi:10.1152/ajpcell.00449.2006

Yoshida, T., Kaestner, K.H., Owens, G.K., 2008. Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury. *Circ. Res.* 102, 1548–1557. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176974

Yoshida, T., Yamashita, M., Horimai, C., Hayashi, M., 2013. Smooth muscle-selective inhibition of nuclear factor- κ B attenuates smooth muscle phenotypic switching and neointima formation following vascular injury. *J. Am. Heart Assoc.* 2, e000230. doi:10.1161/JAHA.113.000230

Zalewski, A., Shi, Y., 1997. Vascular myofibroblasts. Lessons from coronary repair and remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 417–422.

Zeisberg, M., Kalluri, R., 2004. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in

renal fibrosis. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 82, 175–181. doi:10.1007/s00109-003-0517-9

Zeisberg, M., Neilson, E.G., 2009. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J. Clin. Invest.* 119, 1429–1437. doi:10.1172/JCI36183

Zengin, E., Chalajour, F., Gehling, U.M., Ito, W.D., Treede, H., Lauke, H., Weil, J., Reichenspurner, H., Kilic, N., Ergün, S., 2006. Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 1543–1551. doi:10.1242/dev.02315

Zhang, J., Cheng, Q., Zhou, Y., Wang, Y., Chen, X., 2013. Slug is a key mediator of hypoxia induced cadherin switch in HNSCC: correlations with poor prognosis. *Oral Oncol.* 49, 1043–1050. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.08.003

Zhou, W., Negash, S., Liu, J., Raj, J.U., 2009. Modulation of pulmonary vascular smooth muscle cell phenotype in hypoxia: role of cGMP-dependent protein kinase and myocardin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 296, L780-789. doi:10.1152/ajplung.90295.2008

Zhu, P., Huang, L., Ge, X., Yan, F., Wu, R., Ao, Q., 2006. Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int. J. Exp. Pathol.* 87, 463–474. doi:10.1111/j.1365-2613.2006.00503.x

Zoll, J., Fontaine, V., Gourdy, P., Barateau, V., Vilar, J., Leroyer, A., Lopes-Kam, I., Mallat, Z., Arnal, J.-F., Henry, P., Tobelem, G., Tedgui, A., 2008. Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovasc. Res.* 77, 471–480. doi:10.1093/cvr/cvm034

Annex

RESEARCH ARTICLE

Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype

Núria Coll-Bonfill¹, Victor I. Peinado^{1,2}, María V. Pisano⁶, Marcelina Párrizas³, Isabel Blanco¹, Maurits Evers⁴, Julia C. Engelmann⁴, Jessica García-Lucio¹, Olga Tura-Ceide^{1,2}, Gunter Meister⁵, Joan Albert Barberà^{1,2}, Melina M. Musri^{1,6}*

1 Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Biomedical Research Networking Center on Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain, **3** Diabetes and Obesity Laboratory, IDIBAPS, CIBERDEM, Barcelona, Spain, **4** Institute of Functional Genomics, University of Regensburg, Regensburg, Germany, **5** Biochemistry Center Regensburg (BZR), Laboratory for RNA Biology, University of Regensburg, Regensburg, Germany, **6** Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

✉ These authors contributed equally to this work.

* mmusri@clinic.ub.es



OPEN ACCESS

Citation: Coll-Bonfill N, Peinado VI, Pisano MV, Párrizas M, Blanco I, Evers M, et al. (2016) Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. PLoS ONE 11(7): e0159460. doi:10.1371/journal.pone.0159460

Editor: Qingzhong Xiao, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, UNITED KINGDOM

Received: April 14, 2016

Accepted: July 1, 2016

Published: July 21, 2016

Copyright: © 2016 Coll-Bonfill et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), grants FIS PI13/0083 to VIP and FIS PS09/00536 to JAB, and the Sociedad Española de Pneumología y Cirugía Torácica (SEPAR), grant SEPAR-2009 to MMM. MMM is recipient of a Sara Borrell contract from ISCIII. JGL is recipient of a Pre-doctoral contract from the ISCIII. MVP is recipient of a Post-doctoral contract from

Abstract

Objective

Previous studies have confirmed Slug as a key player in regulating phenotypic changes in several cell models, however, its role in smooth muscle cells (SMC) has never been assessed. The purpose of this study was to evaluate the expression of Slug during the phenotypic switch of SMC *in vitro* and throughout the development of vascular remodeling.

Methods and Results

Slug expression was decreased during both cell-to-cell contact and TGFβ1 induced SMC differentiation. Tumor necrosis factor-α (TNFα), a known inducer of a proliferative/dedifferentiated SMC phenotype, induces the expression of Slug in SMC. Slug knockdown blocked TNFα-induced SMC phenotypic change and significantly reduced both SMC proliferation and migration, while its overexpression blocked the TGFβ1-induced SMC differentiation and induced proliferation and migration. Genome-wide transcriptomic analysis showed that in SMC, Slug knockdown induced changes mainly in genes related to proliferation and migration, indicating that Slug controls these processes in SMC. Notably, Slug expression was significantly up-regulated in lungs of mice using a model of pulmonary hypertension-related vascular remodeling. Highly remodeled human pulmonary arteries also showed an increase of Slug expression compared to less remodeled arteries.

CONICET. This work was also funded by the Fundación Contra la Hipertensión Pulmonar (FCHP). "Cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Unión Europea. Una manera de hacer Europa". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

Abbreviations: SMC, Smooth Muscle Cells; EC, Endothelial Cells; EnMT, Endothelial to Mesenchymal Transition; MyoCD, Myocardin; SM-MHC, smooth muscle-myosin heavy chain 11; KLF4, Kruppel-like Factor 4; Sm22 α , Transgelin; α -SMA, α -Smooth Muscle Actin; R1, less remodeled arteries; R2, mildly remodeled arteries; R3, highly remodeled arteries; TNF α , Tumor Necrosis Factor alpha; TGF β 1, Transforming Growth Factor beta-1; VEGFR, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor; RARRES3, Retinoic Acid Receptor Responder Protein 3; HBEGF, Heparin-Binding Epidermal Growth Factor; KRT19, Keratin 19; CLDN1, Claudin 1; CNNA2, Cyclin A2; CH, Chronic Hypoxia; CS, Cigarette Smoke.

Conclusions

Slug emerges as a key transcription factor driving SMC towards a proliferative phenotype. The increased Slug expression observed *in vivo* in highly remodeled arteries of mice and human suggests a role of Slug in the pathogenesis of pulmonary vascular diseases.

Introduction

In contrast to other terminally differentiated cells, differentiated/contractile SMC retain high plasticity and can undergo a phenotypic switch towards a synthetic/dedifferentiated state under specific stimuli [1]. This feature is common in vascular remodeling-associated diseases such as pulmonary hypertension (PH), chronic obstructive pulmonary disease (COPD), arteriosclerosis, aortic aneurysm and post-angioplasty restenosis [1–4], in which dedifferentiated SMC from the media translocate into the intima and proliferate [5–7]. The mechanisms mediating this phenomenon involve inflammation, shear stress, and hypoxia [4,8,9,10]. Dedifferentiated SMC that become proliferative and migratory, express more extracellular matrix components and fewer SMC contractile proteins [1,3].

Differentiation of SMC is regulated by transcriptional regulators of the myocardin-related transcription factor family (MRTF), such as myocardin and myocardin-like proteins 1 and 2 (MLK1 and MLK2) [11]. Myocardin (myoCD) increases the expression of actin cytoskeletal proteins via serum response factor (SRF). Conversely, SMC phenotypic switch is mediated by both the loss of positive differentiation signals and by the induction of multiple complementary repressor pathways, such as Krüppel-like factor 4 (KLF4) and transcription factor Sp1 (SP1) [12]. Interestingly, increased MLK1 expression has been involved in the phenotypic transition of endothelial cells (EC) in an *in vitro* model of endothelial injury [12]; and, SP1 appears to be the main transcriptional regulator of endothelial to mesenchymal transition (EnMT) in a model of inflammatory bowel disease [13,14], suggesting that transitional changes in cell phenotype involved in different clinical settings may be regulated by similar molecular pathways.

Slug belongs to the Snail transcription factor family that is involved in several biological functions, including epithelial to mesenchymal transition (EMT), cell differentiation, cell motility, cell cycle regulation, and apoptosis. Slug participates directly in the dissociation of cell-to-cell contacts by repressing endothelial cadherin (VE-cadherin) gene expression, and indirectly, by increasing extracellular matrix proteins [15,16]. Recently, the role of Slug in the control of different transcriptional programs of stem cell differentiation has been highlighted [17–20]; nevertheless its function in SMC has never been studied.

In the present study, we investigated the role of Slug in the phenotypic switch of SMC and its potential participation in the development of human pulmonary vascular remodeling. We showed that Slug induced SMC to undergo a proliferative phenotype by at least, modulating genes coding for cell proliferation and cell migration related pathways. Interestingly, we found increased levels of Slug, but not of Snail, in a mouse model of PH-related vascular remodeling and a positive correlation of Slug expression with the degree of both lung obstruction and arterial wall thickness. In addition, we observed Slug up-regulation in human pulmonary arteries with high degree of vascular remodeling. To our knowledge, this is the first time that Slug has been related to SMC proliferation and to vascular remodeling.

Materials and Methods

Primary cell cultures

Human pulmonary artery SMC were purchased from Lonza (Cologne, Germany). They were cultured with an appropriate growth medium, which consist in basal medium (SmBM), supplemented with growth factors (SingleQuot Kit Supplement; Lonza) and 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza) as previously performed [20]. All primary cultures were used at passages three to eight and were maintained in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO₂.

Cell models of *in vitro* differentiation

SMC differentiation was induced by cell-to-cell contact [21]. While cells grown at 70%–80% confluence (D0) comprised SMC with a dedifferentiated phenotype, cells grown at 100% confluence (D2) exhibited a more differentiated state. And, fully differentiated cells were obtained 4 days after reaching 100% confluence (D6). SMC differentiation under hypoxia was achieved by plating the cells at D0 or D6 in a hypoxic atmosphere of 1% O₂ (*New Brunswick™ Galaxy*[®] 170 R Incubator, Eppendorf, Hamburg, Germany) and harvested after four days of growth.

For *in vitro* studies with cigarette smoke extract (CSE), 50 ml of basal medium was bubbled with smoke of four unfiltered cigarettes (3RF, University of Kentucky, Lexington, KY), each containing 0.7 mg of nicotine and 9 mg of tar according to the manufacturer's report, through a syringe-driven apparatus (Protowrx, Vanocover, Canada). The CSE obtained was filtered through a 0.22 μm filter (Millipore, Bredfore, MA) and immediately frozen at -80°C until use. The pH of CSE was between 7.4 and 7.5 when diluted for each experiment. SMC at D6 were starved by washing three times with serum-free medium and incubated for 8 h to minimize the effects of FBS. Then, cells were incubated with diluted CSE (1/10) in starved medium for 24 h. Control cultures were treated with vehicle.

The SMC differentiation phenotype was determined by the relative expression of a smooth muscle contractile protein profile, which included myoCD, GATA-6, transgelin (sm22α), calponin and caldesmon, analyzed by real-time PCR (RT-PCR) and the decrease of the stem cell factor KLF4. The presence of filaments of smooth muscle α-actin (α-SMA), calponin and the smooth muscle specific myosin heavy chain (SM-MHC) were also assessed by immunofluorescence. The proliferative phenotype was evaluated indirectly by the expression of Ki67 by both RT-PCR and immunofluorescence and directly by cell cycle analysis. To determine cell cycle progression in SMC during differentiation, flow cytometry analysis was performed (Fortessa, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Briefly, cells maintained in growth medium were permeabilized with ethanol 100% and incubated at -20°C during 30 min. Then, cells were incubated with 10 mg/ml of RNAsa A, and 1 mg/ml of propidium iodide for 30 min in dark at 37°.

We also assessed SMC differentiation in cells maintained at 70–80% confluence (D0) that were stimulated with transforming growth factor beta 1 (TGFβ1) (10 ng/mL; Acris, Herford, Germany) [22] for 24 h and 48 h in starved medium (SmBm supplemented with 1% inactive FBS). In this model, SMC differentiate before achieving 100% confluence. Dedifferentiation of SMC was induced in 100% confluent (D0) and in fully differentiated cells (D6) by incubation with the inflammatory cytokine TNFα (10 ng/ml; Bender Medsystems, Vienna, Austria) for 48 h in starved medium.

Senescence experiments

Cellular senescence was evaluated with the Senescence Histochemical Staining Kit (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) following the manufacturer's guidelines. Dedifferentiated (passage 2) and fully differentiated SMC (passage 8) were compared to senescent SMC (passage 12).

Briefly, cells were fixed using formaldehyde solution and incubated with X-gal. Pictures were taken after an ON incubation at pH 6. Blue senescent cells were counted and expressed as a percentage of the total number of nuclei DAPI-positive cells.

RNA Isolation and Real Time PCR

Total RNA was isolated using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Random-primed cDNA synthesis was performed at 37°C with 1 µg of RNA using the high capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Gene expression was measured by RT-PCR in a Chromo 4 Real Time PCR detector (Bio-Rad, Hercules, CA) and ABI fast 7900 HT (Applied Biosystems) using the sensiMix dt kit (Quantace, San Mateo, CA,) based on the DNA double-strand-specific SYBR green I dye and Taqman probes (Applied Biosystems) for detection. The results were normalized to GAPDH and β-actin expression levels and relative gene expression was analyzed by the 2-ddct method. The primers used and their sequences are listed in [S1 Table](#).

Western Blotting

SMC were washed with PBS and then lysated with RIPA buffer (50 mM TRIS-Cl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% NP-40, 0.10% deoxycholic acid) containing protease inhibitors (Sigma-Aldrich). The lysate was centrifuged at 14,000g for 15 min at 4°C to pellet debris and the protein-rich supernatant was stored at -20°C. Total protein concentration was measured with Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Mixed samples of three experiments per line containing 60 µg of protein were run in a SDS-PAGE on 5–12% Bis-Tris gel (Biorad) before transferring to a PVDF membrane. Blocking was done with 5% BSA (Sigma) and samples were incubated ON with primary antibodies. Primary antibodies against Slug (Cell Signalling, dilution 1/1000), and β-actin (Cell Signalling, dilution 1/1000) were revealed with HRP-labeled secondary antibody (Upstate, Charlottesville, VA). Blots were exposed with enhanced chemiluminescence (ECL) (Pierce, Thermo Scientific) and visualized in a LAS 4000 luminescence imager (Bio-Rad). Membrane densitometry was analyzed with ImageJ software (Public domain). Blots were stripped using stripping buffer (50 mM Tris, 20% SDS and 0.7% β-mercaptoethanol) and reprobed.

Immunodetection

SMC differentiation was assessed by immunofluorescence using antibodies against α-SMA (1/750) and calponin (1/75) (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA) and SM-MHC (1/250) (Abcam, Cambridge, UK). An antibody against antigen Ki-67 (1/50) (Novocastra[®], Newcastle, UK) was used to measure cell proliferation. Briefly, cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min. After permeabilization with PBS-0.1% Triton, cells were washed and incubated with the appropriate antibody ON at 4°C. All primary antibodies were revealed with a secondary antibody conjugated with fluorescein during 90 min (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) at room temperature. Nuclei were stained with DAPI. Immunofluorescence images were quantified by counting the number of immunoreactive cells with respect to the number of nuclei.

Wound-healing assay

Forty thousand transfected cells were seeded in 48-well plates with growth medium. After 48 h of incubation the culture was scratched with a sterile tip and the medium was replaced for

fresh growth medium. Pictures were taken at baseline and every 12 h. The healing area was analyzed with Image-Pro Plus software (Media Cybernetics, Inc.)

Knockdown and overexpression experiments

To study Slug overexpression, 1×10^6 cells were transfected with XL6 plasmid and XL6-Slug using the Amaxa Biosystem (Lonza) following manufacturer's guidelines. One day after electroporation, cells were cultured with starved medium ON and stimulated with 10 ng/ml of TGF β 1 (Acris) for 24 h.

Slug knockdown was accomplished with 10nM of siPool against Slug (SiTool Biotech GmBH, Martinsried), which allows the use of low concentrations of siRNA minimizing off-targets effects [23]. A scrambled sequence was used as control. Both siPools were transfected using Lipofectamine RNAimax (Invitrogen).

Transcriptome-wide gene expression analysis

SMC were transfected with 10 nM siSlug and mock-transfected in two biological replicates. RNA was isolated 48 h after transfection and further processed for transcriptome-wide expression profiles using the Human Gene 2.1 ST array platform (Affymetrix, Santa Clara, CA). Raw probe set intensities were processed and summarized using the robust multi-chip analysis (RMA) algorithm [24] with a custom chip definition file (CDF) from Brain array [25]. Expression was assessed for each gene based on linear modeling of the log₂-normalized gene intensities using the R package Linear Models for Microarray Data [26]. Per-gene log₂-fold changes and Benjamini–Hochberg false discovery rate (FDR)-adjusted p-values were estimated for Slug knockdown versus control. Slug knockdown samples in our array-based gene expression analysis, determined 355 (1200) genes that were differentially expressed with adjusted p-values of less than 0.01 (0.05).

In vivo experiments

All procedures involving animals and their care were approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona and the Institutional Committee of the University of Valladolid for Animal Care and Use. Furthermore, they were conducted according to institutional guidelines in compliance with national (Generalitat de Catalunya decree 214/1997, DOGC 2450) and international (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Institutes of Health, 85–23, 1985) laws and policies.

Our mouse model of pulmonary hypertension included 16 female mice (C57/bl6 mice around 22–25 g) that were divided in three groups. One group was maintained in normoxia and inoculated with vehicle (control, CTL; n = 6); the second group was exposed to chronic hypoxia using an initial ramp cycle to reach 10% O₂, 5% CO₂ for 3 weeks (chronic hypoxia, CH; n = 5); and the third group was exposed to CH and injected weekly with the VEGFR inhibitor, Sugen 5416 (Tocris, R&D Systems, Minneapolis, MN) at 20 mg/Kg (sub/cut) using a 25 gauge needle (CH+SU5416; n = 5) for three weeks. At the end of exposure, right ventricular pressure (RVP) was determined under anesthesia by inserting a pressure transducer (Milla, Houston, TX) into the right ventricle via the jugular vein. Animals were then sacrificed and their lungs processed for histology. The number of intrapulmonary vessels with a diameter <50 μ m showing positive immunostaining for α -SMA were counted and expressed as a percentage of the total number of small vessels. The ventricle hypertrophy (Fulton index) was evaluated as the ratio between the right ventricle (RV) and left ventricle plus the septum weight.

Pulmonary artery isolation

Segments of pulmonary artery were obtained from 19 surgical lung specimens that were resected for the treatment of localized lung carcinoma. The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. Arterial wall morphometry was analyzed in cross-sectional rings of pulmonary arteries after elastic orcein staining, as previously described [27]. Pulmonary arteries measuring approximately 2 cm long with an external diameter of 1–2 mm were dissected under microscope and cleaned of surrounding parenchyma and connective tissue. Segments were preserved in RNAlater[®] solution (Ambion, Grand Island, NY) and frozen at -20°C until RNA extraction using TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Grand island, NY). RNA quality was checked with the LabChip[®] Test kit using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Morphometry

The area of the intimal layer, expressed as a percentage of the cross sectional area of the pulmonary artery, was used to classify arteries into 3 groups by establishing the 33 and 66 percentiles as cut-off values. The different groups were identified as less remodeled (R1), mildly remodeled (R2) and highly remodeled (R3) pulmonary arteries.

Immunohistochemistry

Slug expression was measured by immunohistochemistry in serial sections of highly remodeled (n = 3) and non-remodeled pulmonary arteries (n = 5). After hydration of the samples, bovine serum Albumin was used to block non-specific antibody interactions. The antibodies against Slug (1/75) (Cell Signaling, Boston, MA,) were added to the samples for 1 h at room temperature. After two rounds of washing, the secondary antibody was added for 45 min and contrasted with hematoxylin stain at room temperature. Areas positive for Slug in the arterial section were quantified with Image Pro and normalized to the total vessel wall area.

Statistical analysis

All values are reported as mean \pm SE. Determinations were performed in duplicate and at least 3 independent experiments were performed for each set of conditions. Two-group comparisons were analyzed using the two-tailed paired Student t-test for dependent samples or with the Mann–Whitney Rank Sum test for non-normally distributed data. Group comparisons were performed using one-way ANOVA or two-way ANOVA. Post hoc pairwise comparisons were made using the Student Newman–Keuls test for normally distributed variables or the Kruskal–Wallis and Dunn test for non-normally distributed variables. For all procedures, P-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

Results

SMC phenotypic change *in vitro* models

We analyzed the expression of contractile SMC markers in both cell-to-cell contact and TGF β 1 induced SMC differentiation and during TNF α -induced SMC dedifferentiation. Differentiated SMC phenotype induced by cell-to-cell contact was associated with higher expression of SMC contractile markers (*myoCD*, *gata-6*, *sm22 α* , *calponin* and *caldesmon*) and decreased gene expression of the stem cell transcription factor *KLF4* (Fig 1A). Fully differentiated phenotype at D6 of culture was also confirmed by the strong expression of α -SMA, calponin and SM-MHC fibers, determined by immunofluorescence (Fig 1A). Similar results were obtained when differentiation was induced by 48 h of TGF β 1 treatment (S1 Fig). *Ki-67* expression

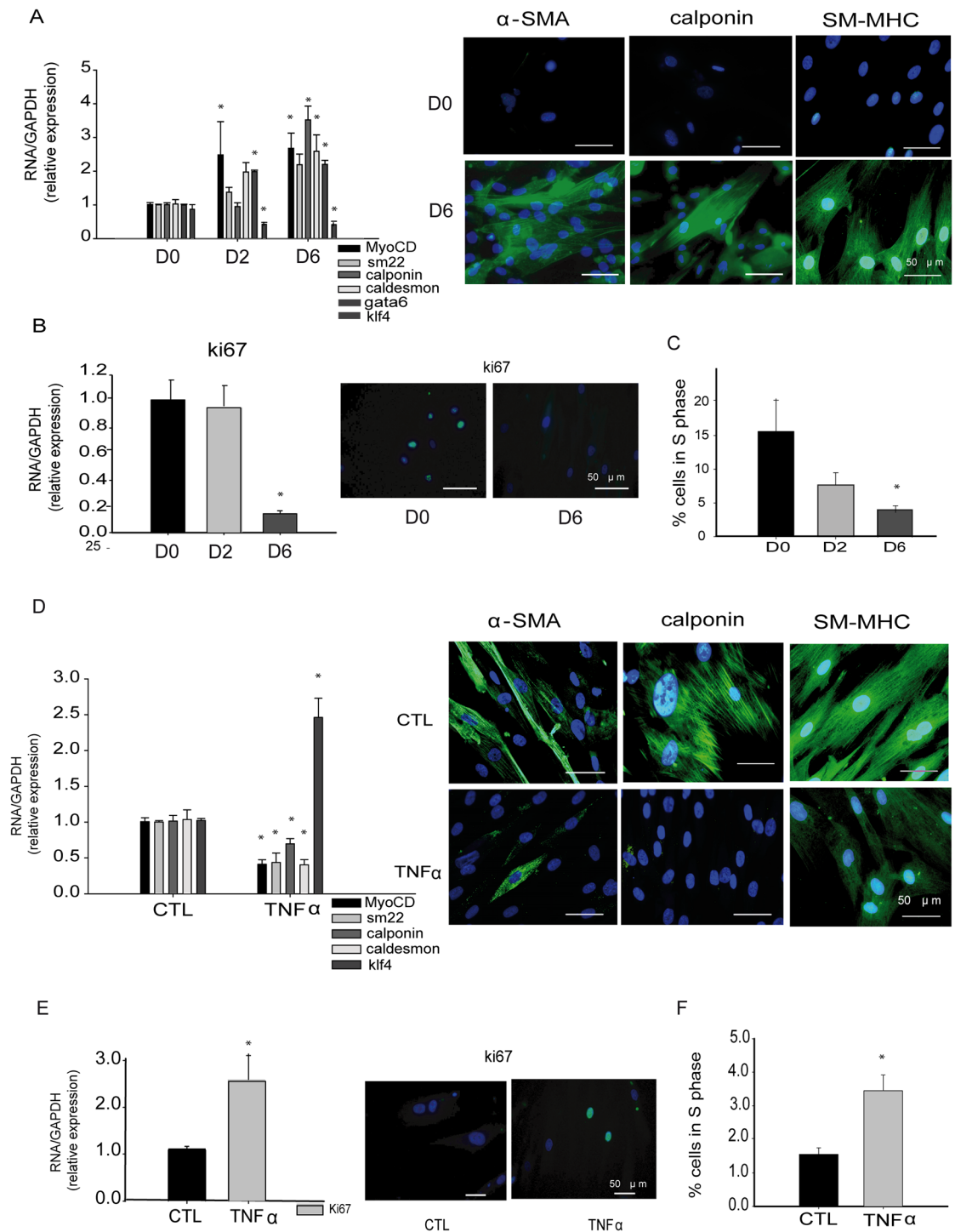


Fig 1. *In vitro* models of SMC phenotypic change. **A**, RT-PCR and immunofluorescence of the SMC differentiation markers (myoCD, sm22 α , calponin, caldesmon, GATA6, α -SMA and SM-MHC, and the transcription factor KLF4 at D0, D2 and D6 states show the acquisition of a mature phenotype in SMC during differentiation. **B**, Cell proliferation decreases in differentiated cells, as determined by Ki-67 expression and **C**, cell cycle analysis. **D**, RT-PCR of SMC markers and KLF4 and immunofluorescence of α -SMA, calponin and SM-MHC in TNF α treated SMC showing the induction of SMC dedifferentiation by this cytokine. **E**, Gene expression of Ki-67 and **F**, cell cycle analysis increase significantly in TNF α treated SMC when compared with controls, indicating greater proliferation. Data are expressed as the mean \pm SEM of five independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g001

(Fig 1B) and the number of cells in S Phase of the cell cycle, measured by flow cytometry (Fig 1C) decreased concomitantly with SMC differentiation indicating that SMC differentiation was concomitant with the decrease of cell proliferation. No changes in cell senescence were observed in highly confluent cells compared with proliferative cells (S2 Fig), indicating that cell senescence is not induced by cell confluence. Dedifferentiation of fully differentiated SMC was achieved by 48 h of treatment with the inflammatory cytokine TNF α , as shown by the decrease of contractile genes and an increase of *KLF4* expression (Fig 1D). α -SMA, calponin and SM-MHC fibers also decreased after 48 h of TNF α treatment (Fig 1D). Concordantly, increased proliferation was observed in TNF α -treated cells, as measured by both higher Ki-67 expression (Fig 1E) and increased cells in the S phase (Fig 1F).

Slug expression correlated with a dedifferentiated phenotype

We measured the expression of Slug and its related transcription factor Snail in these models. Expression of Slug and Snail were high in proliferative/dedifferentiated SMC (D0) and their expression decreased significantly to half in fully differentiated SMC (D6) in both cell-to-cell contact (Fig 2A) and TGF β 1-induced SMC differentiation (S1 Fig). Interestingly, induction of dedifferentiation by TNF α resulted in the increase of Slug expression but not of Snail expression (Fig 2B).

Slug regulates proliferation and migration of SMC

In order to investigate whether Slug expression is associated with changes in the proliferative/migrative phenotype of SMC, gain and loss of function of Slug were performed. Knockdown of Slug was achieved by using a SiPool against Slug, which resulted in the 90% of Slug knockdown (S3 Fig). Slug knockdown in highly proliferative cells resulted in a significant decrease in both Ki-67 expression (Fig 3A) and cells in S phase (Fig 3B). By contrast, Slug overexpression increased the number of proliferating cells (Fig 3C). These results indicate that Slug expression sustain SMC proliferation. Migration, measured as the capacity of cells to resolve an *in vitro* wound was also measured (Scratch assay). Slug knockdown resulted in the reduction of migrating cells (Fig 3D), whereas Slug overexpression was associated with an increase in the migration rate of SMC (Fig 3E), indicating that Slug stimulates a migratory phenotype in SMC.

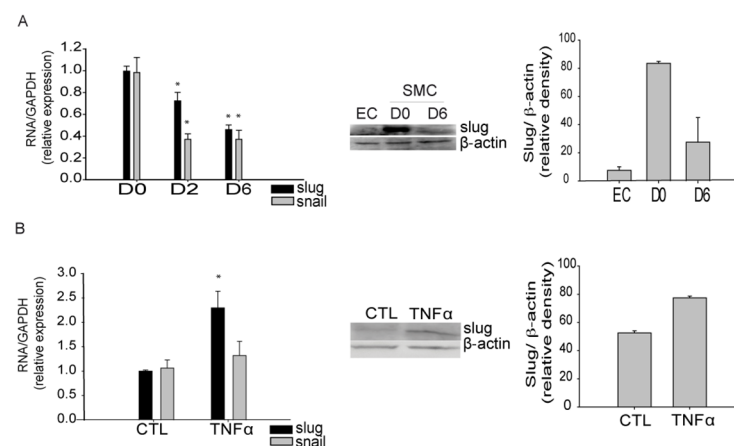


Fig 2. Slug is upregulated in dedifferentated SMC. **A**, Slug, and the related transcription factor Snail, decrease in mature SMC as determined by RT-PCR and western blot analysis. **B**, RT-PCR and western blot analyses show increased Slug expression in contractile SMC after 48 h of TNF α treatment. Data are expressed as the mean \pm SEM of five independent experiments performed in duplicate. * p < 0.05 by one-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g002

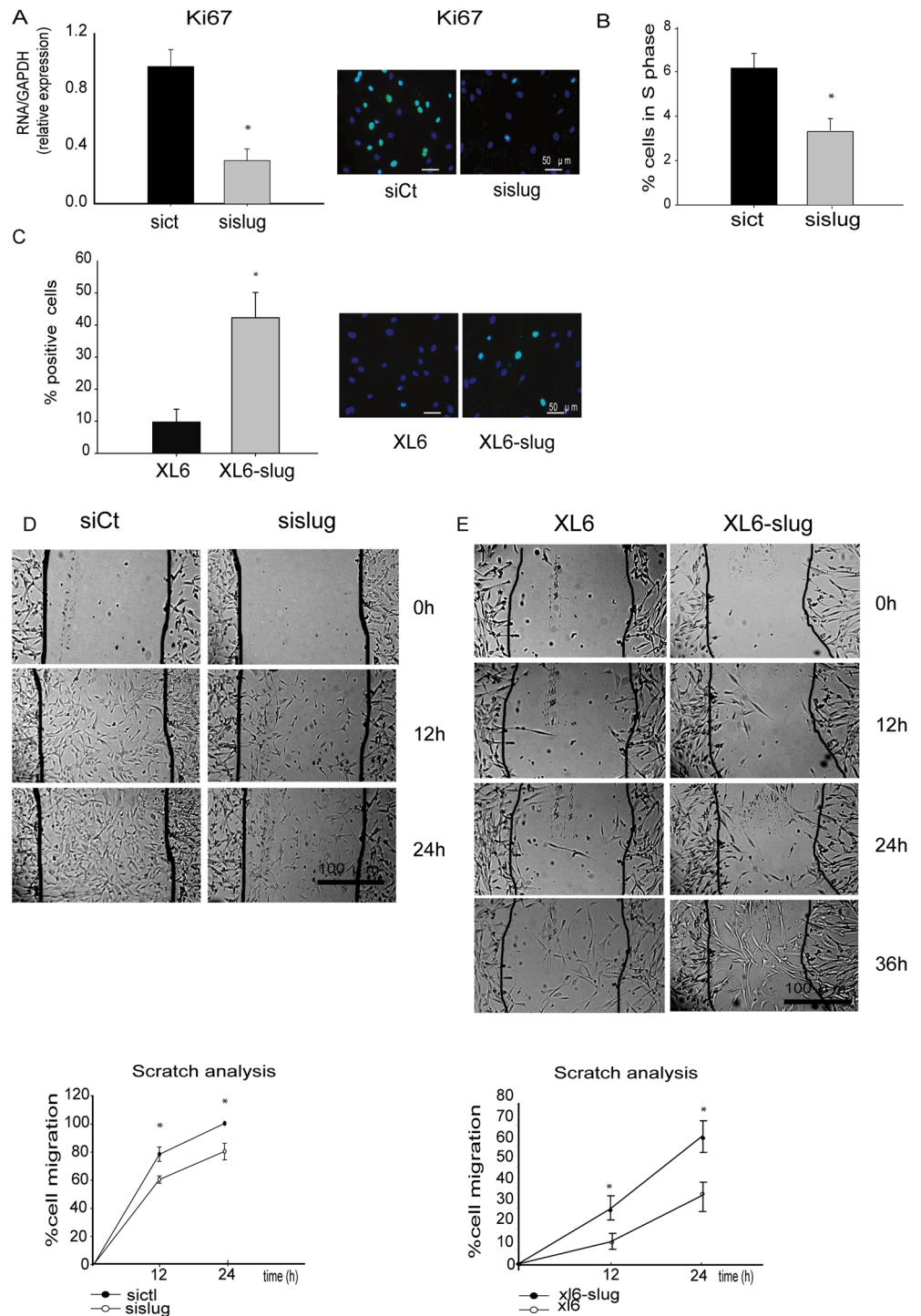


Fig 3. Slug regulates SMC proliferation and migration rate. **A**, RT-PCR and immunofluorescence analysis showed that Slug inhibition promoted downregulation of Ki-67 expression, consistent with decreased S phase of cell cycle analyzed by flow cytometry (**B**). **C**, Slug overexpression increases SMC proliferation analyzed by Ki67 expression. **F** and **G**, Cell migration was measured by wound-healing assay and expressed as the percentage (%) of SMC migrating/time. Slug knockdown cells display lower migration rates than control cells (**F**), while Slug-overexpressing SMC exhibit higher migration rate than control cells (**G**). Data are expressed as the mean \pm SEM of four independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ by paired *t*-test.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g003

Slug regulates both TNF- α and TGF β 1-induced SMC phenotypic change

We reasoned that if Slug induces proliferation and migration in SMC, it could also regulate changes in SMC phenotypic switch. Slug knockdown prevented the TNF α -induced dedifferentiation of SMC denoted by the restored expression of *myoCD*, *gata-6*, *calponin* and KLF4 following TNF α treatment (Fig 4A). Transient overexpression of Slug disturbed the TGF β 1-induced SMC differentiation, which resulted in a lower expression of both *myoCD* and *calponin* after 48 h of treatment and a decreased α -SMA and *calponin* fibers (Fig 4B and 4C).

Slug regulates genes related to cell migration and proliferation in SMC

Differential gene expression analyses using Affymetrix Human Gene 2.1 ST arrays were performed 48 h after Slug knockdown in SMC (Fig 5A and S1 Appendix). GO terms analysis of Biological Processes that are modified after Slug knockdown revealed that cell proliferation was one of the most altered pathways. In addition, GSEA analysis showed an enrichment of downregulated genes related to proliferation (Fig 5B and S3 Table). We validated the up-regulation of the tumor suppressor retinoic acid receptor responder protein 3 (RARRES3, also known as TIG3) after Slug knockdown (Fig 5C). Furthermore, the decrease of two pro-proliferative related genes, Cyclin A2 (CCNA2) and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor (HBEGF), after Slug inhibition are shown in Fig 5C. Increased levels of two known Slug targets, claudin1 (CLDN1) and keratin19 (KRT19) were also validated (Fig 5C). RARRES3, CLDN1 and KRT19 increased along differentiation, whereas CCNA2 and HBEGF decreased (S4 Fig). These results correlate well with our findings in siSlug-transfected cells.

Slug is increased in mice with severe pulmonary hypertension

Treatment of mice with chronic hypoxia (CH) in combination with the VEGFR inhibitor, SU5416 (CH+SU5416), reproduces the severe PAH observed in humans. As described previously [28], muscularization of vessels was increased in both CH and CH+SU5416, with respect to control mice (Fig 6A). RV hypertrophy was confirmed by the increase in the Fulton Index in both CH and CH+SU5416 (Fig 6B). Right ventricular pressure (RVP) was increased in animals exposed to CH or CH+SU5416 (Fig 6C). RT-PCR analysis in lung homogenates showed a moderate increase of Slug expression in CH and CH+SU5416 animals (Fig 6D). There were no statistically significant changes in the gene expression of Snail in CH animals compared with control mice (Fig 6D). A positive correlation was found between Slug expression and both the number of vessels positive for α -SMA and the Fulton Index (Fig 6E and 6F). Accordingly, *in vitro* treatment of SMC for 24 h with CH or cigarette smoke extract (CSE), two well-known inducers of vascular remodeling, stimulated both the increase of Slug and SMC phenotypic switch (S5 Fig).

Expression of Slug is enhanced in highly remodeled human pulmonary arteries

Next, we also tested whether or not Slug expression was altered in human during vascular remodeling. Seven patients with COPD and eleven subjects with normal lung function (four non-smokers and seven smokers) were enrolled in our study (S4 Table). Patients with COPD had significantly lower forced expiratory volume in the first second (FEV₁), that is the most frequent index for assessing airway obstruction; lower FEV₁/Forced vital capacity (FVC) ratio, which indicate increased airway resistance to expiratory flow; lower diffusing capacity for carbon monoxide (DLCO), which measures the ability of the lungs to transfer gas inhaled air to

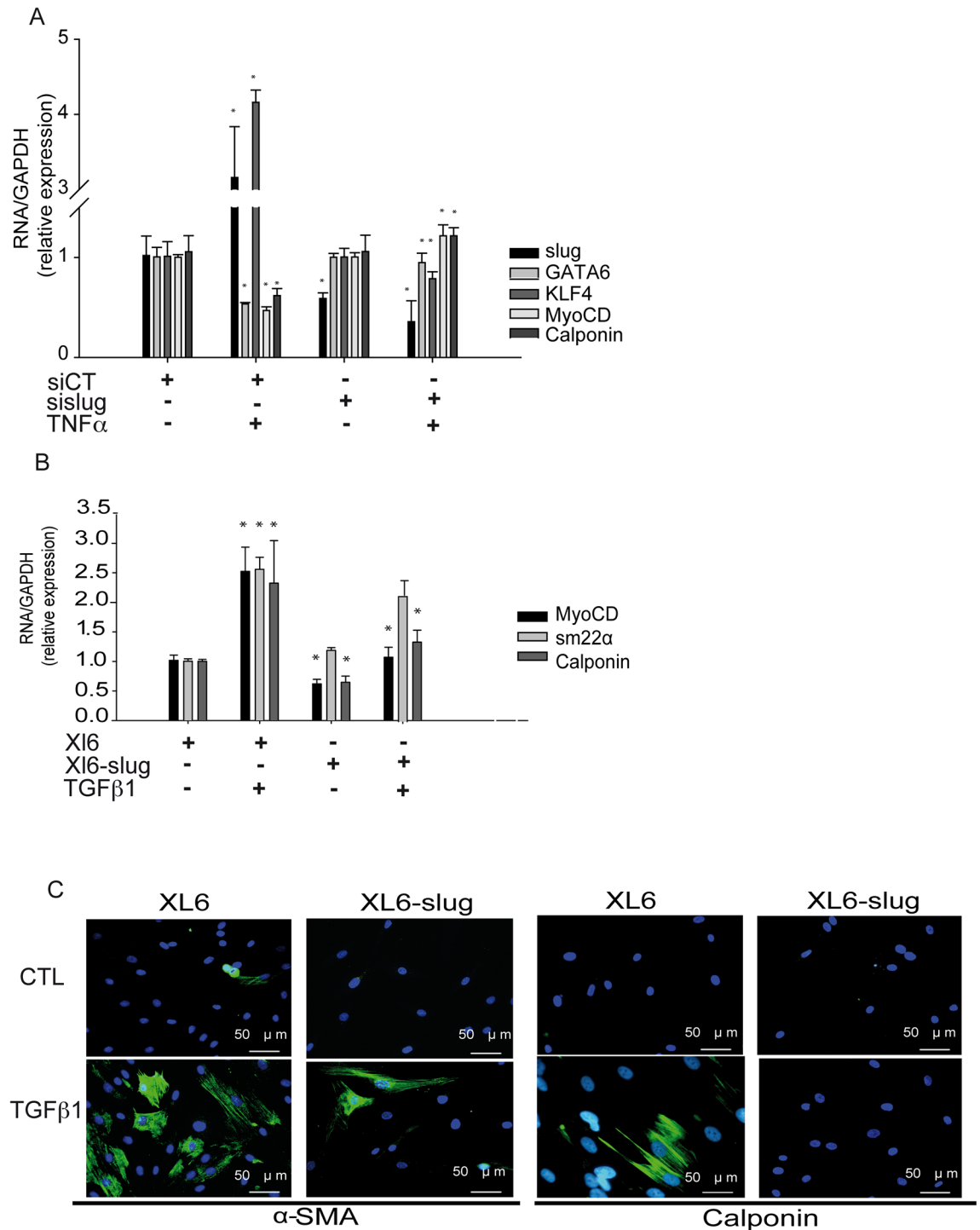


Fig 4. Slug regulates both TNF α -induced dedifferentiation and TGF β 1-induced differentiation. **A**, The increase of KLF4 and the decrease of SMC marker genes induced by TNF α treatment is prevented by Slug knockdown measured by RT-PCR **B-C**, TGF β 1-induced increase of SMC markers is dampened in Slug overexpressing cells as observed by RT-PCR (B) and immunofluorescence (C). Data are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ by paired t -test.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g004

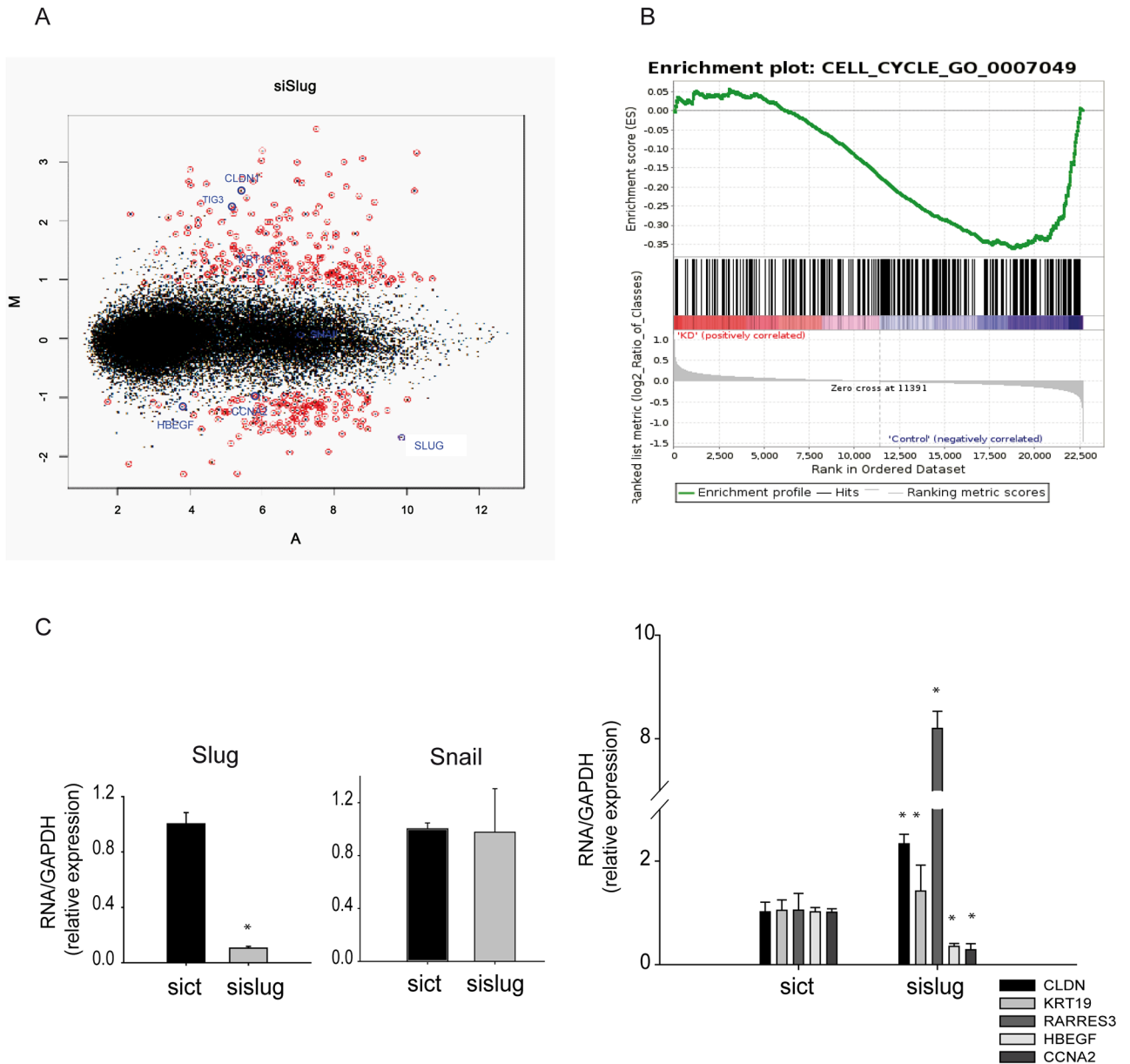


Fig 5. Slug regulates genes related to proliferation and migration pathways. **A**, Scatter plot of the per-gene log₂-fold changes following Slug knockdown (x-axis). Differentially expressed genes in Slug knockdown cells respect to control are marked in red. Validated genes are marked in blue. The vertical dashed lines mark the two fold changes. **B**, Enrichment plot of the GSEA cell cycle. GSEA gave a normalized enrichment score of -1.621 and an FDR of 0.0, indicating a significant enrichment of downregulated cell cycle-associated genes. **C**, Validation of Slug, Snail and other genes array performed by RT-PCR show the downregulation of HBEGF, CCNA2, and the upregulation of CLDN1, RARRES3 and KRT19. Data are expressed as the mean ± SEM of five independent experiments performed in duplicate. *p < 0.05 by one-way ANOVA.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g005

the red blood cells in pulmonary capillaries, and mild hypoxemia, than healthy controls. Groups formed according to their degree of remodeling were matched for subjects with COPD and subjects with normal lung function; and, there were no differences in respiratory variables between groups. RT-PCR analysis showed that expression of Slug, but not of Snail, was significantly upregulated in highly remodeled pulmonary arteries (R3) compared to less remodeled arteries (R1) (Fig 7A). Additionally, a positive correlation between Slug gene expression and

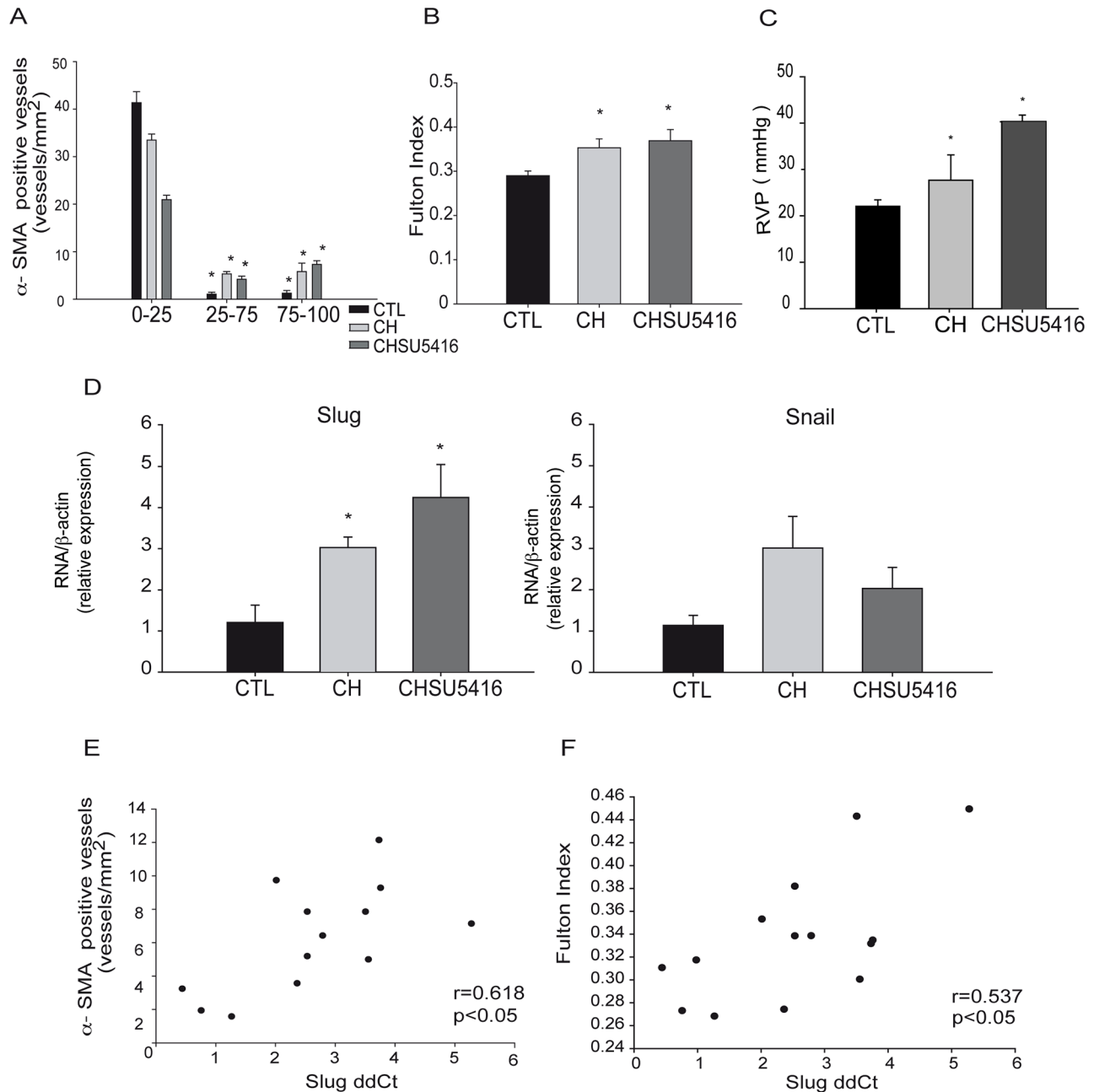


Fig 6. Analysis of Slug expression in the lungs of a mouse model of severe PAH. **A**, Partially (within 25–75% visible muscularization) and totally muscularized (within 75–100% visible muscularization) intrapulmonary vessels with a diameter <50 μ m analyzed in CTL: control group (n = 6), CH: animals exposed to chronic hypoxia (n = 5), CH+SU5416: animals exposed to chronic hypoxia plus Sugen 5416 (n = 5) show positive immunostaining for α -SMA in CH and CH+SU5416 animals. * p <0.05 by one way ANOVA. **B–C**, Fulton index (B) and Right ventricular pressure (RVP) (C) are increased in CH and CHSU5416. **D**, RT-PCR in lung homogenates showed increased Slug, but not Snail expression, in the group exposed to CH and CHSU5416 analyzed by one-way ANOVA. **E**, Correlation between Slug expression (1/dCt) with both the number of α -SMA positive vessels and **F**, the Fulton index (note that the lower the 1/dCt, the higher the Slug expression level). * p < 0.05 by Spearman analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g006

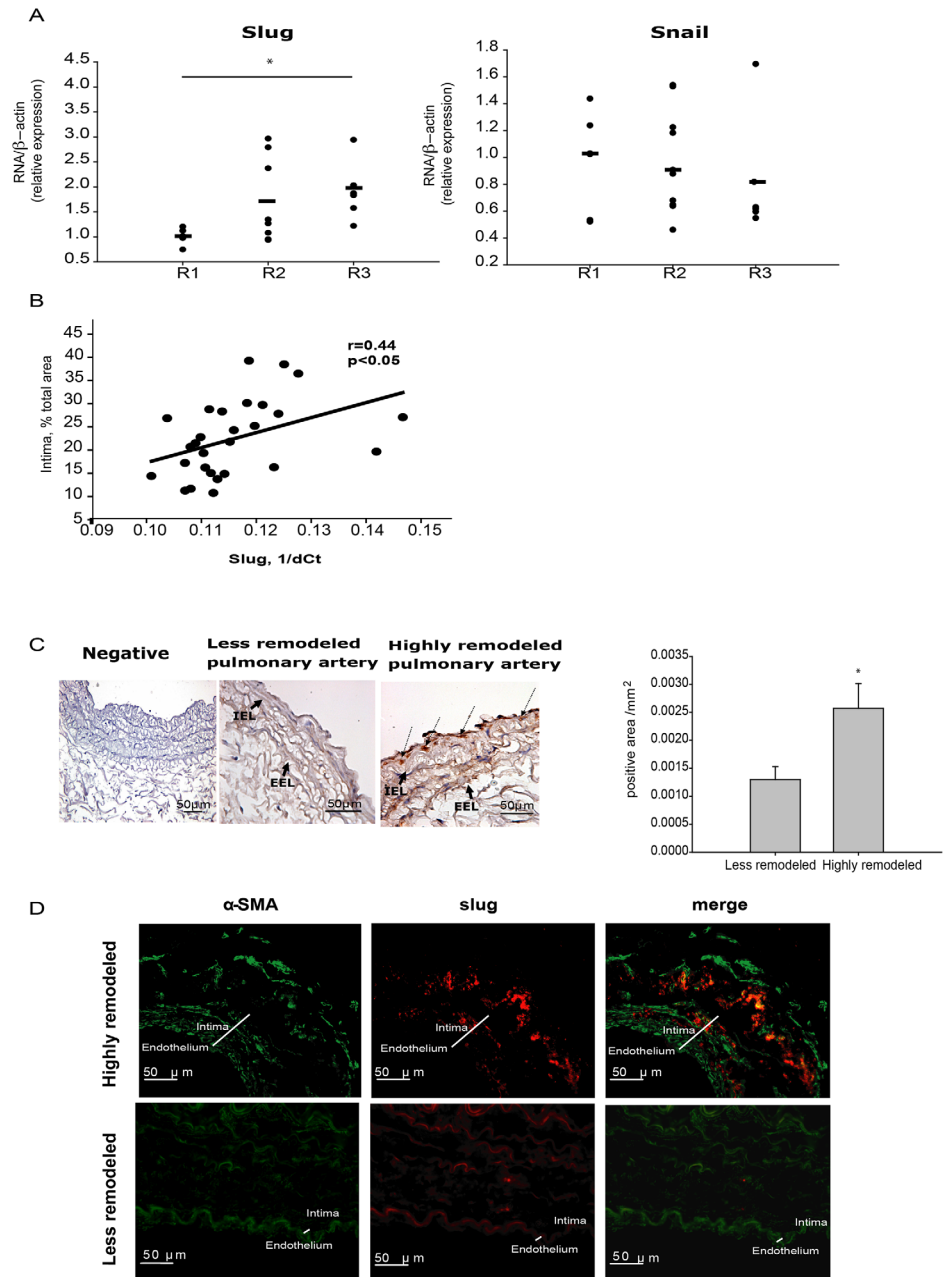


Fig 7. Analysis of Slug expression in human pulmonary arteries. **A**, Samples were classified according to the degree of vascular remodeling: low (R1), mild (R2) and high (R3). Slug but not Snail expression was significantly increased in R3 arteries compared with R1. * $p<0.05$ by one way ANOVA. **B**, Slug expression (1/dCt) displays a positive correlation with the intimal enlargement of pulmonary arteries measured by % of intimal thickness of the pulmonary artery ($r = 0.44$, $p<0.05$ by Pearson test). Note that the lower the 1/dCt, the higher the expression level. **C**, Representative images of Slug immunostaining; Slug expression is significantly increased in dedifferentiated intimal pulmonary SMC and EC of highly remodeled pulmonary arteries (right image) compared with less remodeled (left image). Negative control is shown in the first picture. Slug positive areas were quantified in highly remodeled ($n = 3$) and less remodeled ($n = 4$) arteries and normalized by the total wall area. Highly remodeled pulmonary arteries display a significant increase in Slug positive cells compared with less remodeled arteries. * $p<0.05$ by t -test. **D**, Slug (red), α -SMA (green) and merged (yellow) immunofluorescence images. Slug expression is predominantly found in the intima layer of remodeled pulmonary arteries.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g007

the thickness of the intima layer was found (Fig 7B). Slug localization in cross-sectional artery rings was assessed by immunohistochemistry and co-immunofluorescence with α -SMA antibody. Slug was barely detected in the intimal layer of less remodeled arteries (Fig 7C). In contrast, highly remodeled arteries showed strong intensity in the intima and media layer (Fig 7D).

Discussion

Although many reports have described key factors involved in the regulation of the SMC phenotypic switch [3], the detailed molecular mechanisms driving this process are not yet fully understood. Furthermore, many of the described players *in vitro* have not been found to be associated with vascular disease. In this study, we show that the EMT-related transcription factor Slug is highly expressed in proliferative SMC, and its expression decreases significantly as maturity increases. Diminished Slug expression, both during differentiation and after knocking down its expression, correlated with a reduced proliferation, therefore, suggesting that Slug regulates the expression of genes related to these pathways. Our genome-wide transcriptome study revealed that Slug modulates the expression of many genes that regulate proliferation, which is consistent with cell cycle assays. Specifically, downregulation of Slug in SMC was related with a decreased expression of both HBEGF and CCNA2, whereas the genes CLDNI, KRT19 and RARRES3 increased their expression. HBEGF is a stimulator of SMC proliferation and it is known to play an important role in neointimal formation of a rat model [29]. The CCNA2 gene encodes for cyclin-A2, a protein involved in cell cycle progression. Nevertheless Slug is a transcriptional repressor. And, the expression of both the CCNA2 and HBEGF genes decreased during its knockdown, suggesting that they are indirect targets of Slug. Downregulation of Slug in SMC was related with a greater expression of two known Slug target genes, CLDNI and KRT19. These genes are involved in adhesion/migration pathways [30,31], which may explain the increased rate of migration observed following Slug overexpression. Interestingly, both genes are described as specific epithelial genes [30,31]. However, we observed expression of these genes in differentiated SMC cells and in Slug-knocked down SMC, indicating that they also play a role in this cell type. Expression of KRT19 has been also previously described in vascular smooth muscle and skeletal muscle [32,33] RARRES3 is a tumor suppressor [34] gene that maintains cell adhesion and decrease metastasis [35]. Concordantly, its expression was increased after Slug knockdown. Overall, these results indicate the important physiological role of Slug in cell proliferation and migration in SMC.

Our study revealed that Slug induces a proliferative/dedifferentiated phenotype in SMC. This was demonstrated in the Slug overexpression experiments. In these assays, Slug promoted an increased rate of proliferation and migration and blocked the TGF β 1-induced SMC differentiation. These results agreed with a number of previous works demonstrating the key role of Slug in regulating cell dedifferentiation, proliferation and migration. Slug upregulation was found to confer a stem cell-like phenotype in a breast cancer model and in epithelial corneal cells [36,37]. Recently, it was also shown that Slug blocked differentiation of both striated muscle cells and epidermal cells [17,18]. Slug is a zinc finger transcription factor that suppresses gene expression through binding to E-boxes in the promoter of its target genes [16, 38]. In striated muscle cells, Slug represses differentiation by competing with the bHLH transcription factor MyoD, which is the main transcription factor driving differentiation of these cells, for binding to the E-boxes of specific muscle genes [18]. Many smooth muscle-specific genes, including α -SMA, sm22 α and SM-MHC, contain E-boxes in their promoters and are activated by class I bHLH transcription factors [39]. Also, twist1, a known inductor of EMT, has also been shown to bind to E-boxes in the promoter region of both sm22 α [40] and α -SMA, and

repress them *in vitro* and *in vivo* [40]. In our work, we observed a lack of activation of sm22 α and α -SMA, following Slug knockdown in proliferative cells (S1 Appendix), demonstrating that Slug is not directly repressing them at this stage of differentiation. However, it cannot be discarded that Slug displaces bHLH transcriptional activators once these genes are activated in differentiated cells.

TNF α treatment to induce a phenotypic switch from fully differentiated SMC was used in this study. Elevated levels of TNF α , or systemic inflammation, have been associated with blood vessel remodeling [41,42]. Specifically, TNF α is thought to be involved in several chronic hypoxia-associated lung diseases like COPD [43,44]. In our model, TNF α induced Slug but not Snail up-regulation, and induced contractile protein downregulation in differentiated cells with a concomitant increase of a migrative/proliferative phenotype. These results correlate well with previous work where TNF α inhibited the contractile phenotype of cerebral vascular SMC, inducing pro-inflammatory/matrix-remodeling genes [45], and stimulated Slug expression in breast cancer cells [46]. We observed that preventing the upregulation of Slug by transfection of the siSlug, following TNF α treatment, blocked the inflammatory-induced SMC phenotypic switch. Interestingly, Slug knockdown was able to prevent the TNF α -induced up-regulation of KLF4, which is a known inductor of SMC dedifferentiation [47]. We also observed increased Slug, but not Snail expression, in lungs of mice during vascular remodeling and in highly remodeled human pulmonary artery samples. This interesting asymmetry observed in the behavior of Slug and Snail has been previously described in several studies. Shirley and colleagues described that the two factors are not induced by identical stimuli [48]. In addition, Slug, but not Snail mRNA was elevated during wound reepithelialization *in vitro* and *ex vivo* and *in vivo* in mice [49]. Moreover, to induce EMT, Slug and Snail showed overlapping, as well as a range of other functions. Slug seems to act early to trigger EMT, whereas Snail acts later to complete the process [50,51]. Remarkably, Snail knockout mice died at gastrulation [52], while Slug knockout mice were viable [53]. Altogether, these studies clearly show that Slug and Snail are not functionally equivalent, although they share certain targets in cell differentiation processes. Interestingly, a significant number of Slug overexpressing mice died of cardiac hypertrophy and cardiac failure exhibiting the key role of this factor in the cardiovascular system homeostasis. In correlation with these observations, using a murine model of severe pulmonary hypertension induced by CH, we found greater expression of Slug in lung homogenates of CH-exposed animals, as well as a correlation of Slug with the severity of vessel remodeling. These findings support a stimulating role of Slug in hypoxia-induced SMC proliferation. In correlation, *in vitro* treatment of SMC with CH or CSE, both of which are reported to regulate cell proliferation during vascular remodeling [54,55], induced the expression of Slug concomitantly with cell differentiation defects. Interestingly, we also found a correlation between the intima thickness of human pulmonary arteries and Slug expression. A recent report from Owens and colleagues, using a cell-tracing system, showed that more than 80% of medial SMC during intima hyperplasia in mice undergo phenotypic switch [47]. Also, EnMT, a process in which both Slug and Snail are involved, was also observed *in vivo* during the PH-related vascular remodeling (Fig 8A) [56]. In this work, we documented that highly remodeled arteries showed a strong intensity of Slug, but not of Snail, in the intima and media layer, indicating that a greater number of SMC-like cells in the intima could arise from the media through phenotypic switch of SMC, likely driven by Slug (Fig 8A).

In summary, Slug is revealed as a key transcription factor driving a proliferative/migratory phenotype of SMC. Our results indicate that in an inflammatory environment, the expression of Slug is induced in SMC, which in turn, stimulates a SMC proliferative/dedifferentiated phenotype, at least through modulating proliferation and migration genes (Fig 8B). To the best of our knowledge, this is the first time that Slug has been studied during the phenotypic switch of

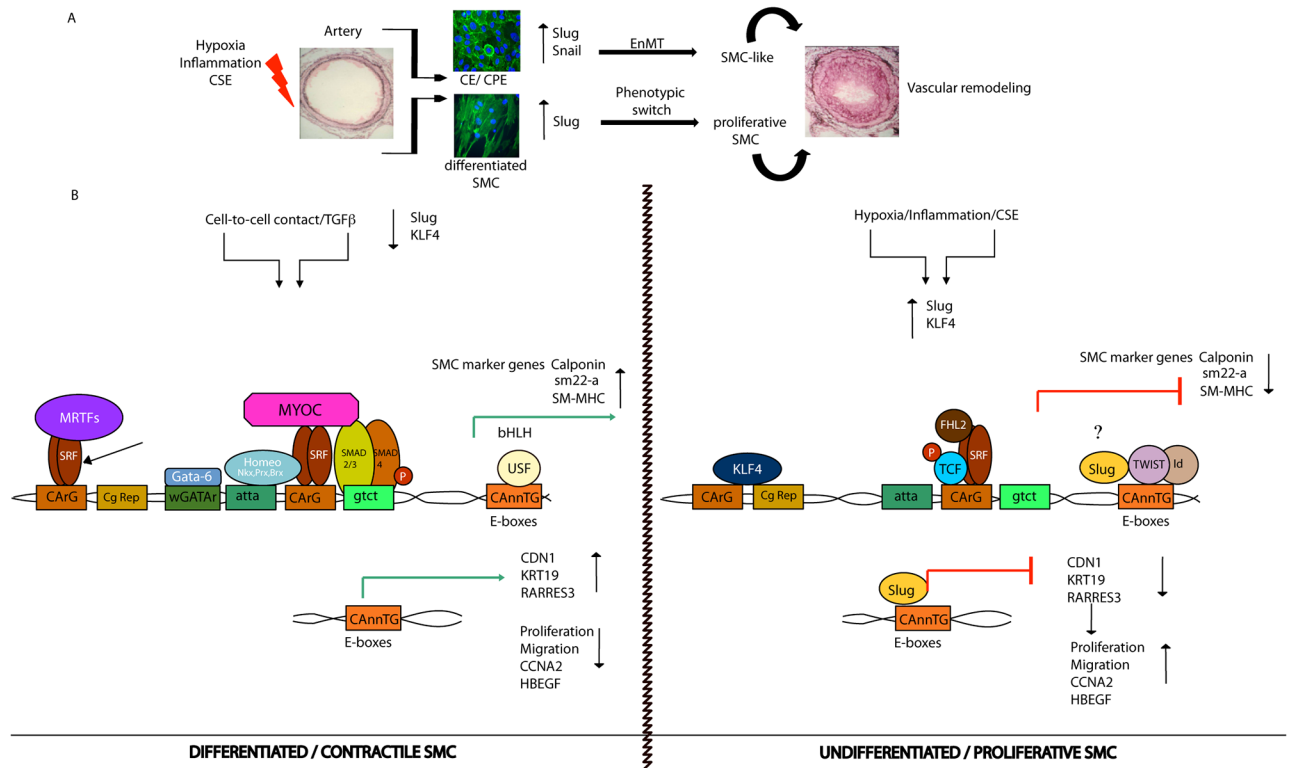


Fig 8. Slug induces a proliferative phenotype of SMC. **A**, Schematic figure showing the contribution of both Slug and Snail to the phenotypic switch of EC and SMC. Under an inflammatory/hypoxic environment the expression of Slug and Snail increase in EC and promotes EnMT, while only Slug increases in SMC to induce a proliferative SMC phenotype. **B**, Schematic figure representing the most prominent molecular players involved in the phenotypic switch of SMC. In contractile cells, MYCD-SRF/MRTF-SRF complexes bind to CArG boxes, while bHLH transcription factors, like USF bind to E-boxes to activate and maintain expression of SMC specific markers. In this stage, Slug is minimally expressed. In consequence, expression of its known targets, like CDN1 and KRT19, as well as the tumor suppressor RARRES3, are high and migration is repressed. Expression of the cell cycle related genes, CCNA2 and HBEGF, are highly expressed and the rate of proliferation is very low. Under specific stimuli, such as inflammation and/or hypoxia, the expression of Slug is triggered. Expression of its target genes CDN1 and KRT19 are blocked and cell migration is activated. Moreover, expression of CCNA2 and HBEGF decrease and cells become proliferative. In this condition, the expression of the stem cell factor KLF4 is upregulated. Expression of MYCD and its binding to CArG boxes is also repressed resulting in decreased expression of SMC specific markers. MYCD, myocardin; SRF, serum response factor; MRTF, myocardin-related transcription factors; KLF4, krüppel like factor 4; CDN1, claudin1; KRT19, keratin 19; RARRES3, retinoic acid receptor related gene 3; CCNA2, cyclinA2; HBEGF, Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor.

doi:10.1371/journal.pone.0159460.g008

SMC. The increased expression of Slug observed in remodeled human pulmonary arteries, suggests that this transcription factor has an important role in the pathogenesis of pulmonary vascular impairment that is promoted by an inflammatory and/or hypoxic environment. Accordingly, therapies targeting Slug could be of potential interest in the treatment of pulmonary vascular disorders.

Supporting Information

S1 Appendix. Summary Table of the gene expression in SMC after 48h of Slug knockdown. (XLSX)

S1 Fig. SMC differentiation model induced by TGFβ1 treatment. **A**, RT-PCR and **B**, immunofluorescence of SMC markers show SMC differentiation after 48 h of TGFβ1 treatment. Slug expression, measured by RT-PCR, decreases in differentiated cells. (PDF)

S2 Fig. Analysis of cell senescence in the cell-to-cell contact model. Graph showing the percentage of senescent cells expressed as b-galactosidase positive cells/total cells. No differences are observed between D0 and D6 (passage 2–8). Passage 12 is used as a control for cell senescence. * $p < 0.05$ by one-way ANOVA
(PDF)

S3 Fig. Slug siRNA Knockdown efficiency. Representative Slug immunofluorescence, which demonstrates the decrease of Slug expression around 90% with respect to control cells.
(PDF)

S4 Fig. Gene expression of selected genes from the microarray, during SMC differentiation. KRT19 (A), RARRES3 (D) and CLDNI (E) increase in differentiated SMC, whereas CCNA2 (C) and HBGEF (B) decrease.
(PDF)

S5 Fig. Analysis of Slug in SMC subjected to hypoxia and CSE. A-B Slug expression increases in SMC, correlating with SMC dedifferentiation, as shown by the downregulation of SMC marker genes, in hypoxia-induced cells. C, CSE stimulation promotes the increase of Slug expression and the decrease of SMC differentiation markers. Data are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$ by paired t -test.
(PDF)

S1 Table. Primers.
(PDF)

S2 Table. Summary of the top 15 GO terms analysis of Biological pathways.
(PDF)

S3 Table. Summary of the top 30 genes contributing to the enrichment of downregulated cell cycle genes.
(PDF)

S4 Table. General characteristics of the population. * $p < 0.005$ vs NS. † $p < 0.005$ vs S.
(PDF)

Acknowledgments

This work was developed at the Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona, Spain. We thank Gustavo Pigino, Andrea Ropolo and Julia Cambiasso for critical reading of the manuscript. We are indebted to the Citomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. We thank to Susana Maqueda Marcos, Cristina Bonjoch Anguita for their expert technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MMM JAB VIP GM. Performed the experiments: NCB JGL IB OT MMM. Analyzed the data: NCB MP VIP MVP MP ME JE GM JAB MMM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP ME JE MVP GM. Wrote the paper: NCB VIP JAB MMM.

References

1. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75:487–517. PMID: [7624392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7624392/)

2. Ailawadi G, Moehle CW, Pei H, Walton SP, Yang Z, Kron IL, et al. Smooth muscle phenotypic modulation is an early event in aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138:1392–1399. doi: [10.1016/j.jtcvs.2009.07.075](https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.07.075) PMID: [19931668](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19931668/)
3. Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Found Symp* 2007; 283:174–191. PMID: [18300422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18300422/)
4. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138:S419–S420. PMID: [10539839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10539839/)
5. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:134–145.
6. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 2006; 99:675–691. PMID: [17008597](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17008597/)
7. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circ Res* 2003; 93:783–790. PMID: [14500338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14500338/)
8. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801–809. PMID: [8479518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8479518/)
9. Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, et al. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 2002; 19:632–638. PMID: [11998991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11998991/)
10. Coll-Bonfill N, de la Cruz-Thea B, Pisano MV, Musri MM. *Pflugers Arch*. 2016 Jun; 468(6):1071–87 PMID: [27109570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27109570/)
11. Wang Z, Wang DZ, Pipes GC, Olson EN. Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:7129–7134. PMID: [12756293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12756293/)
12. Fang F, Yang Y, Yuan Z, Gao Y, Zhou J, Chen Q, et al. Myocardin-related transcription factor A mediates OxLDL-induced endothelial injury. *Circ Res* 2011; 108:797–807. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.111.240655](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.240655) PMID: [21330600](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21330600/)
13. Deaton RA, Gan Q, Owens GK. Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 296:H1027–H1037. doi: [10.1152/ajpheart.01230.2008](https://doi.org/10.1152/ajpheart.01230.2008) PMID: [19168719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19168719/)
14. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la MC, Sadler TM, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol* 2011; 179:2660–2673. doi: [10.1016/j.ajpath.2011.07.042](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.042) PMID: [21945322](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21945322/)
15. Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005; 132:3151–3161. PMID: [15983400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15983400/)
16. Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3:155–166. PMID: [11994736](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11994736/)
17. Mistry DS, Chen Y, Wang Y, Zhang K, Sen GL. SNAI2 controls the undifferentiated state of human epidermal progenitor cells. *Stem Cells* 2014; 32:3209–3218. doi: [10.1002/stem.1809](https://doi.org/10.1002/stem.1809) PMID: [25100569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25100569/)
18. Soleimani VD, Yin H, Jahani-Asl A, Ming H, Kockx CE, van Ijcken WF, et al. Snail regulates MyoD binding-site occupancy to direct enhancer switching and differentiation-specific transcription in myogenesis. *Mol Cell* 2012; 47:457–468. doi: [10.1016/j.molcel.2012.05.046](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.046) PMID: [22771117](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22771117/)
19. Torreggiani E, Lisignoli G, Manfredini C, Lambertini E, Penolazzi L, Vecchiattini R, et al. Role of Slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16:740–751. doi: [10.1111/j.1582-4934.2011.01352.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01352.x) PMID: [21645238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21645238/)
20. Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res* 2010; 88:502–511. doi: [10.1093/cvr/cvq236](https://doi.org/10.1093/cvr/cvq236) PMID: [20631156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631156/)
21. Song J, Rolfe BE, Campbell JH, Campbell GR. Changes in three-dimensional architecture of microfilaments in cultured vascular smooth muscle cells during phenotypic modulation. *Tissue Cell* 1998; 30:324–333. PMID: [10091337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10091337/)
22. Wang X, Hu G, Betts C, Harmon EY, Keller RS, Van De WL, et al. Transforming growth factor-beta1-induced transcript 1 protein, a novel marker for smooth muscle contractile phenotype, is regulated by serum response factor/myocardin protein. *J Biol Chem* 2011; 286:41589–41599. doi: [10.1074/jbc.M111.250878](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.250878) PMID: [21984848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984848/)
23. Hannus M, Beitzinger M, Engelmann JC, Weickert MT, Spang R, Hannus S, et al. siPools: highly complex but accurately defined siRNA pools eliminate off-target effects. *Nucleic Acids Res* 2014; 42:8049–8061. doi: [10.1093/nar/gku480](https://doi.org/10.1093/nar/gku480) PMID: [24875475](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24875475/)
24. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:e15. PMID: [12582260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12582260/)

25. Dai M, Wang P, Boyd AD, Kostov G, Athey B, Jones EG, et al. Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:e175. PMID: [16284200](#)
26. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3:Article3.
27. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 1998; 274:L908–L913. PMID: [9609729](#)
28. Ciucan L, Bonneau O, Hussey M, Duggan N, Holmes AM, Good R, et al. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Nov 15; 184(10):1171–82 doi: [10.1164/rccm.2011103-0412OC](#) PMID: [21868504](#)
29. Igura T, Kawata S, Miyagawa J, Inui Y, Tamura S, Fukuda K, et al. Expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in neointimal cells induced by balloon injury in rat carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1524–1531. PMID: [8977458](#)
30. Scharadin TM, Eckert RL. TIG3: an important regulator of keratinocyte proliferation and survival. *J Invest Dermatol* 2014; 134:1811–1816. doi: [10.1038/jid.2014.79](#) PMID: [24599174](#)
31. Martinez-Estrada OM, Culleres A, Soriano FX, Peinado H, Bolos V, Martinez FO, et al. The transcription factors Slug and Snail act as repressors of Claudin-1 expression in epithelial cells. *Biochem J* 2006; 394:449–457. PMID: [16232121](#)
32. Jang WG, Kim HS, Park KG, Park YB, Yoon KH, Han SW et al. Analysis of proteome and transcriptome of tumor necrosis factor alpha stimulated vascular smooth muscle cells with or without alpha lipoic acid. *Proteomics* 2004 nov 4 (11):3383–9334. PMID: [15378733](#)
33. Stone MR, O'Neill A, Lovering RM, Strong J, Resneck WG, Reed PW et al. Absence of keratin 19 in mice causes skeletal myopathy with mitochondrial and sarcolemmal reorganization. *J cell Sci* nov 15 120(Pt22):3999–4008).
34. Morales M, Arenas EJ, Urosevic J, Guiu M, Fernández E, Planet E, et al. RARRES3 suppresses breast cancer lung metastasis by regulating adhesion and differentiation. *EMBO Mol Med*. 2014 May 27; 6(7):865–81 doi: [10.15252/emmm.201303675](#) PMID: [24867881](#)
35. Zhou C, Nitschke AM, Xiong W, Zhang Q, Tang Y, Bloch M, et al. Proteomic analysis of tumor necrosis factor-alpha resistant human breast cancer cells reveals a MEK5/Erk5-mediated epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Breast Cancer Res* 2008; 10:R105. doi: [10.1186/bcr2210](#) PMID: [19087274](#)
36. Aomatsu K, Arai T, Abe K, Kodama A, Sugioka K, Matsumoto K, et al. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53:751–756. doi: [10.1167/iovs.11-8222](#) PMID: [22247468](#)
37. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res* 2008; 68:989–997. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-2017](#) PMID: [18281472](#)
38. Cobaleda C, Perez-Caro M, Vicente-Duenas C, Sanchez-Garcia I. Function of the zinc-finger transcription factor SNAI2 in cancer and development. *Annu Rev Genet* 2007; 41:41–61. PMID: [17550342](#)
39. Kumar MS, Hendrix JA, Johnson AD, Owens GK. Smooth muscle alpha-actin gene requires two E-boxes for proper expression in vivo and is a target of class I basic helix-loop-helix proteins. *Circ Res* 2003; 92:840–847. PMID: [12663487](#)
40. Qiu P, Li L. Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression. *Circ Res* 2002; 90:858–865. PMID: [11988486](#)
41. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Pathol* 1990; 137:503–509. PMID: [1698022](#)
42. Pitsiou G, Kyriazis G, Hatzizisi O, Argyropoulou P, Mavrofridis E, Patakas D. Tumor necrosis factor-alpha serum levels, weight loss and tissue oxygenation in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2002; 96:594–598. PMID: [12195840](#)
43. Pizarro S, Garcia-Lucio J, Peinado VI, Tura-Ceide O, Diez M, Blanco I, et al. Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014; 9:e106163. doi: [10.1371/journal.pone.0106163](#) PMID: [25171153](#)
44. Takabatake N, Nakamura H, Abe S, Inoue S, Hino T, Saito H, et al. The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1179–1184. PMID: [10764309](#)
45. Ali MS, Starke RM, Jabbour PM, Tjounakaris SI, Gonzalez LF, Rosenwasser RH, et al. TNF-alpha induces phenotypic modulation in cerebral vascular smooth muscle cells: implications for cerebral aneurysm pathology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013; 33:1564–1573. doi: [10.1038/jcbfm.2013.109](#) PMID: [23860374](#)

46. Storci G, Sansone P, Mari S, D'Uva G, Tavolari S, Guarnieri T, et al. TNFalpha up-regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype. *J Cell Physiol* 2010; 225:682–691. doi: [10.1002/jcp.22264](https://doi.org/10.1002/jcp.22264) PMID: [20509143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20509143/)
47. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, et al. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med*. 2015 Jun; 21(6):628–37 doi: [10.1038/nm.3866](https://doi.org/10.1038/nm.3866) PMID: [25985364](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25985364/)
48. Shirley SH, Hudson LG, He J, Kusewitt DF. The skinny on Slug. *Mol Carcinog* 2010; 49:851–861. doi: [10.1002/mc.20674](https://doi.org/10.1002/mc.20674) PMID: [20721976](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20721976/)
49. Savagner P, Kusewitt DF, Carver EA, Magnino F, Choi C, Gridley T, et al. Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol* 2005; 202:858–866. PMID: [15389643](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15389643/)
50. Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrío D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S, et al. Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 2006; 66:9543–9556. PMID: [17018611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17018611/)
51. Savagner P, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 1997; 137:1403–1419. PMID: [9182671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9182671/)
52. Murray SA, Gridley T. Snail1 gene function during early embryo patterning in mice. *Cell Cycle* 2006; 5:2566–2570. PMID: [17106264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17106264/)
53. Perez-Mancera PA, Gonzalez-Herrero I, Maclean K, Turner AM, Yip MY, Sanchez-Martin M, et al. SLUG (SNAI2) overexpression in embryonic development. *Cytogenet Genome Res* 2006; 114:24–29. PMID: [16717446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16717446/)
54. Schultz K, Fanburg BL, Beasley D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H2528–H2534. PMID: [16399861](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16399861/)
55. Starke RM, Ali MS, Jabbour PM, Tjounmakaris SI, Gonzalez F, Hasan DM, et al. Cigarette smoke modulates vascular smooth muscle phenotype: implications for carotid and cerebrovascular disease. *PLoS One* 2013; 8:e71954. doi: [10.1371/journal.pone.0071954](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071954) PMID: [23967268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23967268/)
56. Qiao L, Nishimura T, Shi L, Sessions D, Thrasher A, Trudell JR, et al. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2014 Feb 11; 129(6):692–70 doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003734](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003734) PMID: [24201301](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201301/)

Gene	Sequence
Calponin F	CACGACATTTTTGAGGCCAA
Calponin R	TTTCCTTTCGTCTTCGCCAT
Sm22v2 F	GGAAGCCTTCTTTCCCCAGA
Sm22v2 R	TCCAGCTCCTCGTCATACTTCTT
MyoCD F	GCACCAAGCTCAGCTTAAGGA
MyoCD R	TGGGAGTGGGCCTGGTTT
Slug F	GCAAGATCTGCGGCAAGG
Slug R	GCTCTGTTGCAGTGAGGGC
Snail F	CCCAGTGCCTCGACCACTAT
Snail R	CCAGATGAGCATTGGCAGC
VE- caherina F	GATGCAGACGACCCCACTGT
VE- cadherina R	CCACGATCTCATACTGGCC
CD31 F	AAAGTCGGACAGTGGGACGT
CD31 R	GGCTGGGAGAGCATTTCACA
GAPDH F	CATCACCATCTTCCAGGAGC
GAPDH R	TGGACTCCACGACGTACTCA
β actin F	CGGAACGCCTCATTGCC
β actin R	ACCCACACTGTGCCCATCTA
Ki67 F	GCAGCCTTAACTGTGACACTTGC
Ki67 R	GCCACCGTGCCCTGG
KLF4 F	GGGAGAAGACACTGCGTCA
KLF4 R	GGAAGCACTGGGGGAAGT
Caldesmon F	GGAGGTGAATGCCCAGAACA
Caldesmon R	AGGAATGCGGCCTCATCATC
Gp β actin F	ATATCGCTGCGCTCGTTGTC
Gp β actin R	AACGATGCCGTGCTCAATG
Gp slug F	AGACCCTGGTTGCTTCAAGGA
Gp slug R	GTTGCAGTGCGGGCAAG
Gp snail F	CTTACCTTCCAGCAGCCCTA
Gp snail R	GGAGTCCCAGATGAGTGTCG
Mouse β actin F	GGAGGGGGTTGAGGTGTT
Mouse β actin R	GTGTGCACTTTTATTGGTCTCAA
Mouse slug F	TGTATGGACATCGTCGGCAG
Mouse slug R	ACTTACACGCCCAAGGATG
Mouse snail F	TGGAAAGGCCTTCTCTAGGC
Mouse snail R	AAAGCACGGTTGCAGTGG
TIG3 F	TCTGGCTCCTCCAAGTGAGT
TIG3 R	TTTCACCTCTGCACTGTTGC
CLDNI F	CGATGAGGTGCAGAAGATGA
CLDNI R	AGCCAGACCTGCAAGAAGAA
GATA 6F	TTCCCATGACTCCAACCTTCC
GATA 6 R	TGGGGGAAGTATTTTTGCTG
CCNA2 F	CCATACCTCAAGTATTTGCCATC
CCNA2 R	TCCAGTCTTTCGTATTAATGATTGAG
HBEGF F	GGACCAGCTGCTACCCCTA
HBEGF R	GTGGCTTGAGGATAAAGTGA

Supplementary Table I . Summary of Primers used in this study

Cell cycle (GO:0007049)	
Gene symbol	Rank metric score
MAD2L1	-0.406027645
NEK2	-0.391486853
BIRC5	-0.360862374
TTK	-0.345425099
DLGAP5	-0.340312243
KIF23	-0.330975831
NDC80	-0.318150222
CENPF	-0.306908071
BUB1B	-0.303575546
CENPE	-0.300727546
UBE2C	-0.299725682
BUB1	-0.285587072
MLF1	-0.285531104
KIF11	-0.283260554
PRC1	-0.259448439
CIT	-0.256977081
CDC6	-0.253449202
ZWINT	-0.252591521
ANLN	-0.252140313
KIF15	-0.247360334
RAD51	-0.246333823
AFAP1L2	-0.245889321
PRUNE2	-0.238055795
DIRAS3	-0.237249017
PLK1	-0.234444648
KIF2C	-0.226172
NCAPH	-0.225722983
NUSAP1	-0.22515744
E2F1	-0.218571082
CDC45	-0.215077609

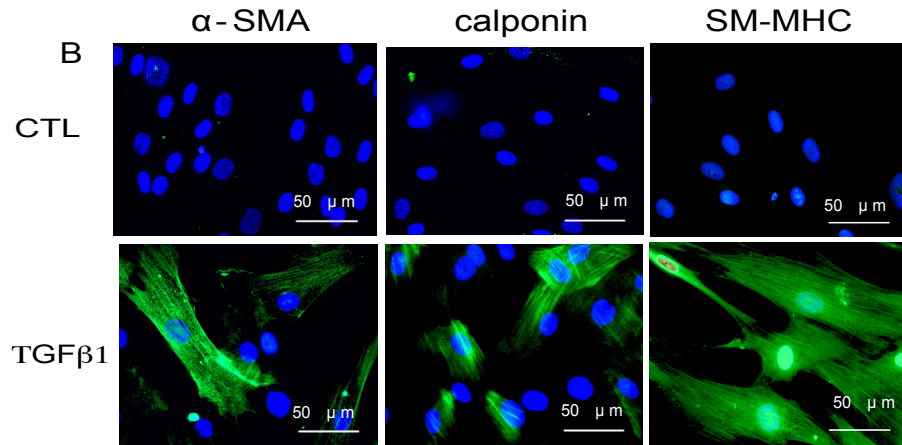
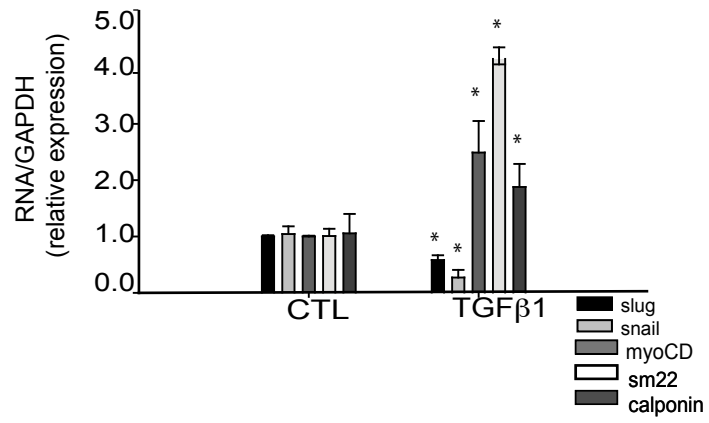
Supplementary Table II

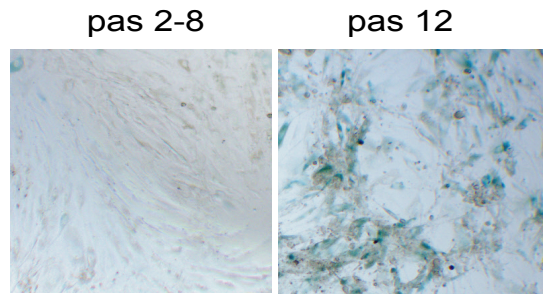
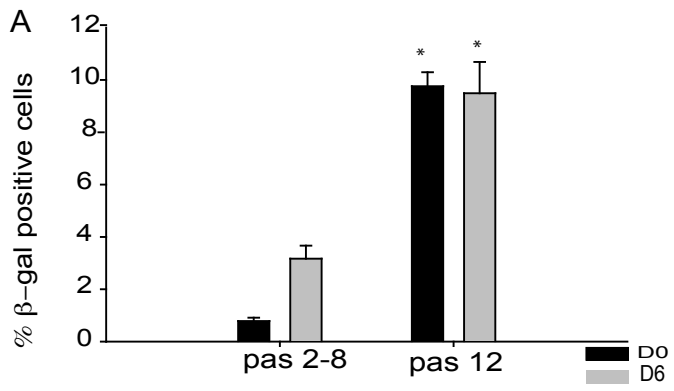
Term	Size	OddsRatio	Pvalue	GOBPID
cellular response to stimulus	4889	2,274211678	0,008233	GO:0051716
cell communication	4616	2,240660138	0,009362	GO:0007154
response to stress	2883	3,50146648	0,000142	GO:0006950
regulation of response to stimulus	2413	2,872706422	0,002001	GO:0048583
response to organic substance	1942	3,727620654	0,000189	GO:0010033
cell proliferation	1498	2,765109381	0,008739	GO:0008283
regulation of programmed cell death	1048	3,071960298	0,009225	GO:0043067
positive regulation of signal transduction	819	3,396551724	0,00838	GO:0009967
immune response	730	7,299385774	2,55E-05	GO:0006955
interspecies interaction between organisms	640	4,418888231	0,002165	GO:0044419
multi-organism cellular process	587	4,842672414	0,001319	GO:0044764
inflammatory response	478	4,987673344	0,002343	GO:0006954
regulation of defense response	438	5,466329966	0,001505	GO:0031347
regulation of cell motility	415	4,666427547	0,006607	GO:2000145
modification of morphology	350	5,573316283	0,003218	GO:0051817

Supplemental Table III : Summary of GO Terms analysis of Biological Pathways.

	NS (n=4)	S (n=7)	COPD (n=7)
BMI (kg/m²)	25 ± 5	27 ± 4	26 ± 3
FEV1 (%predicted)	102 ± 15	90 ± 13	67 ± 11* †
FVC (%predicted)	110 ± 26	119 ± 13	99 ± 19
FEV1/FVC (%predicted)	73 ± 5	74 ± 4	57 ± 9* †
Dlco (%predicted)	92 ± 9	83 ± 8	71 ± 10*
PaO2 (mmHg)	90 ± 19	87 ± 11	75 ± 9*
Distribution R1\R2\R3	1\1\2	2\3\2	1\3\3

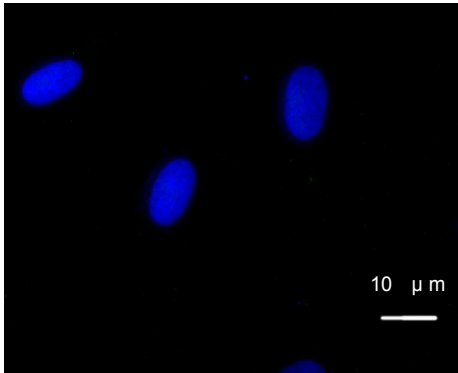
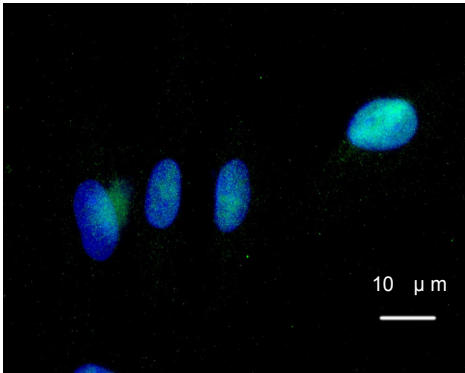
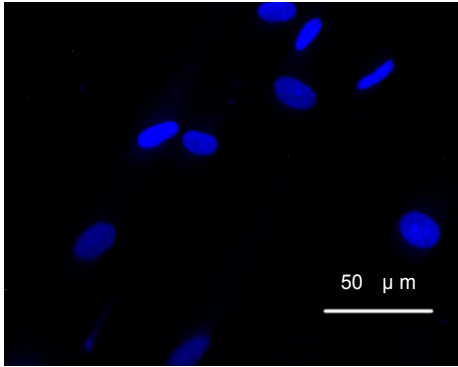
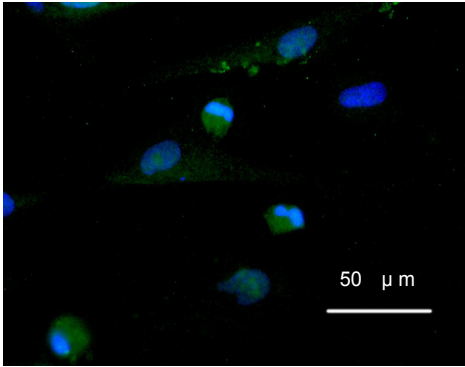
A

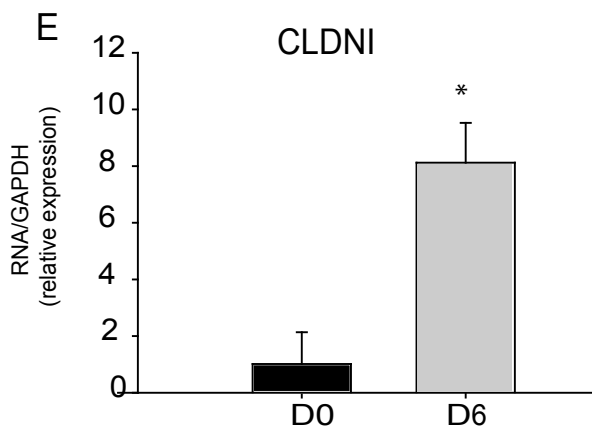
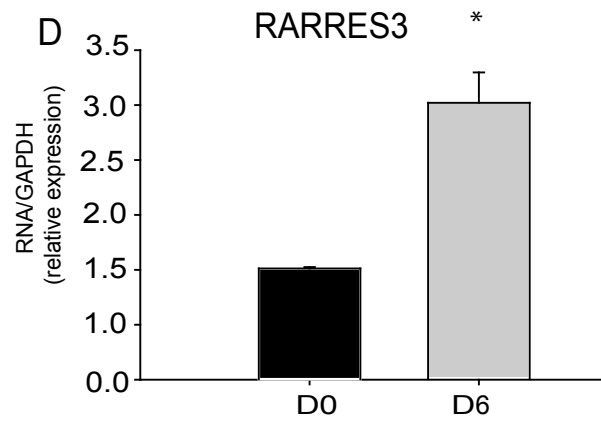
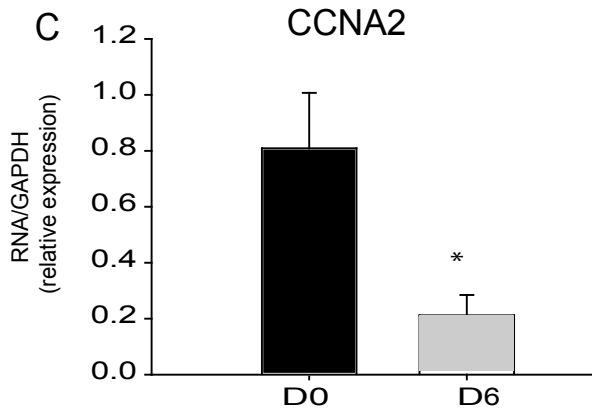
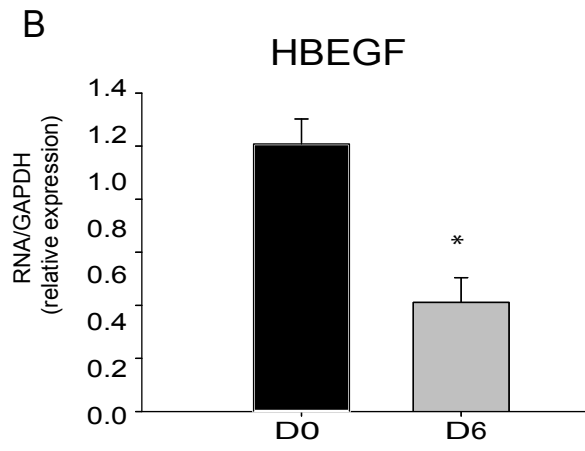
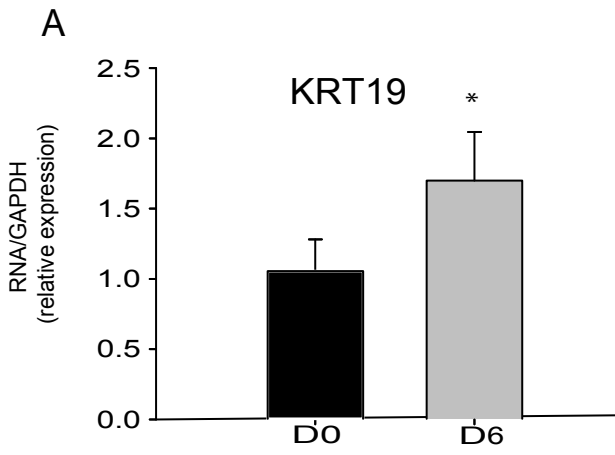


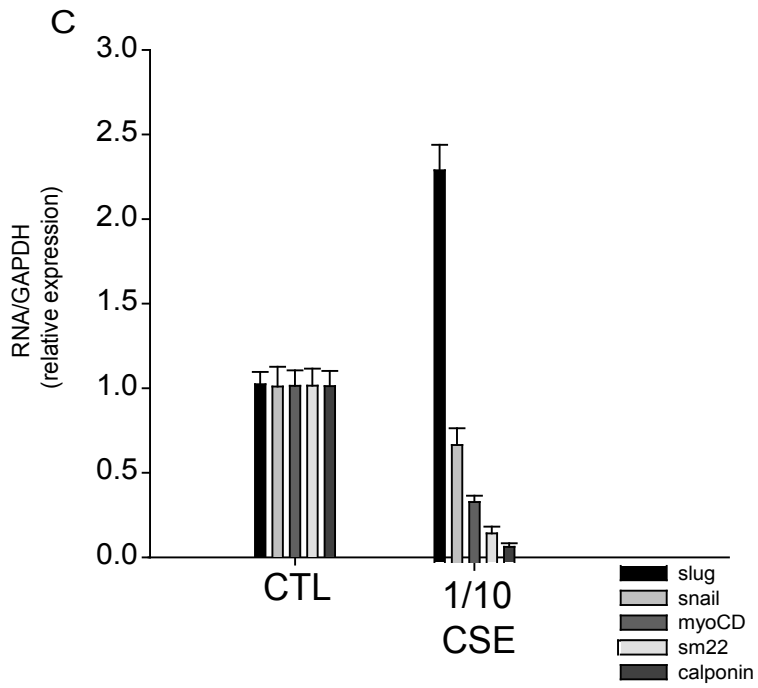
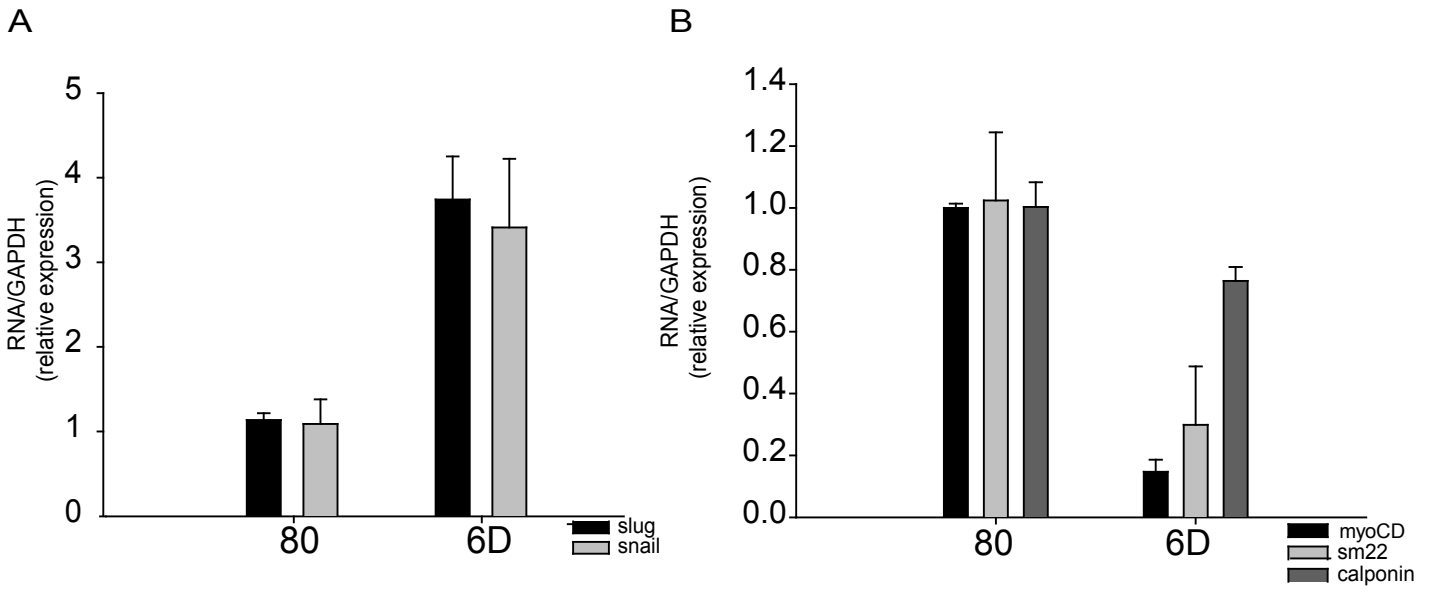


sictl

sislug







COPD-associated pulmonary vascular remodeling is linked to miRNA dysregulation

*#Melina M. Musri^{1,2}, * Núria Coll-Bonfill^{1,3}, ¶Bradley A. Maron⁴, ¶Víctor I. Peinado^{1,3}, Wang Rui-Sheng⁴, Jordi Altitiriba⁵, Isabel Blanco^{1,3}, William M. Oldham⁶, Olga Tura-Ceide^{1,3}, Jessica García-Lucio¹, Benjamin de la Cruz-Thea², Gunter Meister⁷, Joseph Loscalzo⁴ and Joan A. Barberà^{1,3}.

*,¶ These authors contributed equally to this work.

1. Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic, *Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer*, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

2. *Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra*, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

3. Biomedical Research Networking Center in Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain.

4. Division of Cardiovascular Medicine, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

5. Laboratory of Metabolism, Department of Internal Medicine Specialties, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

6. Pulmonary and Critical Care Medicine Division, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA.

7. Biochemistry Center Regensburg (BZR), Laboratory for RNA Biology, University of Regensburg, Regensburg, Germany.

#Address for correspondence:

Melina M. Musri, PhD, IDIBAPS, Hospital Clínic, Villarroel, 170. 08036-Barcelona, Spain. Phone/Fax: (34) 93 227 54 04. E-mail: mmusri@clinic.ub.es; mmusri@immf.uncor.edu

MMM, NCB VIP and JAB contributed to the conception and design of the study, the analysis and interpretation of data and the writing of the manuscript. BAM, VIP, RSW, JAB, IB, WO, OTC, JGL, BCT, GM, JL contributed in the analysis and interpretation of data. JL and BAM also contributed in revising the manuscript.

Supported by grants from the *Instituto de Salud Carlos III* (ISCiii) (PI 09/00536 and PI 13/00836); Spanish Society of Respiratory Medicine (SEPAR-2009); Fundación Contra la Hipertensión Pulmonar (FCHP); National Institutes of Health (NIH) (1K08HL11207-01A1,

1K08128802-01A1, HL061795, HL108630, HG007690 and GM107618); American Heart Association (AHA) (15GRNT25080016); Pulmonary Hypertension Association; Cardiovascular Medical Research and Education Fund (CMREF); Klarman Foundation at Brigham and Women's Hospital; and the American Thoracic Association (ATS) Foundation. MMM was the recipient of a Sara Borrell contract from the ISCiii; JGL was the recipient of a Pre-doctoral contract from the ISCiii; OTC was the recipient of Marie-Curie Biotrack grant; and BCT is the recipient of a Pre-doctoral contract from CONICET.

Running head: miRNAs in vascular remodeling associated with COPD

Key words: vascular smooth muscle (3.15), cell fate, vascular: proliferation (3.28), COPD pathogenesis (9.13), vascular remodelling (17.10)

Word count:

At a Glance Commentary

Scientific Knowledge on the subject: The molecular mechanisms underlying COPD are not fully understood. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate mRNA expression levels modulating cell phenotype. There is no information on the role of miRNA dysregulation on the pathogenesis of pulmonary vascular remodeling, which is frequently observed in COPD.

What this study adds to the field: In pulmonary artery specimens from COPD patients we demonstrate that miR-197 plays an important role regulating smooth muscle cell proliferation, which is a major contributor to vascular remodeling in COPD. MiR-197 targets the proliferative transcription factor E2F1, providing the basis for potential new therapeutic targets.

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at www.atsjournals.com.

ABSTRACT

Background: Pulmonary vascular remodeling is an angiogenic-related process involving changes in smooth muscle cell (SMC) homeostasis, which is frequently observed in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate mRNA expression levels of many genes modulating cell phenotype. The study aimed to evaluate the expression profile of miRNAs in pulmonary arteries (PA) of patients with COPD and its relationship with the regulation of SMC phenotypic change.

Methods and results: miRNA expression profiles from PA of 12 COPD patients, 9 smokers with normal lung function (SK), and 7 non-smokers (NS) were analyzed using TaqMan Low Density Arrays. In COPD patients, expression levels of miR-98, miR-139-5p, miR-146b-5p and miR-451 were upregulated, as compared with NS. In contrast, miR-197, miR-204, miR-485-3p, and miR-627 were downregulated. MiRNA-197 expression correlated with both airflow obstruction and PA intimal enlargement. In an *in vitro* model of SMC differentiation, miR-197 expression was associated with a SMC contractile phenotype. MiR-197 inhibition blocked the acquisition of contractile markers in SMC and promoted a proliferative/migratory phenotype measured by both cell cycle analysis and wound-healing assay. Using luciferase assays, Western blot, and qPCR we confirmed that miR-197 targets the transcription factor E2F1. In PA from COPD patients, levels of E2F1 were increased, as compared with NS.

Conclusions: In PA of COPD patients, remodeling of the vessel wall is linked to the downregulation of miR-197, which regulates SMC phenotype. The effect of miR-197 on PA might be mediated, at least in part, by the key pro-proliferative factor E2F1.

Word count: 250

Key words: vascular remodeling, smooth muscle cell phenotypic switch, miRNAs, COPD

INTRODUCTION

Pulmonary vascular remodeling is a characteristic feature of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and is considered the principal determinant of pulmonary hypertension (PH) in this disease.^{1, 2} Proliferation of poorly differentiated vascular smooth muscle cells (SMC) is the main cellular contributor to pulmonary vessel remodeling (intimal hyperplasia) in COPD.³ The molecular mechanisms underlying SMC proliferation in this disorder are poorly understood.

MicroRNAs (miRNAs) are an evolutionarily conserved 21-nucleotide (nt) class of small noncoding RNAs involved in a number of cell processes.^{4, 5} miRNAs bring the RNA-induced silencing complex (RISC) to a specific target mRNA by binding to complementary sites at the 3' -end and promoting its translational repression and/or degradation⁶.

Recent studies show that miRNAs modulate the cell fate of both SMC and endothelial cells (EC) in vessel remodelling.⁷⁻¹⁰ Specifically, miR-143/145 regulates SMC differentiation and is necessary to maintain a contractile phenotype.^{11, 12} Its expression is reduced in plexiform lesions of pulmonary arterial hypertension (PAH)¹³ and its downregulation promotes the proliferation of neointimal cells after vascular injury, whereas restoration of miR-145 expression reverses intimal growth.¹⁴ MiR-204 is also downregulated in plexiform lesions,¹³ explanted lungs,¹⁵ and plasma of PAH patients.¹⁶ MiR-204 acts as a negative regulator of SMC proliferation.¹⁵ By contrast, miR-21 and miR-126 are upregulated in the plexiform lesions of PAH¹³ and in experimental models of PH,¹⁰ while the expression of miR-17-92 in human pulmonary artery SMC is downregulated in PAH.^{17, 18} MiR-21 has been shown to regulate both SMC proliferation and differentiation.¹⁹ MiR-126 induces SMC differentiation, and miR-17-92 maintains a differentiated SMC phenotype.¹⁷ Alteration of the miRNA expression profile has also been found in lungs of rats and in human airway epithelium exposed to cigarette smoke²⁰⁻²², as well as in COPD patients^{23, 24}, underscoring the potential role of these molecules in the regulation of pulmonary vascular remodeling in these conditions.

MiRNA expression is tissue-specific, and every cell type contains specific miRNA profiles that help to establish and maintain distinctive gene expression signatures. We hypothesized that miRNAs might contribute to the pathogenesis of pulmonary vascular remodeling in COPD, specifically by modulating SMC phenotype. Accordingly, the present study aimed to identify miRNAs that mediate cell proliferation in pulmonary arteries obtained from lung tissue samples of COPD patients and control subjects.

MATERIAL AND METHODS (word count 556)

Detailed descriptions of methods are provided in the online supplement.

Patient characteristics

Pulmonary artery segments from surgical lung resection patients with localized lung neoplasms were evaluated. The samples were collected over 2 years. Characteristics of the patients are shown in Table 1. Twelve patients were diagnosed with COPD, nine patients were current smokers with normal lung function (SK), and the remaining seven patients were nonsmokers with normal lung function (NS). The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clinic, Barcelona, Spain.

MiRNA expression in pulmonary arteries

Pulmonary arteries were obtained from normally appearing lung areas, far from the neoplastic lesion. After cleaning off the connective tissue, pulmonary arteries were frozen at -70°C with RNAlater (Ambion). RNA isolation was performed using Trizol (Invitrogen). The retrotranscription was performed using 10 ng of total RNA using the Taqman© miRNA reverse transcription kit and megaplex™ pools of RT primers (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Taqman© Low density array human miRNA cards A set v3.0 (TLDA, Applied Biosystems) was used to analyze expression of 381 miRNAs.

Cell differentiation experiments

We studied a cellular model of SMC differentiation triggered by cell-to-cell contact and cell confluency as previously described.²⁵

Immunofluorescence

SMC differentiation was assessed by immunofluorescence, as previously described^{25,26}. The primary antibodies used were directed against α -SMA (1/750), calponin (1/75; DAKO Cytomation, Carpinteria, CA). An antibody against antigen Ki-67 (1/50; Novocastra®, Newcastle, UK) was used to measure cell proliferation.

Gene Expression analysis

To study mRNA expression, RNA isolation followed by real time RT-PCR experiments was performed. MiRNA expression was analyzed by Northern blot, and protein expression was evaluated using Western blot.

Functional in vitro assays in SMC cultures

These studies included analysis of cell migration by wound healing assays, the use 2' O-methyl antisense oligonucleotides chemically synthesized (Pierce) to inhibit miRNA, and luciferase assays to demonstrate miRNA-197 target binding.

Study design

The miRNA expression profile of pulmonary arteries from NS, SK, and COPD patients was analyzed. We applied Limma analysis and a gene network analysis to evaluate the miRNA signature and its associated interactome in pulmonary arteries of COPD patients. Among the miRNAs with altered expression, miR-98, miR-451 and miR-197 correlated with spirometric measurements and vascular remodelling, but only miR-197, which is related to cell proliferation in other cell systems, had not previously been studied in SMC or intima hyperplasia. By using bioinformatics inference, we found that miR-197 targets genes related to cell proliferation. To study its role in vascular remodeling, miR-197 expression was evaluated in an *in vitro* model of SMC phenotype switching. Finally, to find new insights into the mechanism by which miR-197 regulates proliferation, the expression of the plausible target E2F1 was analyzed in SMC after miRNA inhibition with antisense 2'O- methylated RNA oligos and in pulmonary arteries.

Statistical analysis

All values are reported as mean \pm SEM. measurements were performed in duplicate, and at least three independent experiments were performed for each set of conditions. Two-group comparisons were analyzed using the two-tailed paired Student *t*-test for dependent samples (paired measurements for one set of items) or the Mann–Whitney Rank Sum test for non-normally distributed data. Group comparisons were performed using one-way ANOVA. Post hoc pairwise comparisons were made using the Student Newman–Keuls test for normally distributed variables or the Kruskal–Wallis and Dunn tests for non-normally distributed variables. For all procedures, *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Differential expression of miRNAs in pulmonary arteries

We analyzed the expression of 381 miRNAs in pulmonary artery homogenates isolated from COPD, SK, and NS lung tissue samples using TLDA. Applying Limma to the miRNA expression data, we found that COPD patients showed upregulation of miR-98, miR-139-5p, miR-146b-5p, and miR-451, and downregulation of miR-197, miR-204, miR-485-3p, and miR-627 when compared with NS (Table 2 and Figure 1; Table E1 and Figure E1). Interestingly, pulmonary arteries from SK displayed a similar miRNA expression pattern as in COPD, although they did not achieve statistical significance (Table 2 and Figure 1B).

Deregulated miRNA in COPD target a number of genes related to proliferation

Each miRNA has a large number of targets according to the TargetScan database. We focused on those targets with functions in cell proliferation and mapped them to the comprehensive human interactome,²⁷ which represents a network of all ascertainable protein-protein interactions in a cell. As a result, a miRNA regulatory network in COPD describing the dysfunctional cell proliferation module was constructed (Figure 2).

Correlation of miRNA expression with COPD severity and vascular remodeling

Among the differentially expressed miRNAs, the expression of miR-139 and miR-485 correlated with FEV₁ (% predicted FEV₁ ($r=0.403$, $p\leq 0.034$; and $r=-0.464$, $p\leq 0.017$; respectively) (Figure 3A), while miR-197 expression was significantly correlated with the severity of airflow obstruction, denoting that the lower the FEV₁, the lower the miRNA expression ($r=-0.541$, $p\leq 0.003$); and inversely correlated to the degree of vascular remodeling assessed by the thickness of the intimal layer, meaning that the lower the miRNA expression, the greater the intimal thickness ($r=0.410$, $p\leq 0.023$) (Figure 3B). Expression of miR-98 and miR-451 also correlated with FEV₁ ($r=0.453$, $p\leq 0.017$; and $r=0.380$, $p\leq 0.040$; respectively) and intimal thickness ($r= -0.601$, $p\leq 0.003$; and $r=-0.520$, $p\leq 0.012$; respectively) (Figure 3C).

Expression of miR-197 increases during SMC differentiation

Between all miRNAs that correlated with functional parameters, the contribution of miR-197 was never evaluated in vascular remodeling-associated processes. Using an *in vitro* model of SMC differentiation induced by cell-to-cell contact,²⁵ we performed Northern blot analysis at different stages of differentiation –D0 (proliferative cells), D2 (confluent cells), and D6

(differentiated/contractile cells)– and observed that miR-197 expression was increased in differentiated SMC with contractile phenotype (Figure 4A).

In SMC isolated from pulmonary arteries of the studied subjects, Northern blot analysis showed lower expression of miR-197 in SMC from COPD patients and SK, as compared to NS (Figure 4B).

Effect of miR-197 inhibition on SMC differentiation and proliferation

Transfection of SMC with a 2'-O-methylated antisense RNA against miR-197 (AS-miR-197) and a scrambled AS (AS-miR-CTL) at D0 of differentiation was used to inhibit the expression of miR-197 (Figure 5A). MiR-197 inhibition in SMC blunted the expression of the SMC differentiation markers, myocardin, calponin, and sm22- α , after induction of differentiation by cell-to-cell contact²⁵ as assessed by RT-qPCR (Figure 5B). Analysis of both α -SMA and calponin by immunofluorescence showed a marked decrease of actin and calponin fiber formation in AS-miR-197-transfected cells as compared with control cells (Figure 5B). In addition, miR-197 inhibition induced the proliferation of SMC as measured by increased expression of Ki67 at RNA and protein levels (Figure 5C). In agreement with these results, proliferation and migration capacities analyzed by a wound-healing assay were significantly increased in SMC after transfection with AS-miR-197 (Figure 5D).

MiR-197 targets the transcription factor E2F1

Co-transfection of E2F1 3'UTR coupled to a luciferase report vector with the AS-miR-197 in SMC (Figure 6A) showed increased luciferase expression compared with scrambled cells. In addition, upregulation of E2F1 RNA and protein was observed after miR-197 inhibition in differentiated SMC (Figure 6B). These results confirm that miR-197 targets mRNA encoding the transcription factor E2F1. According to these results, E2F1 expression followed an inverse pattern as that of miR-197 during SMC differentiation (Figure 6C).

Expression of E2F1 is increased in PA from COPD patients

To investigate whether or not the expression of E2F1 might be dysregulated in pulmonary arteries from COPD patients, we analyzed the expression of E2F1 in PA by Western blot (Figure 7). The expression of E2F1 in COPD and SK was upregulated, as compared with NS, mirroring the downregulation of miR-197 in COPD pulmonary arteries.

DISCUSSION

This study demonstrates the involvement of miRNAs in COPD-related vascular remodeling. Our work shows that from the 381 studied miRNAs, only 2% of miRNAs were differentially expressed in pulmonary arteries of COPD patients compared to NS. By applying Limma analysis, we identified 8 deregulated miRNAs in COPD. From these miRNAs, miR-98, miR-139-5p, miR-146b-5p, and miR-451 were upregulated, and miR-197, miR-204, miR-485-3p, and miR-627 were downregulated. Interestingly, expression of miRNAs in pulmonary arteries from SK was similar to that of COPD patients, although they did not achieve significance, indicating that smoking without airflow obstruction is an intermediate phenotype between NS and COPD, as has been already suggested in other studies.^{28, 29}

The gene ontology (GO) annotation analysis of all of these miRNAs using the TargetScan database identified mainly genes involved in cell proliferation, suggesting that vascular remodeling in COPD is associated with changes in miRNAs that control cell proliferation. By mapping these targets, we constructed a miRNA regulatory network, which represents a cell proliferation functional module in COPD as compared to NS. This approach allowed us to identify the miRNAs and their canonical targets associated with multiple pathogenic pathways central to SMC proliferation in COPD.

We documented a downregulation of miR-204 in PA of COPD patients. In addition, a decreased expression of miR-204 was observed in both proliferative SMC and in SMC pulmonary arteries-derived SMC from COPD patients (Figure E2). In support of this finding, reduced expression of miR-204 in SMC from pulmonary arteries in both PAH patients and in rodent experimental models of PAH have been reported.¹⁵ Downregulation of miR-204 in dedifferentiated SMC suggests that miR-204 has a potential role in regulating SMC differentiation. Interestingly, miR-204 targets the transcription factor Slug in cancer cells, regulating changes in cell phenotype.^{30, 31} In this regard, we have recently shown that Slug modulates the SMC proliferative phenotype, and that its expression is increased in both highly remodeled human PA and in lungs of mice with severe PH.²⁵ These results suggest that miR-204 might regulate SMC phenotype through suppressing Slug expression.

In pulmonary arteries of COPD patients, we also observed upregulation of miR-451, as has been shown in experimental models of PH and in humans with PAH^{11, 32}. The transient loss of miR-451 is protective in the development of PAH.³³ Other deregulated miRNA in this

study were miR-146b, which promotes SMC proliferation,³⁴ and miR-98, which mediates endothelial inflammation in atherosclerosis.³⁵ Finally, miR-197, miR-485, and miR-627 are broadly involved in cancer cell proliferation.³⁶⁻⁴¹ We hypothesized that deregulation of miRNAs might promote cell proliferation and contribute to intimal hyperplasia in pulmonary arteries in COPD.

Among dysregulated miRNAs, the degree of vascular remodeling and the severity of airflow obstruction were associated to the upregulation of miR-98 and miR-451, and the downregulation of miR-197. This is interesting since miR-197 is a tumor suppressor, which, by regulating cell proliferation, might also be involved in SMC proliferation in COPD.^{39, 40, 42} Accordingly, we further analyzed the role of miR-197 in modulating the proliferative phenotype of SMC using an *in vitro* model of SMC differentiation. Our results show that an increased expression of miR-197 was associated with a SMC differentiated/contractile phenotype, whereas its inhibition downregulated mature markers of SMC in differentiated cells. Moreover, functional studies performed after transfection of SMC with the AS-miR-197 revealed an increased rate of proliferation/migration, indicating that loss of this miRNA regulates SMC phenotype switching. Cultured SMC obtained from explanted PA of COPD patients also showed low levels of miR-197 that was associated with a less differentiated phenotype. These results are consistent with previous studies in uterine leiomyoma derived SMC,^{39, 40, 42} in which, downregulation of miR-197 induced greater growth rate, whereas its overexpression inhibited proliferation and migration *in vitro*.

By using network analysis, we documented that miR-197 binds canonically with at least 19 different factors related to cell proliferation. From these factors we confirmed the increased expression of insulin growth factor-1 (IGF1) after miR-197 inhibition (Figure E3), a known factor involved in both pulmonary vascular remodeling⁴³ and stimulation of SMC proliferation⁴⁴. This result suggests that IGF-1 might also be a target of miR-197, but further studies are needed in order to validate it.

MiRNAs directly interact canonically by base pair complementary with specific regions of mRNAs, thereby regulating translation. The bioinformatic analysis to predict potential mRNA targets is based on this feature. However, evidence indicates that non-canonical binding (containing bulged or mismatched nucleotides) of miRNAs to their targets is a frequent event (~60% of total binding), and, therefore, its contribution should not be underestimated.⁴⁵ Available data indicate that miRNA-197 binds to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of

E2F1.⁴⁵ This is important because E2F1 is an oncoprotein that regulates many cellular processes, including cell proliferation.⁴⁶ E2F1 participates in both cell cycle progression and apoptosis, depending on which pathway is activated.⁴⁷⁻⁴⁹ E2F1 induces S phase entry, activating prosurvival and proliferative genes like cyclins, p53, or c-myc, and many S-phase genes,^{49, 50} whereas activation of the regulators p53, p73, or Bcl2 induces apoptosis. In our study with pulmonary SMC, using a luciferase report assay, qPCR, and Western blot, we validated that E2F1 is a target of miR-197. E2F1 expression was high in proliferative/dedifferentiated SMC in accordance with oncogene function, and decreased during the acquisition of a contractile phenotype, following an inverse pattern than that of miR-197 expression. These results agree with previous studies showing that E2F1 is related to a higher rate of cell proliferation.³⁷⁻⁴² Importantly, we found that E2F1 was upregulated, paralleling the decreased expression of miR-197, in pulmonary arteries from COPD patients.

Further studies will be needed to unravel the mechanisms by which miR-197 is downregulated in COPD-associated vascular remodeling. Cigarette smoke products might alter miR-197 expression. Nicotine induces STAT3 activation in both smooth muscle and inflammatory cells.⁵¹ STAT3 promotes the downregulation of miR-204 in SMC by epigenetic mechanisms.⁵² Interestingly, in hepatocellular carcinoma cells, activation of the interleukin-6 (IL-6)/STAT3 pathway induces the downregulation of miR-197, which, in turn, targets stat3 mRNA to promote cancer progression.⁵³ However, smoking, as an intermediate condition,^{28, 29} is not enough to markedly promote statistically significant changes in gene expression. Hypoxia might also promote miR-197 downregulation. In this respect, IL-6 is increased in cells with both a hypoxic environment and a more proliferative/dedifferentiated SMC phenotype in pulmonary hypertension.⁵⁴ The mechanism of miRNA-197 downregulation might also involve DNA hypermethylation, which is known to induce the downregulation of tumor suppressor miRNAs in cancer⁵⁵ and has also been described in vascular remodeling.⁵²

The present study has some limitations. Despite the fact that pulmonary arteries were isolated in an area distant from the solid tumor, we cannot exclude some effects of tumoral factors on miRNAs expression. However, we performed an additional network analysis discriminating different cancer types, specifically squamous vs non-squamous cancers. In this analysis, miR-197 did not show any difference between cancer samples (data non shown).

In summary, we observed downregulation of miRNA-197 in pulmonary arteries from smokers and COPD patients. Expression of this miRNA correlated inversely with both vascular remodeling and airflow obstruction. E2F1 was found to be upregulated in pulmonary arteries from smokers and COPD patients. Taken together, our studies support the view that miRNA-197 downregulation induces a SMC proliferative phenotype, at least in part, by releasing the suppression of the E2F1 transcription factor, which, in turn, regulates cell cycle entry. The identification of miRNAs involved in cell proliferation associated with pulmonary vascular remodeling in COPD opens a new view in its pathogenesis and, eventually, its therapeutic approach.

Acknowledgments

This work was developed at the Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona, Spain. We are indebted to the Citomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) for their technical help. We thank Cristina Bonjoch Anguita for expert technical assistance.

References

- [1] Peinado VI, Pizarro S, Barbera JA: Pulmonary vascular involvement in COPD. *Chest* 2008, 134:808-14.
- [2] Blanco I, Piccari L, Barbera JA: Pulmonary vasculature in COPD: The silent component. *Respirology* 2016.
- [3] Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA: Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *The European respiratory journal* 2002, 19:632-8.
- [4] Bartel DP: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009, 136:215-33.
- [5] Siomi H, Siomi MC: On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 2009, 457:396-404.
- [6] Meister G, Tuschl T: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004, 431:343-9.
- [7] McDonald RA, Hata A, MacLean MR, Morrell NW, Baker AH: MicroRNA and vascular remodelling in acute vascular injury and pulmonary vascular remodelling. *Cardiovascular research* 2012, 93:594-604.
- [8] Coll-Bonfill N, de la Cruz-Thea B, Pisano MV, Musri MM: Noncoding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders. *Pflugers Arch* 2016.
- [9] Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Schober A: The role of microRNAs in arterial remodelling. *Thrombosis and haemostasis* 2012, 107:611-8.
- [10] Leopold JA, Maron BA: Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* 2016, 17.
- [11] Caruso P, Dempsie Y, Stevens HC, McDonald RA, Long L, Lu R, White K, Mair KM, McClure JD, Southwood M, Upton P, Xin M, van Rooij E, Olson EN, Morrell NW, MacLean MR, Baker AH: A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples. *Circulation research* 2012, 111:290-300.
- [12] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D: miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009, 460:705-10.
- [13] Bockmeyer CL, Maegel L, Janciauskiene S, Rische J, Lehmann U, Maus UA, Nickel N, Haverich A, Hoepfer MM, Golpon HA, Kreipe H, Laenger F, Jonigk D: Plexiform vasculopathy of severe pulmonary arterial hypertension and microRNA expression. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2012, 31:764-72.
- [14] Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C: MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circulation research* 2009, 105:158-66.
- [15] Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S: Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *The Journal of experimental medicine* 2011, 208:535-48.
- [16] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S: Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2012, 126:2601-11.
- [17] Zhou G, Chen T, Raj JU: MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2015, 52:139-51.
- [18] Pullamsetti SS, Doebele C, Fischer A, Savai R, Kojonazarov B, Dahal BK, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Bonauer A, Seeger W, Zeiher AM, Dimmeler S, Schermuly

RT: Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2012, 185:409-19.

[19] Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A: SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 2008, 454:56-61.

[20] Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S: Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009, 23:806-12.

[21] Schembri F, Sridhar S, Perdomo C, Gustafson AM, Zhang X, Ergun A, Lu J, Liu G, Zhang X, Bowers J, Vaziri C, Ott K, Sensinger K, Collins JJ, Brody JS, Getts R, Lenburg ME, Spira A: MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, 106:2319-24.

[22] Izzotti A, Larghero P, Balansky R, Pfeffer U, Steele VE, De Flora S: Interplay between histopathological alterations, cigarette smoke and chemopreventive agents in defining microRNA profiles in mouse lung. *Mutation research* 2011, 717:17-24.

[23] Kara M, Kirkil G, Kalemci S: Differential Expression of MicroRNAs in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University* 2016, 25:21-6.

[24] Sessa R, Hata A: Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulmonary circulation* 2013, 3:315-28.

[25] Coll-Bonfill N, Peinado VI, Pisano MV, Parrizas M, Blanco I, Evers M, Engelmann JC, Garcia-Lucio J, Tura-Ceide O, Meister G, Barbera JA, Musri MM: Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. *PloS one* 2016, 11:e0159460.

[26] Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI: Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovascular research* 2010, 88:502-11.

[27] Menche J, Sharma A, Kitsak M, Ghiassian SD, Vidal M, Loscalzo J, Barabasi AL: Disease networks. Uncovering disease-disease relationships through the incomplete interactome. *Science* 2015, 347:1257601.

[28] Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gómez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, Rodriguez-Roisin R: Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology* 1998, 274:L908-13.

[29] Llinas L, Peinado VI, Ramon Goni J, Rabinovich R, Pizarro S, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA, Bastos R: Similar gene expression profiles in smokers and patients with moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2011, 24:32-41.

[30] Yu CC, Chen PN, Peng CY, Yu CH, Chou MY: Suppression of miR-204 enables oral squamous cell carcinomas to promote cancer stemness, EMT traits, and lymph node metastasis. *Oncotarget* 2016, 7:20180-92.

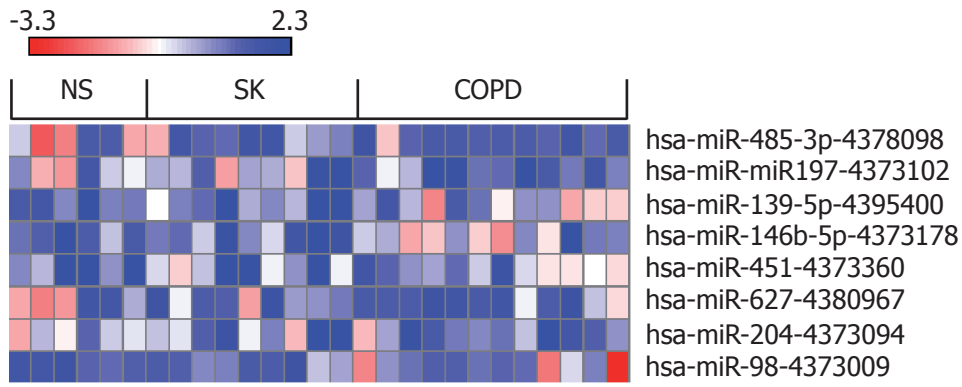
[31] Qiu YH, Wei YP, Shen NJ, Wang ZC, Kan T, Yu WL, Yi B, Zhang YJ: miR-204 inhibits epithelial to mesenchymal transition by targeting slug in intrahepatic cholangiocarcinoma cells. *Cell Physiol Biochem* 2013, 32:1331-41.

[32] Caruso P, MacLean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southgate M, MacDonald RA, Greig JA, Robertson KE, Masson R, Denby L, Dempsey Y, Long L, Morrell NW, Baker AH: Dynamic changes in lung microRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2010, 30:716-23.

- [33] Grant JS, Morecroft I, Dempsie Y, van Rooij E, MacLean MR, Baker AH: Transient but not genetic loss of miR-451 is protective in the development of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation* 2013, 3:840-50.
- [34] Wang H, Jiang M, Xu Z, Huang H, Gong P, Zhu H, Ruan C: miR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration. *Int J Clin Exp Pathol* 2015, 8:12901-7.
- [35] Chen LJ, Chuang L, Huang YH, Zhou J, Lim SH, Lee CI, Lin WW, Lin TE, Wang WL, Chen L, Chien S, Chiu JJ: MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress. *Circulation research* 2015, 116:1157-69.
- [36] Xi S, Xu H, Shan J, Tao Y, Hong JA, Inchauste S, Zhang M, Kunst TF, Mercedes L, Schrupp DS: Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation* 2013, 123:1241-61.
- [37] Formosa A, Markert EK, Lena AM, Italiano D, Finazzi-Agro E, Levine AJ, Bernardini S, Garabadiu AV, Melino G, Candi E: MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene* 2014, 33:5173-82.
- [38] Tian LQ, Liu EQ, Zhu XD, Wang XG, Li J, Xu GM: MicroRNA-197 inhibits cell proliferation by targeting GAB2 in glioblastoma. *Mol Med Rep* 2016, 13:4279-88.
- [39] Ling J, Jiang L, Zhang C, Dai J, Wu Q, Tan J: Upregulation of miR-197 inhibits cell proliferation by directly targeting IGFBP5 in human uterine leiomyoma cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 2015, 51:835-42.
- [40] Xin J, Zhang XK, Xin DY, Li XF, Sun DK, Ma YY, Tian LQ: FUS1 acts as a tumor-suppressor gene by upregulating miR-197 in human glioblastoma. *Oncol Rep* 2015, 34:868-76.
- [41] Padi SK, Zhang Q, Rustum YM, Morrison C, Guo B: MicroRNA-627 mediates the epigenetic mechanisms of vitamin D to suppress proliferation of human colorectal cancer cells and growth of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* 2013, 145:437-46.
- [42] Ling J, Wu X, Fu Z, Tan J, Xu Q: Systematic analysis of gene expression pattern in has-miR-197 over-expressed human uterine leiomyoma cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 2015, 75:226-33.
- [43] Perkett EA, Badesch DB, Roessler MK, Stenmark KR, Meyrick B: Insulin-like growth factor I and pulmonary hypertension induced by continuous air embolization in sheep. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992, 6:82-7.
- [44] von der Thusen JH, Borensztajn KS, Moimas S, van Heiningen S, Teeling P, van Berkel TJ, Biessen EA: IGF-1 has plaque-stabilizing effects in atherosclerosis by altering vascular smooth muscle cell phenotype. *The American journal of pathology* 2011, 178:924-34.
- [45] Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervy D: Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 2013, 153:654-65.
- [46] Attwooll C, Lazzarini Denchi E, Helin K: The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO journal* 2004, 23:4709-16.
- [47] Crosby ME, Almasan A: Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer biology & therapy* 2004, 3:1208-11.
- [48] DeGregori J, Johnson DG: Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. *Current molecular medicine* 2006, 6:739-48.
- [49] Helin K: Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current opinion in genetics & development* 1998, 8:28-35.
- [50] Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA: Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 1996, 12:1173-80.

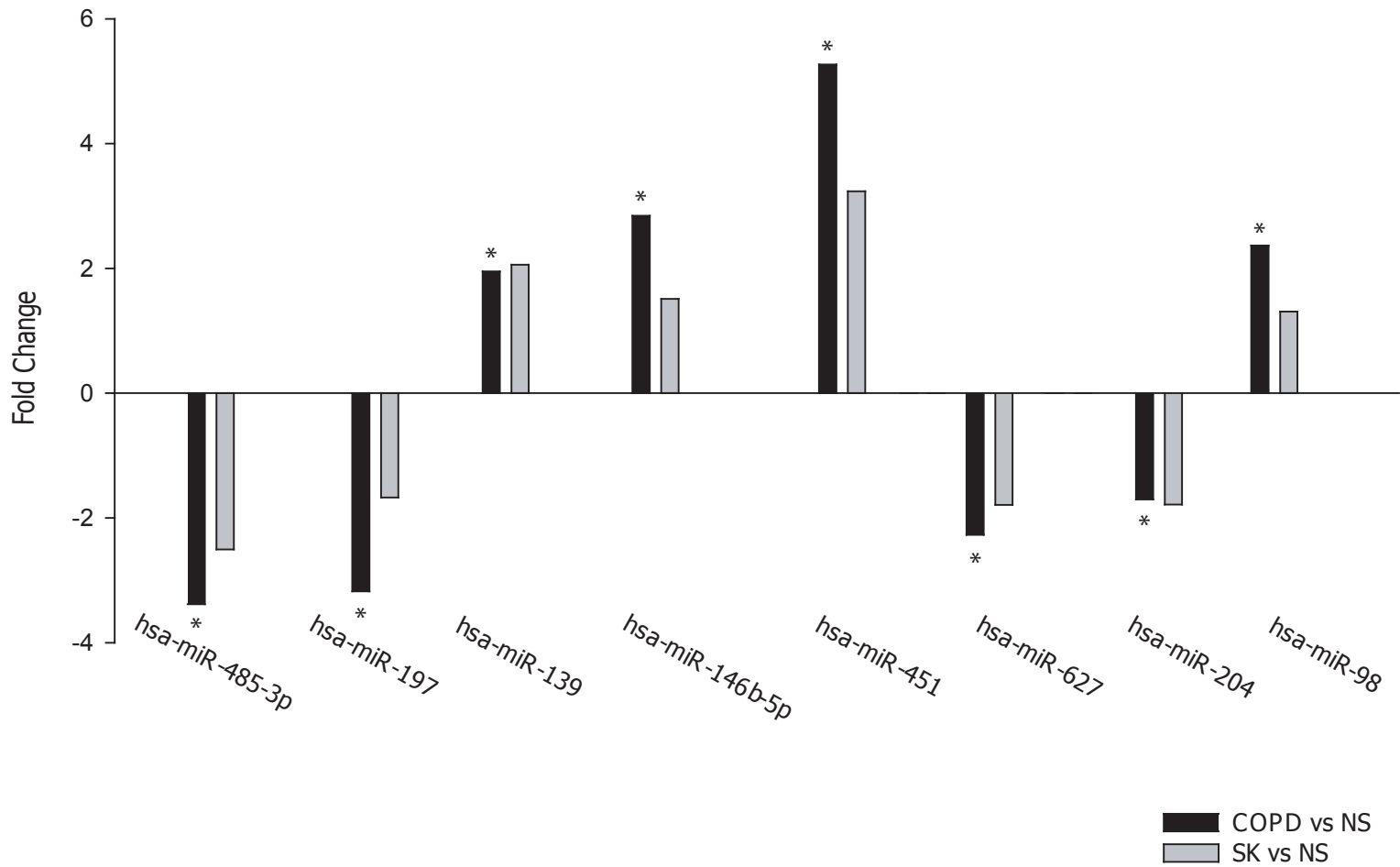
- [51] Li JM, Cui TX, Shiuchi T, Liu HW, Min LJ, Okumura M, Jinno T, Wu L, Iwai M, Horiuchi M: Nicotine enhances angiotensin II-induced mitogenic response in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004, 24:80-4.
- [52] Kim JD, Lee A, Choi J, Park Y, Kang H, Chang W, Lee MS, Kim J: Epigenetic modulation as a therapeutic approach for pulmonary arterial hypertension. *Exp Mol Med* 2015, 47:e175.
- [53] Wang H, Su X, Yang M, Chen T, Hou J, Li N, Cao X: Reciprocal control of miR-197 and IL-6/STAT3 pathway reveals miR-197 as potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Oncoimmunology* 2015, 4:e1031440.
- [54] Frid MG, Li M, Gnanasekharan M, Burke DL, Fragoso M, Strassheim D, Sylman JL, Stenmark KR: Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and prometogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology* 2009, 297:L1059-72.
- [55] Lujambio A, Calin GA, Villanueva A, Ropero S, Sanchez-Cespedes M, Blanco D, Montuenga LM, Rossi S, Nicoloso MS, Faller WJ, Gallagher WM, Eccles SA, Croce CM, Esteller M: A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, 105:13556-61.

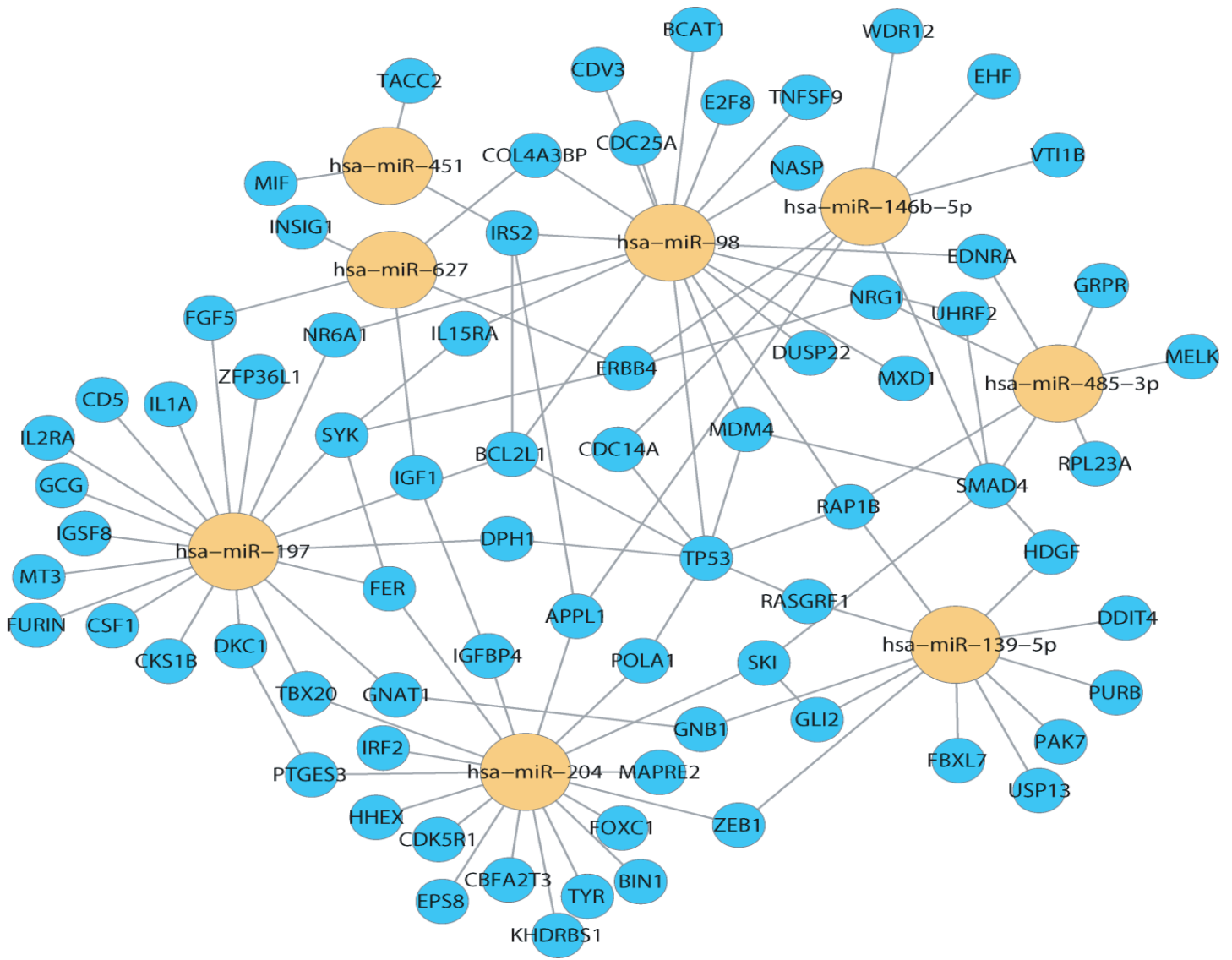
A

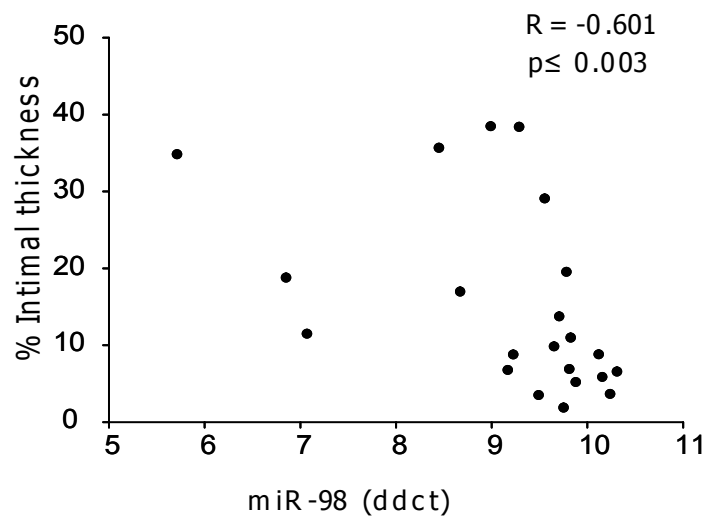
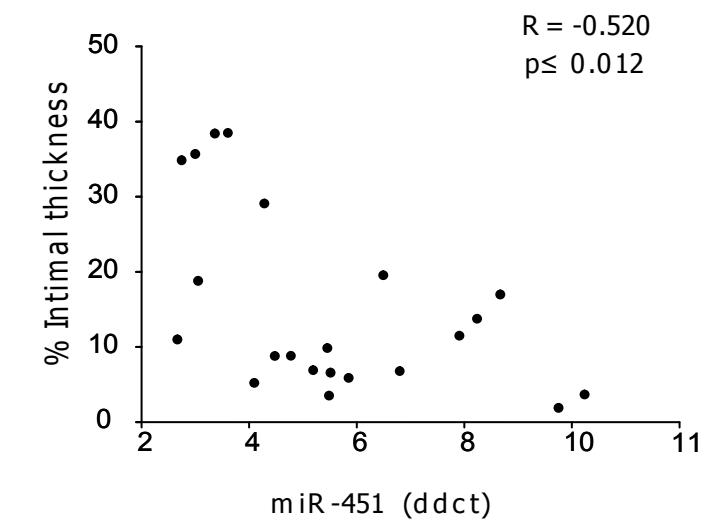
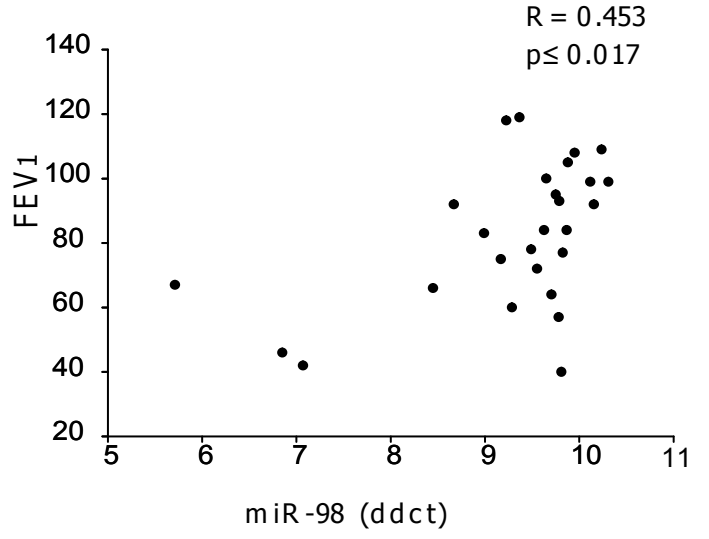
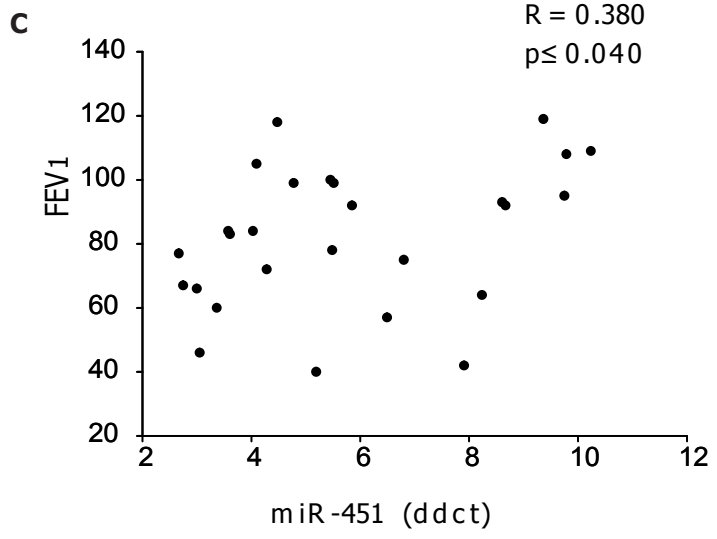
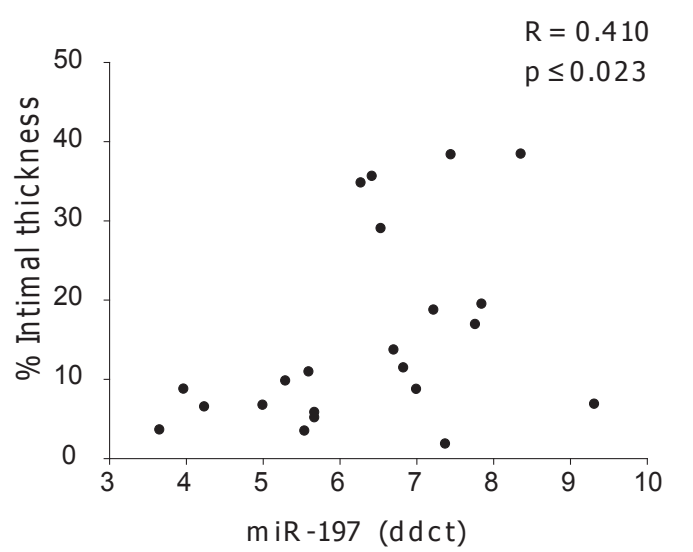
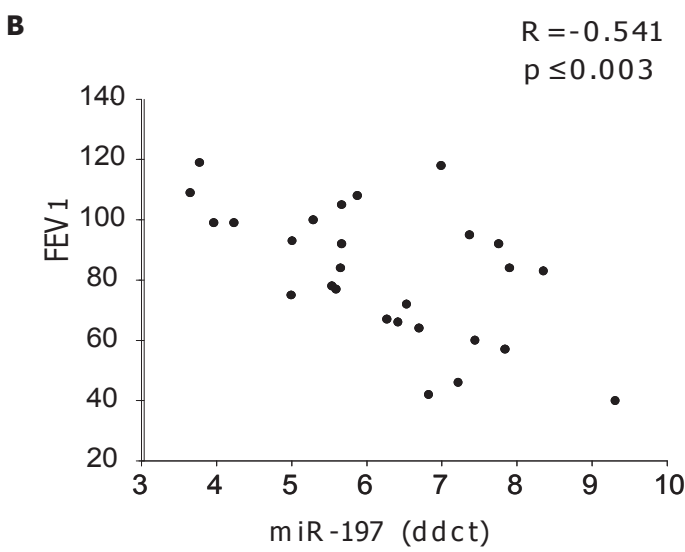
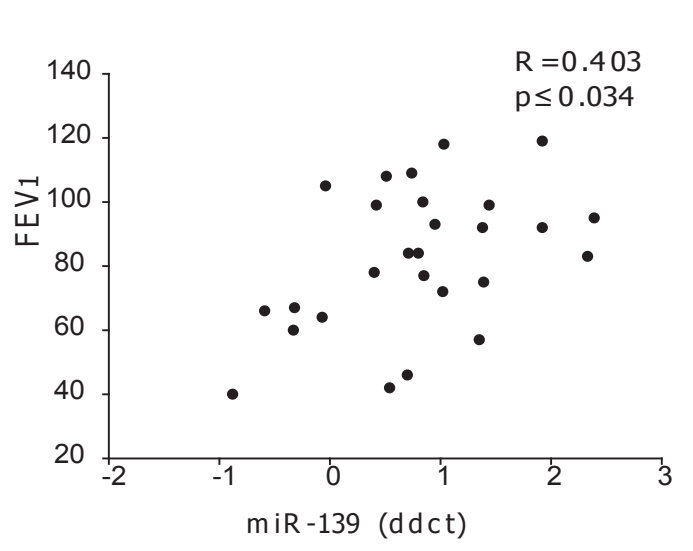
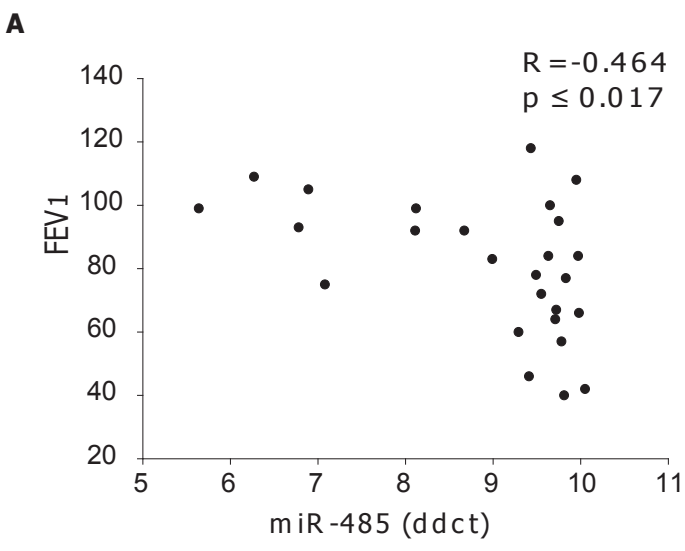


B

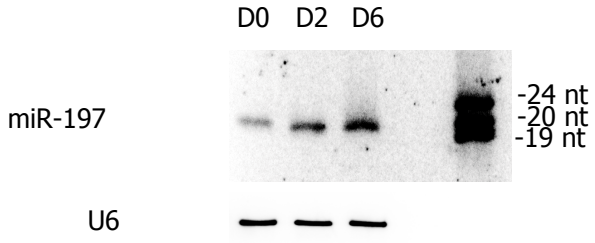
miRNA expression



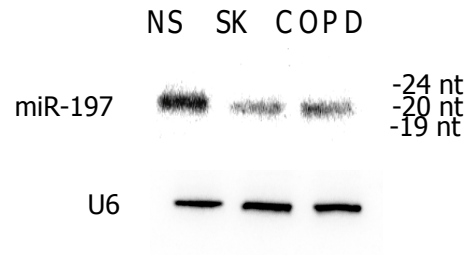


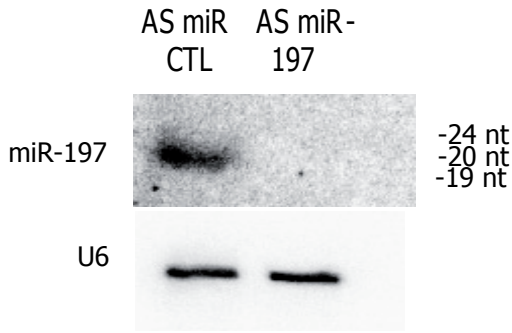
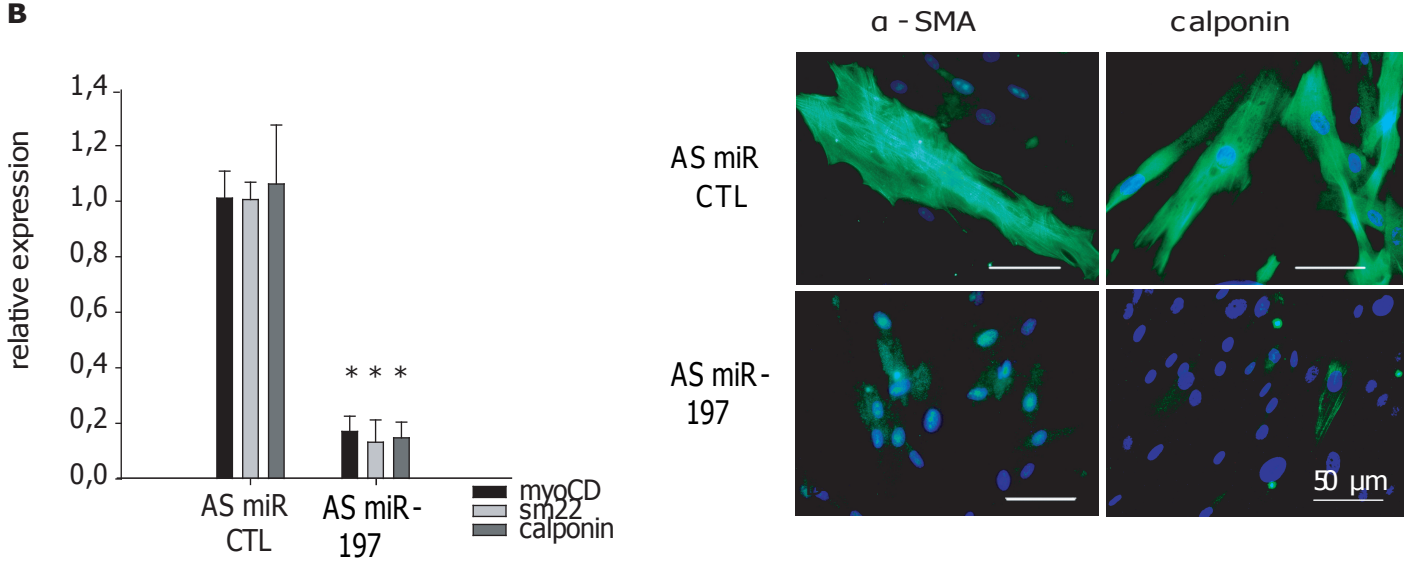
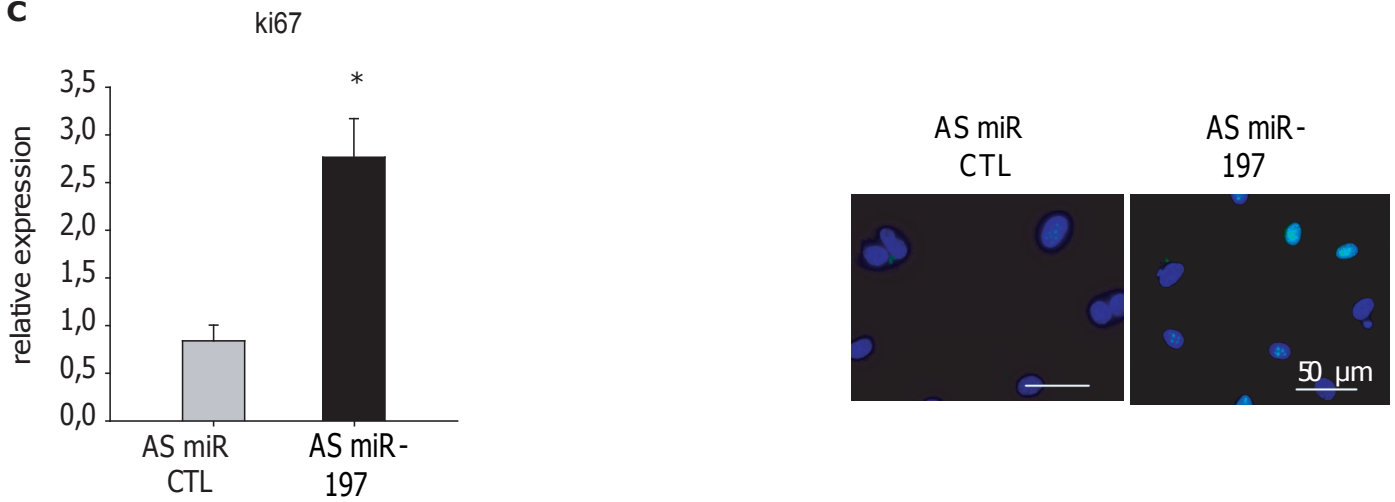
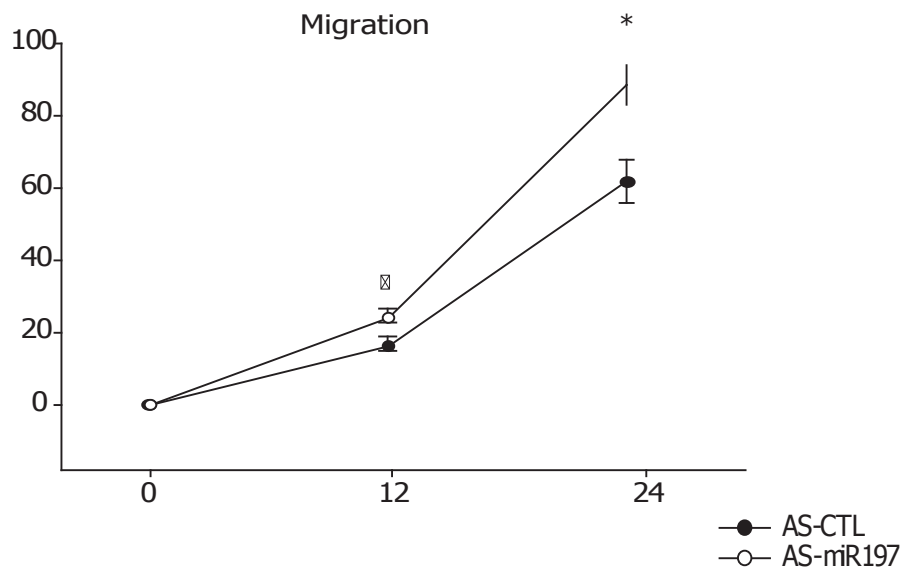


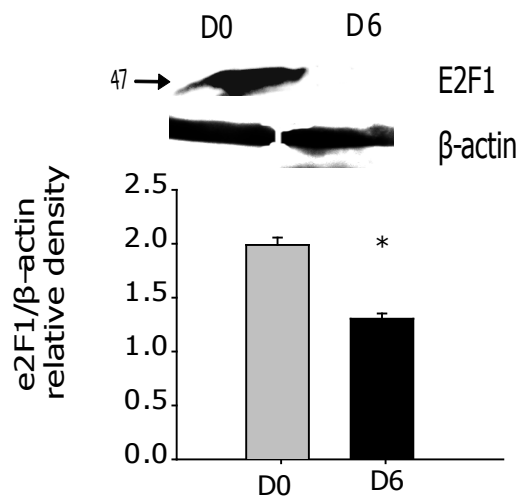
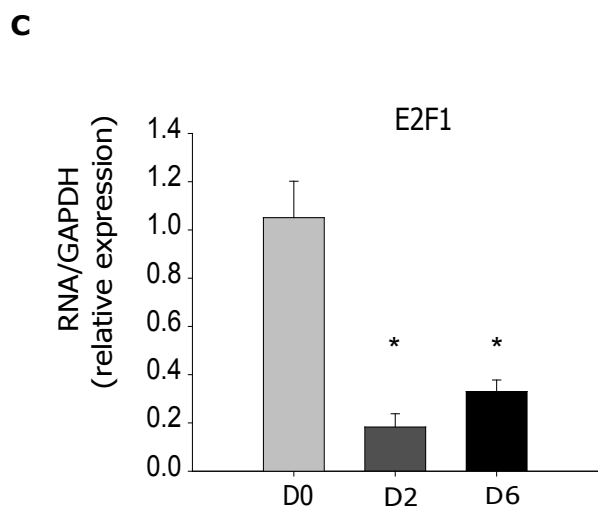
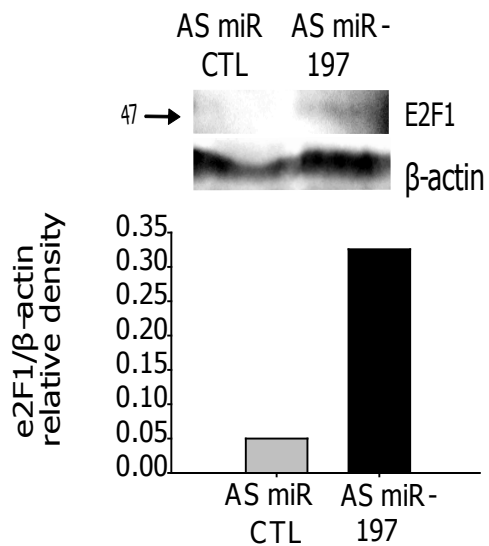
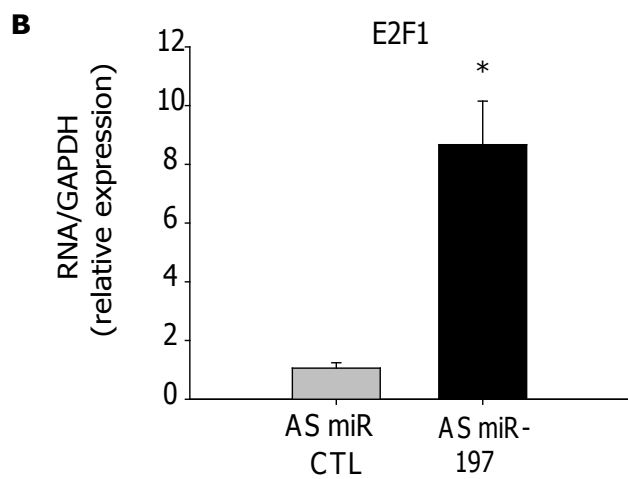
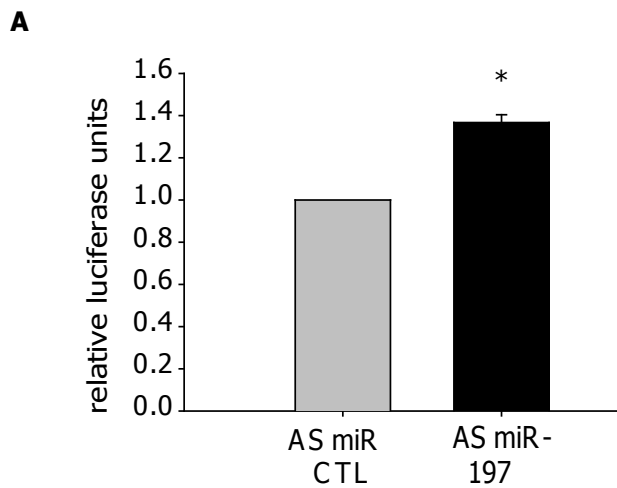
A



B



A**B****C****D**



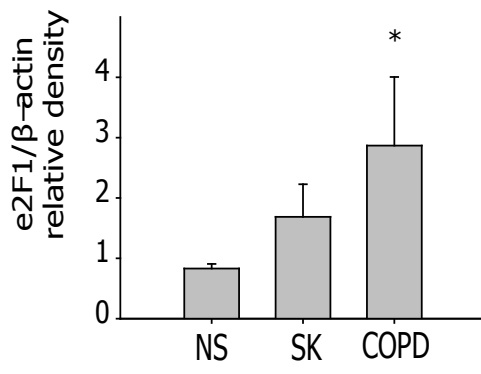
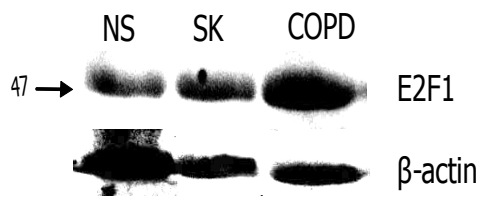


Figure Legends

Table 1. Characteristics of the patients enrolled in this study. * $p < 0.05$ NS vs COPD, † $p < 0.05$ S vs COPD and ‡ $p < 0.05$ NS vs SK. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SK, smokers; NS, non-smokers.

Table 2. miRNA expression in COPD patients. Table showing the miRNAs dysregulated in PA from COPD. Fold change of COPD patients respect to NS. In the table is included the expression of SK versus NS.

Figure 1. miRNA expression in COPD patients. Graphic depicting the fold change of the top 8 deregulated miRNAs. * $p < 0.05$. FC, fold change; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SK, smokers; NS, non-smokers.

Figure 2. A miRNA regulatory network in COPD. The yellow nodes represent miRNAs, and the blue nodes are miRNA targets. All the target genes have the annotation 'cell proliferation'.

Figure 3. Correlation analysis of miRNA expression with both FEV1 and intimal enlargement. **A**, Positive and negative correlation of miR-139 and miR-485 expression (ddCt) with FEV₁ respectively by Spearman analysis. **B**, Positive correlation between miR-197 expression (ddCt) and % intima respect to total area * $p < 0.05$ by Spearman analysis (left panel). Negative correlation between miR-197 expression (ddCt) and FEV₁ * $p < 0.05$ by Pearson (right panel). **B**, Positive correlation between miR-149 expression (ddCt) and % intima respect to total area * $p < 0.05$ by Spearman analysis

(left panel). Negative correlation between miR-149 expression (ddCt) and FEV1 *p< 0.05 by Pearson (right panel). **C**, Positive correlation between miR-451 expression (ddCt) and FEV1 *p< 0.05 by Pearson (upper left panel) and Negative correlation between miR-451 expression (ddCt) and % intima respect to total area *p< 0.05 by Spearman (bottom left panel). Positive correlation between miR-98 expression (ddCt) and FEV1 *p< 0.05 by Pearson (upper right panel) and Negative correlation between miR-98 expression (ddCt) and % intima respect to total area *p< 0.05 by Spearman (bottom right panel).

Figure 4. Analysis of miR-197 expression and SMC phenotypic change, and in SMC from patients. **A**, Representative Northern Blot showing an increase of miR-197 in differentiated (D6) as compared to proliferative (D0) SMC cells. **B**, Representative Northern Blot showing the downregulation of miR-197 in SMC derived from PA of SK and COPD patients. *p< 0.05 by paired-test

Figure 5. Inhibition of miR-197 abrogates SMC differentiation. **A**, Northern blot analysis of miR-197 after 48 hours of transfection with AS-miR-197 (antisense to miR-197) and a scrambled control (AS-miR-CT) in SMC. AS-miR-197 blunted the expression of miR-197 in SMC. **B**, Transfection of AS miR-197 induces a SMC phenotype switching as is shown by the concomitant decrease of the SMC markers myoCD, sm22-a, calponin analysed by real time PCR and by the decrease of actin and calponin fibers assessed by immunofluorescence. **C**, miR-197 inhibition promoted an increase in the expression of the marker of proliferation Ki67 at both RNA (left panel) and protein levels (right panel). **D**, Scratch analysis shows an increased migration

rate of SMC transfected with AS-miR-197 respect to the scrambled control correlating well with SMC dedifferentiation. * $p < 0.05$ by paired-test

Figure 6. The transcription factor E2F1 is a target of miR-197. **A**, Luciferase assay shows an increase in luciferase units after miR-197 inhibition corroborating that E2F1 is a miR-197 target. **B**, E2F1 expression decreases along SMC differentiation performed by PCR and western blot. **C**, miR-197 inhibition promotes the increase of E2F1 expression analysed by real time PCR (left panel) and Western Blot (right panel). * $p < 0.05$ by paired-test

Figure 7. The transcription factor E2F1 is increased in PA from COPD patients. E2F1 immunodetection in pulmonary arteries displays an increase in COPD patients as compared to controls. $p < 0.05$ by one way ANOVA.

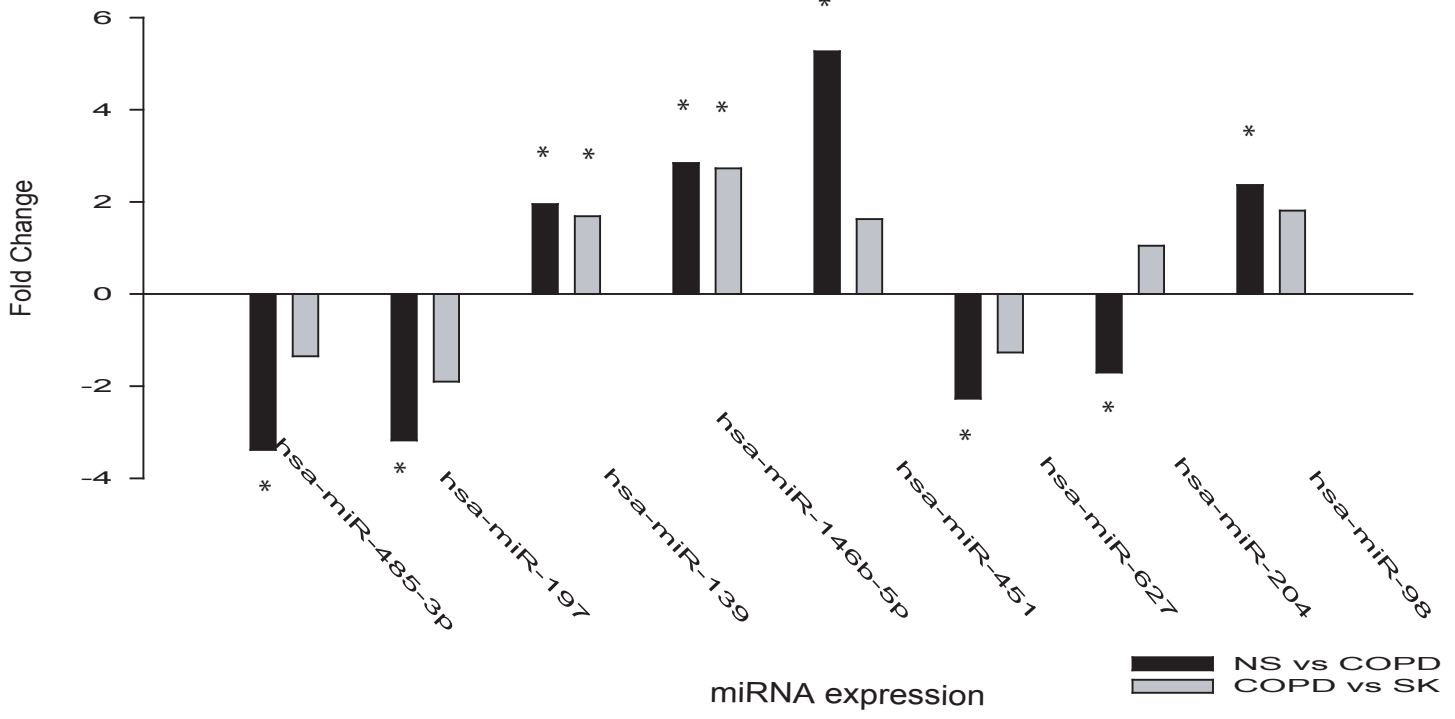
Table 1. Characteristics of the population.

	Non-Smokers (n=7)	Smokers (n=9)	COPD (n=12)
Age	63 ± 11	64 ± 10	67 ± 9
Male Gender, n (%)	4 (50)	8 (88) ‡	13 (100) *
Weight (kg)	64 ± 7	73 ± 8	70 ± 8
Height (cm)	161 ± 8	164 ± 8	169 ± 5
BMI	25 ± 3	28 ± 4	25 ± 2
FEV₁ (% predicted)	100 ± 6	90 ± 22	64 ± 13 *†
FVC (% predicted)	96 ± 7	93 ± 12	84 ± 13 *
FEV₁/FVC (% predicted)	77 ± 7	70 ± 15	55 ± 8 *†
Smoking history (pack/year)	5 ± 8	59 ± 27 ‡	77 ± 29 *
DL_{CO} (% predicted)	89 ± 20	75 ± 31	66 ± 11 *
PaO₂ (mmHg)	88 ± 15	81 ± 14	79 ± 16

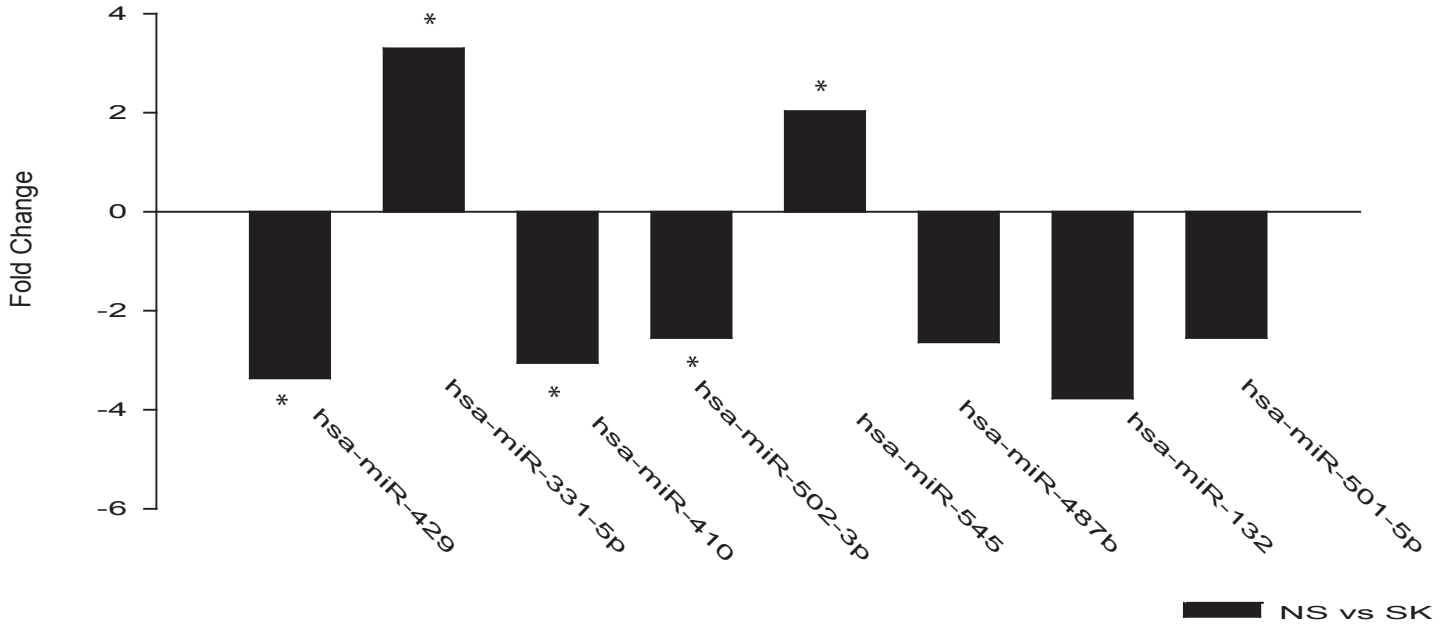
Table 2. miRNAs with altered expression in pulmonary arteries from patients

	COPD vs NS		COPD vs SK		SK vs NS	
	FC	p-Value	FC	p-Value	FC	p-Value
hsa-miR-485-3p	-3,38	0,0064	-1,35	0,2671	-2,50	0,0697
hsa-miR-197	-3,18	0,0117	-1,90	0,1095	-1,67	0,3271
hsa-miR-139-5p	1,95	0,0173	1,69	0,0353	2,06	0,0636
hsa-miR-146b-5p	2,84	0,0178	2,73	0,0015	1,51	0,2000
hsa-miR-451	5,27	0,0263	1,63	0,4802	3,24	0,1967
hsa-miR-627	-2,27	0,0382	-1,27	0,3910	-1,79	0,1946
hsa-miR-204	-1,70	0,0385	1,05	0,8668	-1,78	0,1376
hsa-miR-98	2,37	0,0413	1,81	0,0851	1,31	0,2600

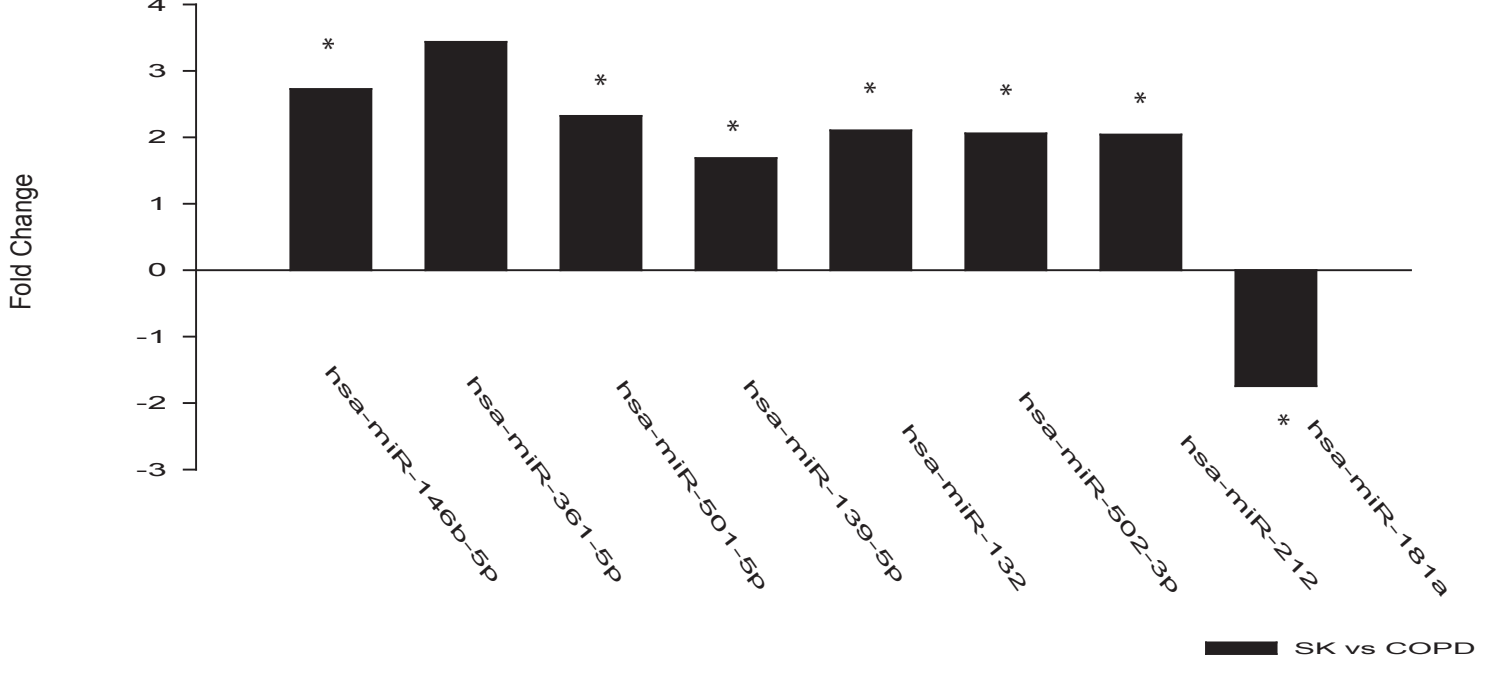
miRNA expression

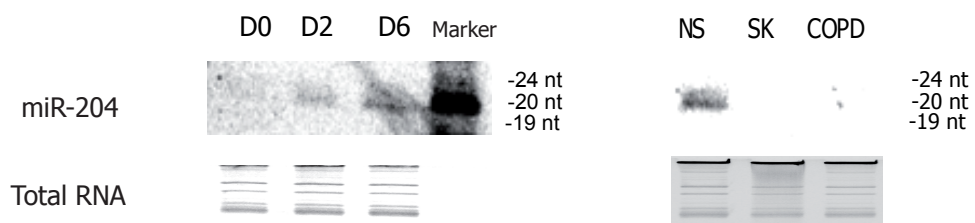


miRNA expression

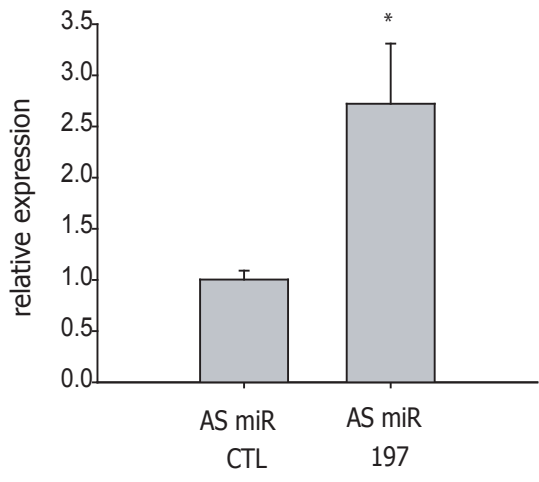


miRNA expression





IGF1



Targets	FC			p valor		
	NS vs S	NS vs COPD	S vs COPD	NS vs S	NS vs COPD	S vs COPD
hsa-let-7a-4373169	1,048	1,386	1,322	0,958	0,739	0,649
hsa-let-7c-4373167	1,035	1,254	1,211	0,951	0,737	0,699
hsa-let-7d-4395394	-1,136	1,059	1,204	0,811	0,918	0,596
hsa-let-7e-4395517	-1,161	1,087	1,262	0,783	0,890	0,494
hsa-let-7f-4373164	-1,348	1,037	1,398	0,657	0,958	0,280
hsa-let-7g-4395393	-1,181	1,007	1,189	0,670	0,986	0,447
hsa-miR-1-4395333	1,002	1,014	1,013	0,997	0,977	0,962
hsa-miR-9-4373285	-2,206	-1,740	1,268	0,100	0,253	0,531
hsa-miR-10a-4373153	-1,454	-1,155	1,259	0,474	0,779	0,564
hsa-miR-10b-4395329	1,181	1,027	-1,150	0,683	0,946	0,707
MammU6-4395470	-1,322	1,249	1,652	0,691	0,717	0,392
MammU6-4395470	8,820	4,170	-2,115	0,421	0,610	0,697
hsa-miR-15a-4373123	-1,006	2,651	2,666	0,995	0,260	0,119
hsa-miR-15b-4373122	-2,294	-1,632	1,405	0,241	0,371	0,594
hsa-miR-16-4373121	-1,156	-1,121	1,031	0,717	0,655	0,939
hsa-miR-17-4395419	-1,326	-1,121	1,183	0,562	0,800	0,561
hsa-miR-18a-4395533	-2,320	1,025	2,378	0,266	0,973	0,119
hsa-miR-18b-4395328	1,276	1,632	1,278	0,108	0,053	0,341
hsa-miR-19a-4373099	-1,746	-1,458	1,197	0,256	0,378	0,639
hsa-miR-19b-4373098	-1,322	-1,260	1,049	0,490	0,495	0,866
hsa-miR-20a-4373286	-1,185	-1,098	1,080	0,809	0,900	0,874
hsa-miR-20b-4373263	1,053	-1,622	-1,707	0,864	0,222	0,160
hsa-miR-21-4373090	1,481	1,912	1,291	0,663	0,491	0,672
hsa-miR-22-4373079	1,368	1,084	-1,263	0,564	0,880	0,578
hsa-miR-23a-4373074	-1,530	-1,498	1,021	0,568	0,586	0,884
hsa-miR-23b-4373073	1,209	1,450	1,199	0,854	0,735	0,812
hsa-miR-24-4373072	-1,488	-1,542	-1,036	0,364	0,151	0,934
hsa-miR-25-4373071	1,350	2,256	1,671	0,779	0,458	0,487
hsa-miR-26a-4395166	-1,422	-1,234	1,152	0,355	0,536	0,645
hsa-miR-26b-4395167	-1,213	-1,292	-1,065	0,701	0,636	0,861
hsa-miR-27a-4373287	-1,070	1,080	1,156	0,880	0,858	0,599
hsa-miR-27b-4373068	1,094	1,451	1,326	0,876	0,523	0,350
hsa-miR-28-3p-4395557	-1,129	-1,076	1,049	0,752	0,821	0,864
hsa-miR-28-5p-4373067	-1,239	1,066	1,321	0,591	0,868	0,310
MammU6-4395470	-1,157	1,102	1,275	0,826	0,878	0,608
MammU6-4395470	-1,303	-1,023	1,274	0,633	0,965	0,536
hsa-miR-29a-4395223	-1,103	-1,010	1,092	0,756	0,965	0,772
hsa-miR-29b-4373288	1,202	2,291	1,906	0,823	0,301	0,174
hsa-miR-29c-4395171	-1,424	-1,521	-1,068	0,493	0,301	0,905
hsa-miR-30b-4373290	-1,327	-1,056	1,256	0,555	0,903	0,433
hsa-miR-30c-4373060	-1,096	-1,066	1,028	0,800	0,849	0,933
hsa-miR-31-4395390	3,663	1,219	-3,004	0,148	0,802	0,170
hsa-miR-32-4395220	1,178	-1,104	-1,301	0,688	0,787	0,212
hsa-miR-33b-4395196	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

hsa-miR-34a-4395168	-1,079	1,663	1,794	0,919	0,356	0,339
hsa-miR-34c-5p-4373036	1,086	-1,079	-1,171	0,779	0,774	0,313
hsa-miR-92a-4395169	-1,120	1,035	1,160	0,831	0,950	0,594
hsa-miR-93-4373302	-1,218	-1,024	1,189	0,632	0,950	0,529
hsa-miR-95-4373011	-2,196	-1,763	1,245	0,172	0,104	0,682
hsa-miR-96-4373372	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-98-4373009	1,306	2,365	1,810	0,083	0,011	0,070
hsa-miR-99a-4373008	1,308	-1,008	-1,318	0,788	0,993	0,710
hsa-miR-99b-4373007	-1,450	-1,094	1,326	0,443	0,842	0,380
hsa-miR-100-4373160	-1,130	-1,251	-1,107	0,784	0,644	0,753
hsa-miR-101-4395364	-1,011	1,024	1,035	0,985	0,969	0,931
hsa-miR-103-4373158	-1,106	1,196	1,323	0,817	0,670	0,357
hsa-miR-105-4395278	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-106a-4395280	-1,260	-1,084	1,163	0,628	0,859	0,607
RNU44-4373384	1,049	1,336	1,274	0,893	0,439	0,465
hsa-miR-106b-4373155	-1,277	-1,039	1,229	0,499	0,909	0,429
hsa-miR-107-4373154	-1,008	1,154	1,164	0,986	0,751	0,665
hsa-miR-122-4395356	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-124-4373295	1,500	1,224	-1,226	0,103	0,038	0,377
hsa-miR-125a-3p-4395310	1,954	-1,022	-1,997	0,426	0,979	0,258
hsa-miR-125a-5p-4395309	-1,616	-1,486	1,087	0,185	0,159	0,799
hsa-miR-125b-4373148	-1,274	-1,270	1,003	0,637	0,664	0,991
hsa-miR-126-4395339	1,030	-1,013	-1,043	0,956	0,979	0,935
hsa-miR-127-3p-4373147	-1,676	-1,405	1,193	0,539	0,662	0,816
hsa-miR-127-5p-4395340	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-128-4395327	-1,811	-1,044	1,735	0,511	0,963	0,285
hsa-miR-129-3p-4373297	1,349	1,005	-1,343	0,488	0,989	0,380
hsa-miR-129-5p-4373171	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-130a-4373145	1,209	1,799	1,489	0,838	0,545	0,567
hsa-miR-130b-4373144	1,661	1,250	-1,329	0,502	0,763	0,598
hsa-miR-132-4373143	-3,778	-1,793	2,107	0,134	0,468	0,055
hsa-miR-133a-4395357	-1,127	-1,036	1,088	0,782	0,924	0,847
hsa-miR-133b-4395358	1,216	1,120	-1,085	0,672	0,792	0,848
hsa-miR-134-4373299	-1,420	-1,794	-1,263	0,450	0,343	0,624
hsa-miR-135a-4373140	1,123	1,262	1,124	0,580	0,338	0,576
hsa-miR-135b-4395372	1,655	1,681	1,015	0,453	0,425	0,981
hsa-miR-136-4373173	1,093	-1,036	-1,133	0,734	0,879	0,382
hsa-miR-137-4373301	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-138-4395395	-1,775	-1,488	1,193	0,502	0,469	0,806
hsa-miR-139-3p-4395424	2,059	2,038	-1,010	0,035	0,015	0,978
hsa-miR-139-5p-4395400	1,154	1,953	1,691	0,580	0,013	0,042
hsa-miR-140-3p-4395345	-1,252	-1,144	1,095	0,611	0,719	0,854
hsa-miR-140-5p-4373374	-1,037	-1,122	-1,082	0,947	0,815	0,849
hsa-miR-141-4373137	2,033	1,360	-1,495	0,305	0,610	0,454
hsa-miR-142-3p-4373136	1,860	2,621	1,409	0,286	0,124	0,409
hsa-miR-142-5p-4395359	1,612	1,140	-1,414	0,185	0,610	0,275
hsa-miR-143-4395360	1,132	1,086	-1,043	0,762	0,826	0,893

hsa-miR-145-4395389	-1,200	-1,091	1,100	0,645	0,816	0,747
hsa-miR-146a-4373132	-1,292	1,106	1,428	0,421	0,699	0,234
hsa-miR-146b-3p-4395472	1,510	1,422	-1,062	0,110	0,048	0,825
hsa-miR-146b-5p-4373178	1,041	2,842	2,731	0,922	0,014	0,021
hsa-miR-147b-4395373	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-148a-4373130	-1,423	-1,070	1,331	0,447	0,884	0,478
hsa-miR-148b-4373129	1,662	1,663	1,001	0,497	0,497	0,999
hsa-miR-149-4395366	-1,276	-2,411	-1,889	0,498	0,036	0,138
hsa-miR-150-4373127	1,061	1,284	1,210	0,903	0,502	0,670
hsa-miR-152-4395170	-1,576	-1,568	1,005	0,223	0,123	0,988
hsa-miR-153-4373305	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-154-4373270	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-181a-4373117	1,597	-1,091	-1,743	0,205	0,787	0,064
hsa-miR-181c-4373115	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-182-4395445	1,610	1,170	-1,376	0,055	0,206	0,151
RNU48-4373383	-1,575	1,032	1,626	0,248	0,925	0,183
hsa-miR-183-4395380	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-184-4373113	-2,689	-1,090	2,466	0,226	0,915	0,105
hsa-miR-185-4395382	2,879	2,383	-1,208	0,238	0,334	0,636
hsa-miR-186-4395396	-1,469	-1,431	1,027	0,278	0,116	0,937
hsa-miR-187-4373307	1,600	1,542	-1,037	0,422	0,415	0,944
hsa-miR-188-3p-4395217	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-190-4373110	-2,733	-1,161	2,355	0,227	0,855	0,114
hsa-miR-191-4395410	-1,073	1,136	1,218	0,763	0,558	0,303
hsa-miR-192-4373108	-1,517	1,207	1,831	0,625	0,774	0,373
hsa-miR-193a-3p-4395361	1,083	-1,036	-1,121	0,819	0,907	0,772
hsa-miR-193a-5p-4395392	3,870	1,964	-1,971	0,266	0,580	0,283
hsa-miR-193b-4395478	-1,248	-1,226	1,019	0,533	0,324	0,960
hsa-miR-194-4373106	1,285	1,002	-1,282	0,662	0,997	0,538
hsa-miR-195-4373105	-1,588	-1,357	1,170	0,273	0,401	0,682
hsa-miR-196b-4395326	-1,626	1,297	2,109	0,332	0,565	0,164
hsa-miR-197-4373102	-1,673	-3,180	-1,901	0,348	0,033	0,144
hsa-miR-198-4395384	1,427	1,224	-1,165	0,121	0,038	0,469
hsa-miR-199a-5p-4373272	2,780	2,929	1,054	0,118	0,105	0,912
hsa-miR-199a-3p-4395415	-1,657	-1,539	1,077	0,223	0,278	0,792
hsa-miR-199b-5p-4373100	-1,075	1,108	1,191	0,804	0,737	0,371
hsa-miR-200a-4378069	1,992	-1,389	-2,768	0,389	0,663	0,099
hsa-miR-200b-4395362	1,275	1,018	-1,252	0,630	0,971	0,502
hsa-miR-200c-4395411	2,604	1,375	-1,894	0,123	0,630	0,287
hsa-miR-202-4395474	1,618	1,224	-1,322	0,083	0,038	0,280
hsa-miR-203-4373095	-1,586	-1,951	-1,230	0,618	0,465	0,689
hsa-miR-204-4373094	-1,783	-1,704	1,047	0,097	0,034	0,884
hsa-miR-205-4373093	1,730	1,822	1,053	0,045	0,020	0,870
hsa-miR-208b-4395401	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-210-4373089	-1,378	-1,439	-1,045	0,586	0,357	0,941
hsa-miR-214-4395417	-1,204	-1,065	1,130	0,601	0,842	0,709
hsa-miR-215-4373084	1,276	1,295	1,015	0,108	0,019	0,918

hsa-miR-216a-4395331	-2,617	-1,122	2,332	0,095	0,833	0,059
hsa-miR-216b-4395437	1,276	1,382	1,083	0,108	0,041	0,654
hsa-miR-217-4395448	1,176	1,407	1,197	0,694	0,437	0,539
hsa-miR-218-4373081	-1,256	-1,128	1,113	0,521	0,619	0,725
hsa-miR-219-5p-4373080	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-221-4373077	1,311	1,625	1,239	0,796	0,643	0,764
hsa-miR-222-4395387	-1,565	-1,539	1,017	0,207	0,225	0,954
hsa-miR-223-4395406	1,250	1,441	1,153	0,620	0,316	0,770
hsa-miR-224-4395210	-1,671	1,343	2,243	0,406	0,611	0,151
hsa-miR-296-3p-4395212	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-296-5p-4373066	1,186	1,138	-1,043	0,266	0,208	0,755
hsa-miR-299-3p-4373189	1,276	1,522	1,192	0,108	0,090	0,491
hsa-miR-299-5p-4373188	1,068	1,025	-1,043	0,758	0,894	0,755
hsa-miR-301a-4373064	-1,840	-1,522	1,209	0,347	0,445	0,732
hsa-miR-301b-4395503	1,080	1,044	-1,035	0,831	0,902	0,855
hsa-miR-302a-4378070	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
ath-miR159a-4373390	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-302b-4378071	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-302c-4378072	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-320-4395388	-1,141	-1,100	1,037	0,615	0,606	0,891
hsa-miR-323-3p-4395338	-2,010	-1,874	1,073	0,302	0,342	0,858
hsa-miR-324-3p-4395272	-1,141	-1,112	1,026	0,689	0,718	0,935
hsa-miR-324-5p-4373052	-3,147	-3,049	1,032	0,504	0,516	0,955
hsa-miR-326-4373050	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-328-4373049	1,127	-1,361	-1,534	0,712	0,446	0,195
hsa-miR-329-4373191	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-330-3p-4373047	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-330-5p-4395341	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-331-3p-4373046	-1,279	-1,827	-1,429	0,627	0,168	0,494
hsa-miR-331-5p-4395344	3,297	1,805	-1,827	0,005	0,090	0,136
hsa-miR-335-4373045	-1,876	-1,225	1,531	0,299	0,721	0,337
hsa-miR-337-5p-4395267	-1,035	-1,795	-1,734	0,961	0,375	0,301
hsa-miR-338-3p-4395363	-1,217	-1,096	1,110	0,710	0,851	0,765
hsa-miR-339-3p-4395295	1,067	-1,570	-1,675	0,910	0,428	0,329
hsa-miR-339-5p-4395368	-1,127	-1,337	-1,187	0,850	0,637	0,674
hsa-miR-340-4395369	-1,303	-1,322	-1,015	0,479	0,435	0,966
hsa-miR-155-4395459	-1,212	-1,130	1,073	0,599	0,692	0,846
hsa-let-7b-4395446	1,219	1,444	1,184	0,809	0,701	0,832
hsa-miR-342-3p-4395371	-1,361	-1,203	1,131	0,445	0,575	0,766
hsa-miR-342-5p-4395258	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-345-4395297	-1,717	-1,113	1,543	0,245	0,674	0,320
hsa-miR-361-5p-4373035	-2,406	1,425	3,428	0,180	0,586	0,024
hsa-miR-362-3p-4395228	-1,454	1,102	1,603	0,536	0,872	0,308
hsa-miR-362-5p-4378092	-1,161	-1,455	-1,253	0,813	0,548	0,647
hsa-miR-363-4378090	-1,046	1,076	1,125	0,884	0,824	0,587
hsa-miR-365-4373194	-1,390	-1,201	1,157	0,538	0,721	0,645
hsa-miR-367-4373034	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

hsa-miR-369-3p-4373032	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-369-5p-4373195	-1,346	-1,738	-1,292	0,608	0,324	0,293
hsa-miR-370-4395386	-2,203	-1,683	1,309	0,350	0,540	0,644
hsa-miR-371-3p-4395235	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-372-4373029	-1,251	-1,293	-1,034	0,591	0,524	0,895
hsa-miR-373-4378073	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-374a-4373028	-1,305	-1,378	-1,056	0,443	0,424	0,866
hsa-miR-374b-4381045	-1,369	-1,412	-1,031	0,405	0,237	0,933
hsa-miR-375-4373027	1,009	1,247	1,236	0,991	0,776	0,728
hsa-miR-376a-4373026	-1,648	-1,293	1,275	0,379	0,625	0,589
hsa-miR-376b-4373196	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-377-4373025	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-379-4373349	-2,478	-1,391	1,782	0,335	0,714	0,375
hsa-miR-380-4373022	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-381-4373020	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-382-4373019	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-383-4373018	1,754	-1,114	-1,954	0,272	0,726	0,130
hsa-miR-409-5p-4395442	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-410-4378093	-3,049	-2,488	1,226	0,029	0,091	0,655
hsa-miR-411-4381013	-3,321	-1,802	1,843	0,082	0,223	0,290
hsa-miR-422a-4395408	-1,419	-1,094	1,297	0,446	0,841	0,539
hsa-miR-423-5p-4395451	-1,250	-1,215	1,029	0,747	0,787	0,960
hsa-miR-424-4373201	1,124	1,079	-1,043	0,500	0,568	0,755
hsa-miR-425-4380926	1,168	1,396	1,195	0,810	0,495	0,737
hsa-miR-429-4373203	-3,358	-1,721	1,951	0,007	0,240	0,153
hsa-miR-431-4395173	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-433-4373205	2,373	1,082	-2,194	0,289	0,916	0,194
hsa-miR-449a-4373207	1,159	-1,380	-1,600	0,871	0,729	0,335
hsa-miR-449b-4381011	1,165	1,139	-1,023	0,754	0,778	0,945
hsa-miR-450a-4395414	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-450b-3p-4395319	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-450b-5p-4395318	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-451-4373360	3,238	5,267	1,626	0,229	0,063	0,526
hsa-miR-452-4395440	-1,150	1,169	1,344	0,827	0,758	0,607
hsa-miR-453-4395429	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-454-4395434	-1,298	-1,258	1,032	0,419	0,483	0,916
hsa-miR-455-3p-4395355	-1,522	1,471	2,240	0,650	0,680	0,183
hsa-miR-455-5p-4378098	-1,323	-1,249	1,060	0,587	0,656	0,896
hsa-miR-483-5p-4395449	1,488	1,471	-1,012	0,330	0,326	0,975
hsa-miR-484-4381032	-1,305	-1,467	-1,124	0,612	0,379	0,803
hsa-miR-485-3p-4378095	-2,501	-3,380	-1,352	0,136	0,057	0,301
hsa-miR-485-5p-4373212	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-486-3p-4395204	-1,457	-1,827	-1,254	0,565	0,305	0,739
hsa-miR-486-5p-4378096	1,534	-1,064	-1,632	0,267	0,869	0,210
hsa-miR-487a-4378097	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-487b-4378102	-2,635	-2,738	-1,039	0,049	0,040	0,936
hsa-miR-488-4395468	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

hsa-miR-489-4395469	-1,485	-1,197	1,240	0,217	0,508	0,312
hsa-miR-490-3p-4373215	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-491-3p-4395471	1,376	1,224	-1,124	0,047	0,038	0,403
hsa-miR-491-5p-4381053	-1,615	-1,859	-1,151	0,400	0,148	0,801
hsa-miR-493-4395475	-1,375	1,017	1,399	0,602	0,977	0,480
hsa-miR-494-4395476	-1,424	-1,105	1,289	0,666	0,905	0,683
hsa-miR-495-4381078	-3,005	-3,137	-1,044	0,194	0,187	0,926
hsa-miR-496-4386771	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-499-3p-4395538	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-499-5p-4381047	1,276	2,082	1,632	0,108	0,055	0,195
hsa-miR-500-4395539	-1,843	1,488	2,743	0,414	0,580	0,064
hsa-miR-501-3p-4395546	1,062	1,019	-1,043	0,764	0,911	0,755
hsa-miR-501-5p-4373226	-2,550	-1,098	2,322	0,076	0,839	0,039
hsa-miR-502-3p-4395194	-2,549	-1,239	2,057	0,072	0,666	0,036
hsa-miR-502-5p-4373227	1,632	2,154	1,319	0,332	0,151	0,574
hsa-miR-503-4373228	1,042	-1,207	-1,258	0,925	0,632	0,298
hsa-miR-504-4395195	1,177	1,218	1,034	0,840	0,792	0,959
hsa-miR-505-4395200	1,769	1,224	-1,446	0,077	0,038	0,224
hsa-miR-507-4373232	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-508-3p-4373233	-1,868	-1,821	1,026	0,587	0,604	0,933
hsa-miR-508-5p-4395203	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-509-5p-4395346	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-510-4395352	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-512-3p-4381034	-2,160	-2,252	-1,043	0,318	0,292	0,755
hsa-miR-512-5p-4373238	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-513-5p-4395201	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-515-3p-4395480	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-515-5p-4373242	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-516a-5p-4395527	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-516b-4395172	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-517a-4395513	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-517c-4373264	1,201	1,190	-1,010	0,219	0,085	0,945
hsa-miR-518a-3p-4395508	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-518a-5p-4395507	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-518b-4373246	1,149	1,133	-1,014	0,600	0,615	0,939
hsa-miR-518c-4395512	-3,271	-3,410	-1,043	0,454	0,439	0,755
hsa-miR-518d-3p-4373248	1,276	1,827	1,432	0,108	0,143	0,382
hsa-miR-518d-5p-4395500	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-518e-4395506	-1,019	-1,062	-1,043	0,949	0,821	0,755
hsa-miR-518f-4395499	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-519a-4395526	1,285	1,224	-1,050	0,092	0,038	0,707
hsa-miR-519d-4395514	1,471	1,329	-1,107	0,096	0,012	0,638
hsa-miR-519e-4395481	-1,121	-1,169	-1,043	0,787	0,705	0,755
hsa-miR-520a-3p-4373268	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520a-5p-4378085	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520d-5p-4395504	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520g-4373257	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

hsa-miR-521-4373259	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-522-4395524	-1,099	1,288	1,415	0,793	0,517	0,144
hsa-miR-523-4395497	-1,058	-1,103	-1,043	0,861	0,747	0,755
hsa-miR-524-5p-4395174	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-525-3p-4395496	1,044	1,053	1,009	0,854	0,806	0,948
hsa-miR-525-5p-4378088	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-526b-4395493	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-532-3p-4395466	-1,315	1,149	1,510	0,384	0,612	0,082
hsa-miR-532-5p-4380928	-1,588	1,014	1,610	0,543	0,982	0,385
hsa-miR-539-4378103	1,075	-1,249	-1,343	0,936	0,805	0,657
hsa-miR-541-4395312	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-542-3p-4378101	1,276	1,344	1,053	0,108	0,024	0,742
hsa-miR-542-5p-4395351	-8,522	-6,855	1,243	0,385	0,433	0,441
hsa-miR-544-4395376	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-545-4395378	2,029	1,660	-1,222	0,025	0,111	0,549
hsa-miR-548a-3p-4380948	1,276	2,829	2,217	0,108	0,250	0,375
hsa-miR-548a-5p-4395523	2,813	1,224	-2,298	0,216	0,038	0,310
hsa-miR-548b-3p-4380951	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-548b-5p-4395519	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-548c-3p-4380993	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-548c-5p-4395540	-1,069	-1,115	-1,043	0,840	0,731	0,755
hsa-miR-548d-3p-4381008	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-548d-5p-4395348	1,289	1,224	-1,053	0,091	0,038	0,694
hsa-miR-551b-4380945	-3,749	-3,908	-1,043	0,449	0,435	0,755
hsa-miR-556-3p-4395456	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-556-5p-4395455	-5,350	-4,663	1,147	0,417	0,454	0,536
hsa-miR-561-4380938	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-570-4395458	1,486	1,224	-1,214	0,026	0,038	0,214
hsa-miR-574-3p-4395460	-1,636	-1,252	1,307	0,162	0,382	0,392
hsa-miR-576-3p-4395462	-1,135	1,178	1,337	0,742	0,697	0,249
hsa-miR-576-5p-4395461	1,553	1,299	-1,196	0,037	0,014	0,344
hsa-miR-579-4395509	-1,135	1,029	1,168	0,742	0,944	0,477
hsa-miR-582-3p-4395510	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-582-5p-4395175	1,238	1,012	-1,224	0,565	0,969	0,427
hsa-miR-589-4395520	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-590-5p-4395176	-1,264	-1,101	1,148	0,611	0,801	0,727
hsa-miR-597-4380960	-1,152	1,047	1,207	0,788	0,935	0,569
hsa-miR-598-4395179	1,220	1,020	-1,196	0,821	0,983	0,779
hsa-miR-615-3p-4386777	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-615-5p-4395464	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-616-4395525	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-618-4380996	1,276	1,271	-1,004	0,108	0,022	0,978
hsa-miR-624-4395541	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-625-4395542	-1,018	1,048	1,067	0,945	0,856	0,706
hsa-miR-627-4380967	-1,789	-2,272	-1,270	0,257	0,113	0,416
hsa-miR-628-5p-4395544	-1,261	-1,362	-1,081	0,389	0,116	0,796
hsa-miR-629-4395547	1,512	1,224	-1,235	0,066	0,038	0,303

hsa-miR-636-4395199	-2,731	-2,625	1,040	0,108	0,119	0,922
hsa-miR-642-4380995	1,276	1,533	1,201	0,108	0,068	0,450
hsa-miR-651-4381007	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-652-4395463	-2,128	-1,959	1,086	0,071	0,113	0,859
hsa-miR-653-4395403	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-654-3p-4395350	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-654-5p-4381014	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-655-4381015	1,194	1,255	1,051	0,483	0,383	0,854
hsa-miR-660-4380925	-1,277	-1,205	1,060	0,568	0,565	0,878
hsa-miR-671-3p-4395433	-1,218	1,464	1,783	0,811	0,645	0,336
hsa-miR-672-4395438	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-674-4395193	4,275	1,224	-3,493	0,274	0,038	0,341
hsa-miR-708-4395452	-1,758	1,002	1,762	0,409	0,996	0,340
hsa-miR-744-4395435	-1,676	-1,483	1,130	0,173	0,197	0,741
hsa-miR-758-4395180	-1,749	-1,824	-1,043	0,334	0,297	0,755
hsa-miR-871-4395465	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-872-4395375	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-873-4395467	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-874-4395379	1,843	1,938	1,051	0,101	0,253	0,929
hsa-miR-875-3p-4395315	-1,723	-1,796	-1,043	0,545	0,513	0,755
hsa-miR-876-3p-4395336	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-876-5p-4395316	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-885-3p-4395483	-5,463	-5,695	-1,043	0,414	0,403	0,755
hsa-miR-885-5p-4395407	1,024	-1,172	-1,200	0,972	0,814	0,745
hsa-miR-886-3p-4395305	-1,130	-1,186	-1,049	0,842	0,668	0,937
hsa-miR-886-5p-4395304	1,084	-1,119	-1,212	0,836	0,747	0,550
hsa-miR-887-4395485	1,784	1,643	-1,086	0,373	0,434	0,878
hsa-miR-888-4395323	1,276	1,258	-1,015	0,108	0,023	0,913
hsa-miR-889-4395313	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-890-4395320	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-891a-4395302	-1,073	1,001	1,075	0,854	0,997	0,688
hsa-miR-891b-4395321	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-892a-4395306	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-147-4373131	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-208-4373091	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-211-4373088	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-212-4373087	-1,826	1,117	2,041	0,536	0,907	0,046
hsa-miR-219-1-3p-4395206	1,276	1,406	1,101	0,108	0,055	0,619
hsa-miR-219-2-3p-4395501	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-220-4373078	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-220b-4395317	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-220c-4395322	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-298-4395301	3,901	1,224	-3,187	0,248	0,038	0,320
hsa-miR-325-4373051	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-346-4373038	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-376c-4395233	-1,990	-1,424	1,397	0,155	0,367	0,430
hsa-miR-384-4373017	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

hsa-miR-412-4373199	1,957	1,224	-1,599	0,152	0,038	0,299
hsa-miR-448-4373206	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-492-4373217	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-506-4373231	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-509-3-5p-4395266	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-511-4373236	-1,909	1,366	2,607	0,366	0,538	0,202
hsa-miR-517b-4373244	1,060	1,017	-1,043	0,790	0,930	0,755
hsa-miR-519c-3p-4373251	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520b-4373252	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520e-4373255	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755
hsa-miR-520f-4373256	1,276	1,224	-1,043	0,108	0,038	0,755

Online Figure Legends

Table E1. miRNA expression obtained from Taqman Low Density Array (TLDA, Apply Biosystems) after *Limma* Analysis. FC, fold change; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SK, smokers; NS, non-smokers.

Figure E1. Graphic representation of miRNA expression changes between patients.

Figure E2. Expression of miR-204 in SMC during differentiation (D0, D2 and D6) and in pulmonary artery-SMC from patients. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; SK, smokers; NS, non-smokers.

Figure E3. Expression of IGF1 analysed by real time PCR in AS-miR-197 and scrambled transfected cells. * $p < 0.05$ by paired-test.

Noncoding RNAs in smooth muscle cell homeostasis: implications in phenotypic switch and vascular disorders

N. Coll-Bonfill¹ · B. de la Cruz-Thea² · M. V. Pisano² · M. M. Musri²

Received: 22 January 2016 / Accepted: 4 April 2016 / Published online: 25 April 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Vascular smooth muscle cells (SMC) are a highly specialized cell type that exhibit extraordinary plasticity in adult animals in response to a number of environmental cues. Upon vascular injury, SMC undergo phenotypic switch from a contractile-differentiated to a proliferative/migratory-dedifferentiated phenotype. This process plays a major role in vascular lesion formation and during the development of vascular remodeling. Vascular remodeling comprises the accumulation of dedifferentiated SMC in the intima of arteries and is central to a number of vascular diseases such as arteriosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease or pulmonary hypertension. Therefore, it is critical to understand the molecular mechanisms that govern SMC phenotype. In the last decade, a number of new classes of noncoding RNAs have been described. These molecules have emerged as key factors controlling tissue homeostasis during physiological and pathological conditions. In this review, we will discuss the role of noncoding RNAs, including microRNAs and long noncoding RNAs, in the regulation of SMC plasticity.

Abbreviations

SMC	smooth muscle cells
EC	endothelial cells
ncRNAs	noncoding RNAs
miRNAs	microRNAs
lncRNAs	long noncoding RNAs
SRF	serum response factor
SRE	serum response element
MYCD	myocardin
MRTF	myocardin-related transcription factor
TGF β	transforming growth factor β
PDGF	platelet-derived growth factor
SBE	Smad-binding elements
bHLH	basic helix-loop-helix
KLF	Krüppel-like zinc finger
NAT	natural antisense ncRNA
ceRNA	competing endogenous RNAs
SENCR	smooth muscle and endothelial cell enriched migration/differentiation-associated
SNP	single nucleotide polymorphism

Keywords Smooth muscle cells · Phenotypic change · Noncoding RNAs · miRNAs · lncRNAs

This article is published as part of the Special Issue on S.I. Micro RNA.

✉ M. M. Musri
mmusri@immf.uncor.edu

¹ Department of Pulmonary Medicine Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

² Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Friuli 2434, 5016 Córdoba, Argentina

Introduction

Vascular smooth muscle cells (SMC) are a highly specialized cell type present within the medial region of arteries and arterioles. SMC express a repertoire of proteins that are important for contractility, ion channels and signaling cascades that allow them to regulate systemic and local pressure through the modulation of the vascular tone. In contrast to other terminally differentiated cells, SMC maintain high phenotypic plasticity throughout adulthood. In normal physiological conditions, these cells stay quiescent. However, under different environmental conditions, SMC are able to re-enter cell cycle and undergo phenotypic switch from a differentiated/contractile

phenotype to a dedifferentiated/proliferative phenotype [142, 144]. Dedifferentiated cells are characterized by high rates of migration and proliferation, increased expression of the extracellular matrix proteins (ECM) and low expression of contractile proteins. By contrast, contractile or differentiated SMC exhibit low levels of proliferation and migration and express a set of specific markers such as cytoskeleton and contractile proteins, which comprise smooth muscle actin- α (α -SMA), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), calponin, caldesmon and sm22- α [143]. When repairing vascular injury and after several rounds of unchecked proliferation, this dedifferentiated SMC participate in the intimal thickening and medial stiffening observed in vascular diseases like arteriosclerosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) or pulmonary arterial hypertension (PAH) [71, 139, 144]. A recent report from Owens and colleagues, using cell-tracing system, shows that more than 80 % of SMC in the vascular lesion undergo phenotypic switch contributing to the intimal hyperplasia seen in vascular pathologies [158]. For this reason, much effort has been focused on identifying molecules that regulate both global SMC differentiation and specific SMC gene expression. Several observations have demonstrated that a complex network of both protein and noncoding RNAs governs the phenotypic switch process [4, 41, 98, 132, 143]. However, despite the importance of SMC changes during vascular diseases, the molecular mechanisms controlling them are not yet fully understood, in part due to the versatile characteristics of these cells. In this review, we briefly summarize the current understanding of the molecular regulation of SMC differentiation and phenotypic switch during physiological and pathological remodeling with special focus on recent discoveries concerning the contribution of the noncoding genome to this process.

Regulation of SMC phenotypic switch by transcription factors

Figure 1 summarizes the main signaling cascades and transcription factors that maintain SMC phenotypic states. The study of SMC transcriptional regulation has been difficult due to the high variation of SMC marker expression across different tissues and the fact that SMC derive from multiple precursors throughout the embryo [98]. Contrary to the skeletal muscle, in which myoD is the master regulator of its differentiation, to date, there is no comparable transcription factor governing SMC differentiation. The role of the C-Fos serum response element-binding transcription factor (SRF) in SMC homeostasis has been demonstrated by the ability of dominant negative mutants of SRF to prevent differentiation [118, 123]. SRF regulates most SMC differentiation marker genes by binding as an homodimer to the highly conserved CARG cis-element (CC(A/T)₆GG) or serum response element (SRE) present within nearly all of the SMC-specific promoters

[133]. Most of the SMC genes contain two or more CARG boxes, which act cooperatively to promote transcription [180, 181]. However, SRF cannot be considered a master regulator because it is an ubiquitously expressed protein that also regulates cardiac and skeletal muscle-specific gene expression, as well as the expression of a number of early response and structural genes across different cell types [163]. How SRF is able to regulate specific genes in precise environments is not yet fully understood. SRF activity is regulated by its association to different transcription factors, such as NkX and GATA family members and cofactors, predominantly myocardin (MYCD) and myocardin-related transcription factors A and B (MRTF-A and MRTF-B) [133]. Additionally, posttranscriptional modifications of SRF, variation of SRF-binding affinity among different CARG boxes as well as number, position and spacing of CARG boxes are now recognized as the main mechanisms regulating SRF activity [98]. MYCD, identified in 2001 by Olson and collaborators, form a ternary complex with SRF and acts as a transcriptional co-activator of almost all SMC-specific promoters including calponin, caldesmon, SM-MHC, α -SMA, sm22- α and specific cell-cycle-associated genes such as p21 [180]. Forced expression of MYCD in a skeletal muscle-related cell line is sufficient for the induction of the majority of SMC markers [116] but not to initiate the complete differentiation programme in multipotent stem cells [201]. MYCD is induced by angiotensin II, L-type voltage-gated Ca² channels/Ras homology gene family A (RhoA) and transforming growth factor β (TGF β) and inhibited by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) [152, 179, 199] (Fig. 1). This indicates that MYCD regulates changes in SMC contractile mass in response to functional demands. MYCD activity is subjected to regulation through multiple mechanisms, including alternative splice variants, and binding to regulatory proteins [74, 79]. For example, activity of MYCD is inhibited by the inflammatory-related factor NF κ B [167] and the insulin-like growth factor-1/AKT-dependent phosphorylation of the transcription factor forkhead O4 (FoxO4) inducing its translocation from the nucleus, therefore reducing SMC marker genes [114]. MYCD can be phosphorylated by glycogen synthase kinase-3- β and extracellular signal-regulated kinase (ERK), resulting in decreased differentiation marker expression [6, 168]. A decreased expression of MYCD has been observed in several models of vascular injury, and its re-expression prevents the neointima formation in murine carotid arteries after injury [1, 166]. SRF/MRTF complexes also bind to consensus CARG elements within the promoters of contractile and SMC-specific target genes like α -SMA and sm22- α [175, 180, 181, 202]. RhoA-dependent actin polymerization has been shown to be required for nuclear localization of MRTF-A and for SMC-specific gene expression [120]. RhoA activity is mainly mediated by angiotensin II, sphingosine-1-phosphate, TGF β , calcium, BMP2 and cell tension [73].

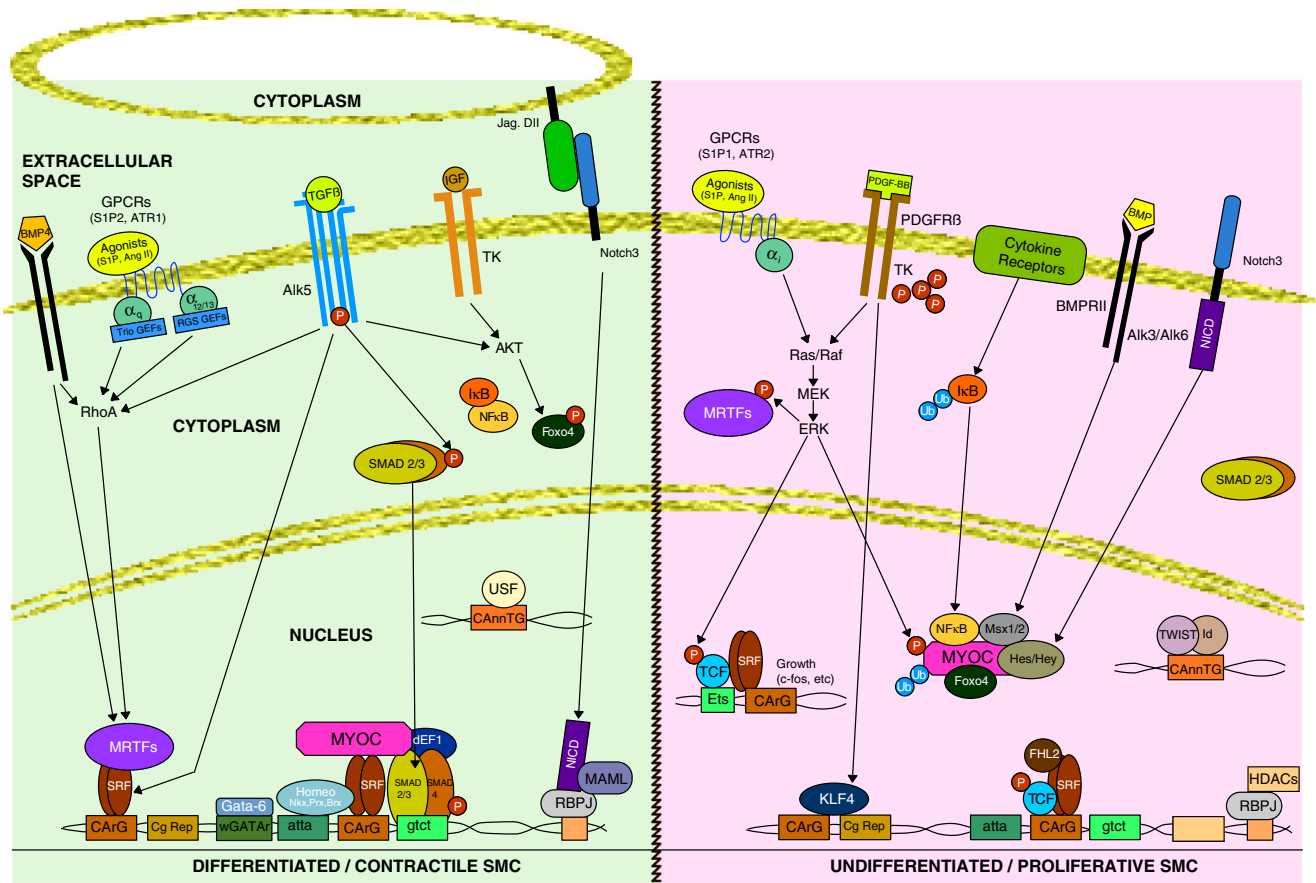


Fig. 1 Signaling pathways controlling SMC phenotypic switch. In the *right panel*, the differentiated/contractile SMC state is displayed, and in the *left panel*, the proliferative/dedifferentiated SMC phenotype. *SRF* serum response factor, *MYOC* myocardin, *MRTF* myocardin-related transcription factor, *RBPJ* recombination signal binding protein for immunoglobulin Kappa J, *NICD* Notch intercellular domain, *TGFβ* transforming growth factor β, *IGF* insulin growth factor, *TK* tyrosin kinase, *P* phosphorylation, *Jag* Jagged, *DII* delta-like II, *NFκB* nuclear

factor kappa B, *IκB* inhibitor of kappa B protein, *AngII* angiotensin II, *ATRI/2* angiotensin receptor 1 and 2, *PDGF-BB* platelet-derived growth factor-BB, *PDGFRβ* platelet derived growth factor receptor β, *KLF4* Krüppel-like factor 4, *BMP* bone morphogenic protein, *HDAC* histone deacetylase, *TCF* ternary complex factor, *Ub* ubiquitin, *SP1* sphingosine-1-phosphate, *Id* inhibitor of DNA binding/differentiation proteins [7, 31, 33, 55, 56, 81, 87, 88, 91, 92, 103, 105, 107, 108, 110, 111, 112, 129, 134, 150, 153, 154, 177, 182, 183, 186, 195, 196, 206, 210]

TGFβ signals through the type II TGFβ receptor and the type I receptor ALK5. ALK5 activation results in the recruitment and phosphorylation of Smads 2 and 3 that complex with Smad4. The complex translocates to the nucleus and stimulates gene expression [126]. TGFβ control element (TCE; G(A/C)GT(T/G)GG(T/G)GA) has been found in several promoters of SMC genes, and its deletion in the sm22-α promoter blocks gene expression [66]. In concordance, TGFβ1 stimulates the expression of SMC genes and enhances SRF binding to CARG boxes [75] (Fig. 1), and several SMC genes contain functional Smad-binding elements (SBE) that are convergence points of TGFβ1 or myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding sites [44]. The related TGFβ family member bone morphogenetic 4 (BMP4) also promotes SMC contractile genes through MRTF [99].

Notch plays an important role in SMC homeostasis and vascular development [57]. In mammals, there are four transmembrane Notch receptors (1 to 4), being Notch 3 the most

strongly expressed in SMC. The transmembrane ligands for Notch are Jagged 1 and 2 and delta-like 1, 3 and 5. Recombination signal-binding protein for immunoglobulin kappa J region (RBPJ) interacts with Notch intercellular domain (NICD), which is released upon Notch activation and stimulates SMC contractile genes [23] (Fig. 1). NICD-RBPJ target genes include α-SMA [140], SM-MHC [46] and microRNA 143/145 [18]. In the absence of NICD, RBPJ represses targets by recruiting histone deacetylases (HDACs). A number of studies have reported that NICD blocks SMC differentiation in part by regulating HEP/HEY family, which inhibits SMC marker gene through SRF/MYOC-dependent pathway [136, 149].

The GATA zinc transcription factors interact with the DNA regulatory elements with a consensus sequence A/T GATA A/G (WGATAR). The GATA-4, -5 and -6 are essential for cardiovascular system and endoderm-derived tissues [48], but only GATA-6 is expressed in the medial SMC of the

vasculature [135] and regulates SMC phenotype in vivo promoting the expression of SM-MHC, α -SMA and calponin [124]. In addition, GATA-6 regulates SMC proliferation by directly controlling cell cycle [148]. Preventing GATA-6 downregulation after vascular injury inhibits intimal hyperplasia [124]. These data demonstrate that the effects of both Notch and GATA signaling are cell-context dependent.

Many SM-specific promoters including SM-MHC [188], sm22- α [141] and α -SMA [159] contain enhancer-box (E-box)-binding sites (CAnnTG motifs). This element binds to homo- or heterodimers of basic helix-loop-helix (bHLH) proteins and to the snail family of transcription factors. Upstream stimulatory factor (USF) binds to two E-boxes present in the α -SMA promoter and activates its expression [85]. Overexpression of class I bHLH such as E2-2, E12 and HEB stimulates α -SMA, while the inhibitory bHLH proteins Id and Twist decreases α -SMA and sm22- α [151, 197]. The bHLH Msx1 and Msx2 as well as HERP1/HEY2 directly interact with MYCD and inhibit SMC marker genes [46, 67].

SMC phenotypic switching is also determined by factors that suppress SMC gene expression [144]. Although the factors mediating injury-induced phenotypic switching in vivo have not been clearly defined, PDGF-BB seems to play an important role. PDGFR β triggers the Ras/Raf/MEK/ERK cascade leading to the SRF-dependent upregulation of early response growth genes as well as the phosphorylation of several SMC genes, including MYCD and MRTFs [187]. Furthermore, PDGF-BB induces suppression of SMC marker genes after vascular injury [9, 28] by promoting the expression of the Krüppel-like zinc finger family 4 (KLF4) or KLF5 [42, 125] (Fig. 1). KLF4 is normally absent in differentiated SMC in vivo but is rapidly induced in neointima after vascular injury [112, 158, 200] and promotes SMC phenotypic modulation by repressing multiple SMC marker genes like MYCD and sm22- α , as well as a group of genes that regulate pro-inflammatory responses [112, 158].

Noncoding RNAs

In the last years, great advances in transcriptome sequencing and analysis have allowed the identification of many types of noncoding RNAs (ncRNAs) molecules. Interestingly, around 98 % of all RNA transcripts do not possess protein-coding capabilities [45, 64]. It is now clear that many (if not all) of them regulate individual steps of gene expression including transcription, RNA processing and translation [24]. In addition, ncRNAs are able to guide DNA synthesis or genome rearrangement among other functions [24] constituting the most versatile molecules that participate in the regulation of the genome. Broadly, ncRNAs can be classified according to their size. Small ncRNAs are conformed by less than 200 nucleotides (nt) while long ncRNAs (lncRNAs) are longer than

200 nt and can range up to tens or even hundreds of thousands of nucleotides in length [162].

Small noncoding RNAs

The most prominent small ncRNAs are the “housekeeping” ncRNAs that are represented by ribosomal RNA (rRNA) and transfer (tRNA), which are required for protein translation [53, 137]. Small nuclear RNAs (snRNAs) are essential for mRNA splicing [14], small nucleolar RNAs (snoRNAs) for RNA modification [94] and YRNAs appear to be implicated in chromosome replication and cell proliferation [95]. Recently, much attention has arisen in a class of ncRNAs that posttranscriptionally regulates protein-coding genes. These include microRNAs (miRNAs), endogenous small interfering RNAs (endo-siRNAs) and PIWI-interacting RNAs (piRNAs), which interact with the RNA interference machinery [58]. Very little is known about small RNAs in vascular SMC homeostasis. The most studied small RNAs during SMC phenotype alterations are the miRNAs, which will be summarized here.

miRNAs are well-conserved 21-nt single-stranded RNA molecules. The miRNAs biosynthesis is initiated by the transcription of a long transcript by RNA polymerase II, which give rise to a primary miRNA capped and poly-adenylated [93]. In a sequential double step process, the RNA III enzymes Drosha and Dicer cleave the miRNA precursor, giving rise to a mature miRNA or guide strand and a passenger strand, which is removed by cellular nucleases [10]. The mature miRNA is incorporated into the RNA-induced silencing complex (RISC) where it binds to a member of the Argonaute (Ago) protein family and guides RISC to partially complementary target sites on mRNAs [47]. After the recruitment of downstream factors, the target mRNA is translational repressed and/or degraded by exonucleases [128]. miRNA gene regulation has been implicated in a number of cellular processes. They are expressed in a stage- or tissue-specific fashion and modulate cell differentiation, proliferation and apoptosis [51]. Consistent with their essential role in cellular functions, homozygous deletion of Dicer in mouse results in lethality at embryonic day 8.5 [15].

The microRNAs in SMC homeostasis and phenotypic switch Direct evidence of the importance of miRNAs mediating SMC differentiation in vivo is derived from conditional knockout mice studies. Defective blood vessel formation and loss of pluripotent cells have been observed in Dicer-knockout (KO) mice [13, 198]. Vascular SMC-specific deficiency of Dicer also induced defective blood vessel formation causing late embryonic lethality at E16–17 [3, 145]. Specifically, loss of Dicer in vascular SMC during development induced dilated, thin-walled blood vessels, as a consequence of the reduction in the proliferation state. The arteries of these mice exhibit

impaired contractility most likely due to a decreased expression of SMC contractile genes [3]. In accordance, conditional deletion of Dicer in adult mice shows a marked reduction in systemic blood pressure and an increase in vascular remodeling [2]. This phenotype shares a lot of similarities with the SMC-associated miR-143/145 cluster-deficient mice [16, 49]. However, the SMC-Dicer KO mice present a more complex and severe phenotype, indicating that additional miRNAs are involved in the regulation of postnatal SMC differentiation. miR-143 and miR-145 have been shown to be enriched in SMC progenitor cells during development [16, 36] and play a key role in SMC differentiation by targeting KLF4 and KLF5, with the subsequent increase of MYCD [32, 36]. In addition, miR-145 controls the establishment of key ion channels necessary for a proper contractile phenotype [173]. miRNA-143 and miR-145 are transcribed as a bicistronic transcript from a common promoter [49] that contains different binding sites for transcription factors involved in SMC differentiation, such as CARG [36, 194], Smad response element [117] and RBPJ [18]. Indeed, the SRF cofactors MYCD and MRTF-A/B activate the miR-143/145 *in vivo* and *in vitro* [36, 194]. Several studies associate the reduction of miR-143/145 with the decrease in SMC contractile markers, SMC phenotypic modulation and neointima formation [32, 36]. In contrast, increased levels of miR-145 have been described in PAH, both in cultured SMC from patients and in animal models. In this study, the authors show that adenoviral-mediated reduction of miR-145 attenuated the progression of the disease [22]. On the other hand, *in vivo* and *in vitro* ectopic expression of miR-145 reduces neointimal hyperplasia after injury [32, 49, 119] and partially rescues the SMC contractile gene reduction generated by the loss of Dicer, respectively [3]. Interestingly, TGF β stimulates the transfer of miR-143/145 from SMC to endothelial cells (EC) through tunnelling nanotubes modulating the angiogenesis response through the decrease of both EC proliferation and tubulogenesis [34]. Analogously, laminar shear stress induces miR-143/145 expression in a KLF2-dependent fashion. These miRNAs are then transported through exosomes from EC to SMC conferring an SMC atheroprotective phenotype [70]. These data demonstrates that there is an exchange of miRNAs, and possibly other RNA products, from one vascular cell to another in response to cellular cues. These messengers trigger programmes of gene expression, locally or distantly, in order to modulate vascular homeostasis.

The miR-10a has been reported to mediate retinoic acid-induced SMC differentiation from ES cells by targeting the histone deacetylase HDAC4 [76]. The miR-1 and miR-133 family is another group that participates in SMC differentiation. Specifically, miR-1 is induced by MYCD and blocks contractile SMC expression impairing cytoskeletal organization of human aortic SMC *in vitro* [84]. In addition, miR-1 blocks proliferation by targeting Pim1 [29]. There is also

evidence that miR-1 directs the differentiation of embryonic stem cells into SMC-like cells by targeting KLF4 [193] and miR-1 knockout mice show aberrant SMC differentiation [68]. These different outcomes in the action of miR-1 during SMC differentiation showed that the effects of specific miRNAs is cell-context dependent. There are two miR-1 genes located in different chromosomes both of which are stimulated by MYCD in a conserved SRF-CARG boxes-dependent fashion mostly in cardiac and skeletal muscle [208]. Both miR-1 genes are co-transcribed with homologous miR-133a genes. Similar to the response observed with miR-1, the suppression of miR-133a resulted in aberrant expression of SMC markers during heart development [109]. Later studies demonstrated a correlation between miR-133a levels and the differentiation state of vascular SMC. miR-133a targets the transcription factor SP1 [171], a well-known repressor of SM-MHC [121]. Accordingly, miR-133a overexpression experiments resulted in the upregulation of SM-MHC and the decrease of other SMC genes such as calponin and α -SMA, demonstrating that miR-133a does not fully direct SMC differentiation [171]. Further studies showed that neointimal formation can be attenuated with the overexpression of miR-133a, which blocks SMC proliferation and migration, whereas miR-133a inhibition exacerbates this condition [171]. Other miRNAs stimulated by MYCD, miR-24 and miR-29a, have shown to regulate cell proliferation and migration through regulating PDGFR β levels indirectly and directly, respectively [166]. Another well-known target of miR-24 is the Tribbles-like protein 3 [26]. In response to PDGF-BB, miR-24 increases, promoting the downregulation of Tribbles-like protein 3, which in turn induces the Smurf1-mediated decrease of Smad1 and the consequent switch to a SMC proliferative phenotype [26, 27]. The miR-29b is also associated with the inhibition of SMC proliferation and migration, but its target is yet to be described [20]. Quantification analyses have determined that the level of miR-29b is much lower than miR-29a and miR-29c in SMC, highlighting differences in miRNA processing between family members [20]. In this study, aldosterone is described as a direct factor controlling the expression of the mature miR-29b, but not of the other mature miRNAs [20]. miR-24 is transcribed together with miR-23b and miR-27b [54]; therefore, they are likely to have related functions in SMC homeostasis. As expected, miR-23b inhibits SMC proliferation and migration and promotes SMC markers *in vitro* and neointimal hyperplasia in a model of balloon-injured arteries *in vivo*. miR-23b directly targets FoxO4 [78].

miR-34a is also associated with SMC differentiation of both mouse and human embryonic stem cells by activating SIRT1, which activates SMC genes in a CARG-dependent fashion [203]. How miR-34a activates SIRT1 needs further studies. The activation of target genes by miRNAs was also reported for miR-145, which directly binds and activates

MYCD [36]. More recently, miR-34a has been shown to inhibit proliferation and migration by regulating Notch 1 protein expression [30]. Overexpression of miR-34a resulted in inhibition of neointima formation in wire-injury femoral arteries [30].

Another important miRNA in determining the SMC fate after vascular injury and neointima formation is the miR-21, which has been shown to be upregulated in balloon injury and to be pro-proliferative and anti-apoptotic in SMC [83]. In vivo, miR-21 inhibition reduces the neointimal response through the de-repression of PTEN [83]. In contrast, Davis and collaborators demonstrated that miR-21 stimulates SMC contractile proteins by targeting PDCD4 [39]. In this study, the authors showed that BMP4 or TGF β 1-Smad signal transducers are recruited to the pri-miR-21 (*primary* miRNA) in association with a member of the DROSHA microprocessor complex promoting its processing into pre-miR-21 (*precursor* miRNA) and the consequent increase of the mature sequence during SMC differentiation [39]. In a recent study, genetic ablation of the miR-21 stem loop attenuated neointimal formation in mice post-stenting probably via the enhancement of the anti-inflammatory M2 macrophage levels together with an impaired sensitivity to vascular responses of SMC [127].

The miR-221/222 cluster was shown to be induced by growth factors and to mediate SMC proliferation in vitro and in vivo, targeting key negative growth regulators [40, 111]. The miR-146a stimulates SMC proliferation via KLF4, which in turn regulates the expression of this miRNA [164]. Gain-of-function and loss-of-function experiments showed that miR-146a regulates SMC proliferation in vitro. Transfection of an antisense oligonucleotide against miR-146a into the balloon injury rat carotid arteries attenuates neointimal hyperplasia [164]. Another miRNA that regulates SMC proliferation is miR-130a. This gene targets MEOX1, a growth arrest-related gene [192].

miR-26a promotes SMC proliferation and attenuates serum starvation-induced SMC differentiation. The authors identified Smad1 and Smad4 as direct targets of miR-26a [100].

Courboulin et al. found that miR-204 was downregulated in PAH in humans and in rat models of PAH. Decreased miR-204 stimulates SHP2 expression and activates the STAT pathway contributing to SMC proliferation and pulmonary vessel wall thickening [37].

miR-155 has been shown to regulate genes required for differentiation of stem cells into smooth muscle cells, since exogenous overexpression of miR-155 inhibits expression of SM-MHC and abrogates SMC differentiation [38, 209].

miR-663 is associated with SMC marker expression, and the transcription factor JunB was identified as a target of this miRNA [104]. Transduction of an adenovirus anti-miR-663 partially suppresses the neointimal response to injury [104]. The hsa-miR-424 or its ortholog in rat miR-322 (miR-424/

322) was found to inhibit SMC proliferation by targeting cyclin D1, while miR-424/322 overexpression in vivo protected against restenosis [131].

Table 1 summarizes the miRNAs genes implicated in the regulation of SMC plasticity and their validated targets.

Long noncoding RNAs

Currently, the faster growing area of noncoding RNAs research is the study of lncRNAs. The ENCODE project, together with the improvement of bioinformatics analysis and the new powerful RNA sequencing technologies, has revealed pervasive transcription of the majority of the human genome [35, 64]. The use of RNA capture followed of tiling arrays to target and sequence selected portions of the transcriptome has detected additional transcripts that are rare or transiently expressed [130]. lncRNAs are transcribed by RNA polymerase II, undergo 5' capping and splicing, can be or not polyadenylated and, in general, are not well conserved across species [155]. In general, although the expression of these transcripts is very low, they exert important and different regulatory roles in a wide range of biological processes in health and disease [165, 174]. However, the number of lncRNAs with functional characterization is limited and the majority of the new annotated transcripts are derived from fibroblasts. Considering that specific transcripts or even alternative species of the same gene are expressed specifically in different cell types [130], the description and functional characterization of those transcripts in specific cells and states are necessary to better understand their function. The strongest support of lncRNAs as biologically relevant molecules that regulate in vivo functions comes from knockout studies in mice [157].

Classification of lncRNAs species has been difficult due to the high heterogeneity in their biogenesis, structure and function [162]. Based on the genomic position relative to other genes, they can be divided in several sub-classes including intronic ncRNA, circular RNA (cirRNAs), sense ncRNA, natural antisense ncRNA (NAT), chromatin-interlinking RNA (ciRNA) and others. Based on their association with other DNA elements of known function, they are classified into enhancer-associated RNA (eRNA), promoter-associated long RNA (PALR), upstream antisense RNA (uaRNA) and others (for a review, see Hangauer et al. [162]).

The current challenge in the study of lncRNAs is the elucidation of their mechanisms of action. These molecules exhibit unpredictable and diverse functions. They are able to influence gene expression in different manners, being able to stimulate or repress transcription, translation and signaling as well as to influence the structure and function of chromosomes [17, 24, 155, 190]. The problem with the understanding of lncRNA function is that there are not known features that correlate lncRNA sequence with specific function. The description of a novel RNA motif (AGCCC plus A/T at -8 and

Table 1 Different known miRNAs and their functions in SMC homeostasis

miRNA	Target	Functions	References
1	Pim1	(-) SMC proliferation	Chen et al. [29]
1	Unknown	(-) SMC contractility	Jiang et al. [84]
1	Klf4	(+) SMC differentiation in ES cells	Xie et al. [193]
10a	Hdac4	(+) SMC differentiation in ES cells	Huang et al. [76]
15b/16	Yap	(+) SMC differentiation	Xu et al. [195]
21	Pcd4	(+) SMC differentiation	Davis et al. [39]
21	Pten	(-) SMC differentiation/(+) neointima	Lin et al. [108]; Ji et al. [83]
21	Pten	(+) SMC proliferation	Green et al. [56]; Liu et al. [113]
21	Dock	(+) SMC proliferation	Kang et al. [87]
22	Mecp2	(+) SMC differentiation	Zhao et al. [206]
23b	Foxo4	(-) SMC proliferation/(-) migration	Iaconetti et al. [78]
24	Chi311	(-) SMC inflammation/(-) SMC differentiation	Maegdefessel et al. [122]
24	Trb3	(-) SMC proliferation	Chan et al. [26]
24	Pdgfrb	(-) SMC migration	Talasila et al. [166]
26a	Smad1	(+) SMC proliferation/(-) SMC differentiation	Leeper et al. [100]
26a	Smad4	(-) SMC apoptosis	Leeper et al. [100]
26a	Pdgfrb	(-) SMC migration	Talasila et al. [166]
29a/29c	Cav1	(+) insuline resistance/alterations in lipid metabolism	Chen et al. [31]
29b	Unknown	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration/(-) apoptosis necrosis ratio	Bretschneider et al. [20]
30a	Ca(v)1.2	(-) Vascular tone	Rhee et al. [154]
30b/30c	Runx2	(-) SMC calcification	Balderman et al. [7]
31	Lats2	(+) SMC proliferation	Liu et al. [110]
31	Creg	(-) SMC differentiation	Wang et al. [183]
34a	Sirt1	(+) SMC differentiation	Yu et al. [203]
34a	Notch1	(-) SMC proliferation	Chen et al. [111]
96	Trb3	(-) SMC differentiation	Kim et al. [92]
124	Nfatc1	(-) SMC proliferation/(+) SMC differentiation	Kang et al. [88]
125b	Suv39h1	(+) SMC inflammation	Villeneuve et al. [177]
126	FoxO3/Bcl2/Irs1	(+) SMC proliferation/(+) neointima	Zhou et al. [210]
130a	Meox1	(+) SMC proliferation	Wu et al. [192]
132	Lrrfp1	(-) SMC proliferation/(-) neointima	Choe et al. [33]
133a	Sp1	(-) SMC proliferation/(-) SMC migration	Torella et al. [171]
138	Mst1	(-) SMC apoptosis	Li et al. [105]
138	Sirt1	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration	Xu et al. [196]
143/145	Klf4/Elk1/Camk2d	(-) SMC proliferation/(+) SMC differentiation	Cordes et al. [87]
143/145	Klf5	(+) SMC differentiation/(-) neointima	Cheng et al. [32]
143/145	Klf4/Klf5/Add3	Cytoskeletal dynamics	Xin et al. [194]
143/145	Klf2	(+) SMC differentiation	Hergenreider et al. [70]
146a	Klf4	(+) SMC proliferation/(+) neointima	Sun et al. [164]
146b	Unknown	(+) SMC proliferation/(+) SMC migration	Wang et al. [182]
195	Cdc42/Ccnd1	(-) SMC proliferation/(-) SMC migration	Wang et al. [186]
200	Zeb1	(+) SMC inflammation in Diabetes	Reddy et al. [153]
203	c-Abl	(-) SMC proliferation	Liao et al. [107]
204	Shp2	(-) SMC proliferation/(+) SMC apoptosis	Courboulin et al. [37]
205	Runx2	(-) SMC calcification	Quiao and Zhang [150]

Table 1 (continued)

miRNA	Target	Functions	References
206	Notch 3	(-) SMC proliferation/(-) SMC differentiation	Jalali et al. [81]
210	E2f3	(-) SMC apoptosis	Gou et al. [55]
221/222	Kit/Cdkn1b	(+) SMC proliferation/(-) SMC differentiation	Davis et al. [40]

G/C at -3), which mediates nuclear localization signal, is one exception [204]. It is likely that our understanding about these versatile molecules is only beginning to emerge and new technologies are needed to unravel their mechanisms. Uncovered functions of lncRNAs are recapitulated briefly as follows:

Regulation of imprinting

The general definition of imprinting is “parental-specific gene expression in diploid cells” [8]. Most imprinted clusters contain protein coding genes and noncoding RNAs (microRNAs, snoRNAs and lncRNAs), which are essential for mechanisms of imprinting regulation. X-inactive specific transcript (XIST) was the first lncRNA described to have functionality, and it is currently known that regulates X-inactivation mainly by binding polycomb-repressive complex 2 (PRC2) [72, 160]. Other well-studied lncRNAs that regulate imprinting include H19 [11], Airn [161] and KCNQ1OT1 [170].

Regulation of transcription

Nuclear lncRNAs play important tasks in the nucleus-modulating transcriptional regulation either in *cis* or in *trans*. A function as a scaffold or guides of histone modification complexes was first described by Chang and collaborators and confirmed later by genome-wide studies [59, 172]. In the last, by using RNA immunoprecipitation (RIP), the authors concluded that lncRNAs function as a cell-context-specific scaffold to guide protein complexes, such as the polycomb repressor complex followed by regulation of transcription [155]. Another described function for nuclear lncRNAs is their role as enhancers. The eRNAs are smaller than 2000 kb and are transcribed in correlation with their related gene. The mechanisms of eRNA action are not well understood, and several mechanisms have been proposed, including the facilitation of enhancer-promoter communication by promoting loop formation, the promoter remodeling via nucleosome depletion or acting as decoys for key transcription factors or transcription factor binding sites [17].

Nuclear organization

The genomic organization at the three-dimensional level may facilitate, at a short scale, the formation of loops that bring distant regulatory regions, enhancers and their specific targets into contact. At larger scales, the compaction of higher-order chromosomal domains

may affect the accessibility to the transcriptional machinery [52, 96]. Several lncRNAs have been connected with the regulation of nuclear organization, including MALAT1, NEAT1 [77], XIST [50] and Firre [60]. Studies using chromatin conformation capture analysis may contribute to find new transcripts that modulate either local structures or higher-order structures [43].

Molecular sponges

Cytoplasmic lncRNA transcripts can induce changes in protein expression by acting as competing endogenous RNAs (ceRNAs) for miRNAs. Recently, the characterization of endogenous circRNAs, which harbour a number of miRNA-binding sites, promised their function as molecular sponges [65]. This type of lncRNA is difficult to detect, but the improvement in sequencing technologies with the use of better algorithms for mapping RNA has enabled the identification of more candidates [82]. A number of linear lncRNAs have also been proposed as sponges, such is the case of the linc-MD1, which captures miR-133 to regulate muscle differentiation [25]. Interestingly, noncoding function of known coding mRNAs has been also described for the regulation of the tumour suppressor PTEN [169].

Coding for micropeptides

Recently, two independent groups reported the presence of small, conserved, open-reading frames in annotated lncRNAs that encode for functional micropeptides [5, 147]. It is probable that many annotated lncRNAs are indeed concealed mRNAs and their precise function is yet to be described.

Other functions

Another proposed function of lncRNAs is the regulation of protein localization and translocation between the nucleus and cytoplasm [189] and the regulation of coding genes stability [97, 184].

Long noncoding RNAs in SMC function

Early in the 1990s, H19 was identified as a molecule that acts as a RNA product [19]. Shortly after its discovery, H19 was reported to be expressed in SMC during blood vessel development reaching low levels in adult vessels [62]. Following acute vascular injury or in atherosclerotic lesions, this lncRNA is upregulated [61, 90]. H19 gene is located immediately

downstream of insulin-like growth factor II (IGF2) and comprises 2.3 kb. Both IGF2 and H19 are imprinted in a reciprocal manner where the paternal chromosome transcribes IGF2 but not H19 and the maternal chromosome transcribes H19 but not IGF2. Apart from its involvement in imprinted regulation of IGF2, the function of H19 is intriguing. A number of reports have described H19 as either an oncogene or a tumour suppressor in different cell systems. In addition, it has been shown that miR-675 is contained within the first exon of H19, which is expressed specifically in the placenta to promote growth [89]. Recently, a role as a sponge for let-7 family of miRNAs has been reported [86]. H19 depletion promotes precocious skeletal muscle differentiation in vitro by influencing let-7 targets expression [86]. The function of H19 in pathological SMC is unknown, but in this regard, it has been described that let-7a blocks proliferation and migration in vitro and in vivo by targeting myc [21]. It is possible that high levels of H19 following vascular injury sequester let-7 miRNAs. In consequence, proliferation and migration is augmented through modulation of its targets.

Another lncRNA described in SMC is an overlapping antisense to NOS3 gene (NOS3 NAT-lncRNA). This lncRNA has a discordant expression with its sense NOS3, with higher levels of the lncRNA over NOS3, and they do not display colocalization in assays of in situ hybridization. Knockdown of NOS3 NAT-lncRNA results in an increase of NOS3 expression, suggesting a posttranslational mechanism of regulation [156].

The lncRNA termed antisense noncoding RNA in the INK4 locus (ANRIL) is localized in the 9p21.3 region. This locus has been associated with genetic susceptibility for coronary diseases, intracranial aneurysms and type II diabetes in genome-wide association studies (GWAS) [146]. It has been reported that human SMC carrying single nucleotide polymorphism (SNP) variants in the ANRIL locus displayed elevated cell proliferation in vitro [138], and its deletion in mice confirmed this result [178]. ANRIL is a nuclear antisense lncRNA that regulates cell cycle genes in *cis* by recruiting the polycomb repressor complex.

The lncRNA-p21 is downregulated in the ApoE null model of atherogenesis and in human atherosclerotic lesions. This lncRNA represses SMC proliferation while its downregulation exacerbates the neointimal hyperplasia following acute injury. Mechanistically, the lncRNA-p21 interacts with the E3 ubiquitin protein ligase, which acts de-repressing p53-dependent target genes [191].

The transcript natural antisense to HIF1 α (HIF1A-AS1) was found to be increased in serum of patients with aortic aneurysms, and its downregulation in SMC in vitro reduces the apoptotic genes caspase 3 and caspase 8 and increases BCL2 [207]. Another research group, found that HIF1A-AS1 regulates the expression of Brahma-related gene 1 (BRG1), a gene that is increased in thoracic aortic aneurysm, by an unknown mechanism [185].

Leung and collaborators reported the first study using RNA-seq technology to evaluate lncRNA in SMC derived from rat. They found that treatment with angiotensin stimulates expression changes in a number of lncRNAs, including the lncRNA-362. This transcript contains the miR-221/222 cluster. lncRNA-362 downregulation results in a reduction of miR-221/222 expression and a decreased SMC proliferation [101].

More recently, the Miano Lab reported the first lncRNA that seems to be specific of SMC and EC [12]. They screened human aortic SMC by RNA-seq and found a lncRNA antisense to the EC-restricted FLI1 gene which they called smooth muscle and endothelial cell enriched migration/differentiation-associated (SENCR) lncRNA. They confirmed the expression of two variants highly enriched in EC, SMC and in tissues like arteries, lung and skeletal muscle. SENCR knockdown in SMC led to a dedifferentiated phenotype with the downregulation of SMC markers and the increase of MDK and PTN, two pro-migratory genes. Simultaneous inhibition of these genes prevented the migratory phenotype induced by SENCR silencing, suggesting that these genes mediate SENCR action [12]. The mechanism by which SENCR regulate its targets is unknown. SENCR is localized in the cytoplasm and does not control the expression of FLI1. The study of protein-RNA association using pull-down assays may help to discern its function.

Genome-wide studies using microarray revealed a number of lncRNAs differentially expressed in varicose saphenous with respect to control veins. Many of the identified transcripts are antisense lncRNAs and display a concordant expression with their associated gene [106]. More recently, the authors demonstrated a correlation between reduced expression of the snoRNA-containing GAS5 in varicose veins with an enhanced proliferation and migration of SMC [102]. Mechanistically, GAS5 interacts with ANXA2, a calcium-dependent RNA binding protein. Simultaneous knockdown of ANXA2 with GAS5 rescue the proliferative /migratory phenotype, suggesting that ANXA2 mediates the function of GAS5 in SMC [102]. The NAT HAS2-AS1 that is transcribed opposite to HAS2, a hyaluronan synthase, was reported to directly mediate the transcription of its overlapping gene. The authors showed that O-GlcNAcylation stimulates HAS2-AS1 promoter activity by recruiting p65. In turn, HAS2-AS1 activates HAS2 transcription by promoting an open chromatin structure specifically in the promoter region of HAS2 [176]. The exact mechanism by which HAS2-AS1 exerts its role is unclear.

Recently, a number of putative ceRNAs have been identified for MYCD using human vascular samples from patients with intracranial aneurysm [205]. The authors concluded that depletion of ARGHEF12, FGF12 and ADCY5 transcripts resulted in the reduction of MYCD levels, in a miRNA-dependent manner.

Table 2 Different known lncRNAs and their functions in SMC homeostasis

lncRNA	Localization	Functions	References
H19	NAT-lncRNA/cytoplasmic	Unknown	Han et al. [62]
ATG9B	NAT-lncRNA/?	(−) NOS3	Robb et al. [156]
CDKN2B-AS1	Antisense lncRNA/nuclear	(+) SMC proliferation ?	Motterle et al. [138]
MIR221HG	lncRNA/?	(+) SMC proliferation	Leung et al. [101]
SENCR	5'Antisense lncRNA/cytoplasmic	(+) SMC differentiation/(−) SMC migration	Bell et al. [12]
HIF1A-AS1	NAT-lncRNA/?	(+) SMC apoptosis	Zhao et al. [207]
HIF1A-AS1	BRG1	(+) SMC apoptosis/(−) SMC proliferation	Wang et al. [184]
lncRNA-p21	lncRNA/nuclear	(−) SMC proliferation	Wu et al. [191]
HAS2-AS1	NAT-lncRNA/?	Matrix regulation	Vigetti et al. [176]
GAS5	lncRNA/cytoplasmic	(−) SMC proliferation/(−) SMC migration	Li et al. [102]

Table 2 summarizes the lncRNAs genes described in SMC, and their suggested mechanism.

Perspectives

In the next years, many other miRNAs will probably be identified as important players in the regulation of SMC homeostasis, given the recent identification of new miRNA transcripts [115]. The next step will be to elucidate more accurately the identification of target genes. This is complicated due to the fact that many miRNAs bind to its target genes in a non-canonical manner [69], difficulting their identification through bioinformatics analysis. Another important topic for future research is the identification of nucleotide variations in non-coding regions, including promoters, miRNA sequence, their target 3'UTR and lncRNA sequences and their functional impact in vivo. For example, a SNP that has been associated to cardiovascular disease located in the 3'UTR region of TCF21 creates a binding site for miR-224 which in turn suppresses its expression in human coronary SMC [134]. Other examples include the SNP in a susceptible locus for myocardial infarction that encodes for MIAT, a lncRNA with unclear functions [80], and variants in the ANRIL locus [138]. The study of “master regulators” of noncoding RNAs is another poor explored area of research that needs more attention. Finally, the exploration of other small ncRNAs is an underdeveloped field in the study of SMC differentiation. For example, we have observed that the small ncRNA YRNA3 regulates a number of SMC marker expression (unpublished observations). Interestingly, EC and platelets produce and secrete microparticles full of this small ncRNA (unpublished observations) and other RNA products that may influence SMC fate. Therefore, the study of the noncoding genome in the understanding of SMC phenotype modulation is still in its infancy. Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR) technologies of genome editing will surely help to discern

the function of noncoding regions in vivo [63]. The major challenge in understanding SMC homeostasis is being able to integrate the whole genome regulation under normal physiological states and during the development of vascular diseases.

Acknowledgments This study is supported by grants SEPAR-2009, PRH-2012-0003. BCT is a recipient of a pre-doctoral contract from CONICET. MVP is a recipient of a postdoctoral contract from CONICET.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Ackers-Johnson M, Talasila A, Sage AP, Long X, Bot I, Morrell NW, Bennett MR, Miano JM, Sinha S (2015) Myocardin regulates vascular smooth muscle cell inflammatory activation and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:817–828. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305218
2. Albinsson S, Skoura A, Yu J, DiLorenzo A, Fernandez-Hernando C, Offermanns S, Miano JM, Sessa WC (2011) Smooth muscle miRNAs are critical for post-natal regulation of blood pressure and vascular function. *PLoS One* 6:e18869. doi:10.1371/journal.pone.0018869
3. Albinsson S, Suarez Y, Skoura A, Offermanns S, Miano JM, Sessa WC (2010) MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1118–1126. doi:10.1161/ATVBAHA.109.200873
4. Alexander MR, Owens GK (2012) Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol* 74:13–40. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142315
5. Anderson DM, Anderson KM, Chang CL, Makarewich CA, Nelson BR, McAnally JR, Kasaragod P, Shelton JM, Liou J, Bassel-Duby R, Olson EN (2015) A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. *Cell* 160:595–606. doi:10.1016/j.cell.2015.01.009

6. Badorff C, Seeger FH, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Glycogen synthase kinase 3 β inhibits myocardin-dependent transcription and hypertrophy induction through site-specific phosphorylation. *Circ Res* 97:645–654. doi:10.1161/01.RES.0000184684.88750.FE
7. Balderman JA, Lee HY, Mahoney CE, Handy DE, White K, Annis S, Lebeche D, Hajjar RJ, Loscalzo J, Leopold JA (2012) Bone morphogenetic protein-2 decreases microRNA-30b and microRNA-30c to promote vascular smooth muscle cell calcification. *J Am Heart Assoc* 1:e003905. doi:10.1161/JAHA.112.003905
8. Barlow DP, Bartolomei MS (2014) Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6 doi:10.1101/cshperspect.a018382
9. Barrett TB, Benditt EP (1987) *sis* (platelet-derived growth factor B chain) gene transcript levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 1099–1103
10. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215–233. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002
11. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351:153–155. doi:10.1038/351153a0
12. Bell RD, Long X, Lin M, Bergmann JH, Nanda V, Cowan SL, Zhou Q, Han Y, Spector DL, Zheng D, Miano JM (2014) Identification and initial functional characterization of a human vascular cell-enriched long noncoding RNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34:1249–1259. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303240
13. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 35:215–217. doi:10.1038/ng1253
14. Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72:291–336. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
15. Blakaj A, Lin H (2008) Piecing together the mosaic of early mammalian development through microRNAs. *J Biol Chem* 283: 9505–9508. doi:10.1074/jbc.R800002200
16. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Kruger M, Hein L, Braun T (2009) Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest* 119:2634–2647. doi:10.1172/JCI38864
17. Bonasio R, Shiekhattar R (2014) Regulation of transcription by long noncoding RNAs. *Annu Rev Genet* 48:433–455. doi:10.1146/annurev-genet-120213-092323
18. Boucher JM, Peterson SM, Urs S, Zhang C, Liaw L (2011) The miR-143/145 cluster is a novel transcriptional target of Jagged-1/Notch signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 286:28312–28321. doi:10.1074/jbc.M111.221945
19. Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 10:28–36
20. Bretschneider M, Busch B, Mueller D, Nolze A, Schreier B, Gekle M, Grossmann C (2016) Activated mineralocorticoid receptor regulates micro-RNA-29b in vascular smooth muscle cells. *FASEB J*. doi:10.1096/fj.15-271254
21. Cao H, Hu X, Zhang Q, Wang J, Li J, Liu B, Shao Y, Li X, Zhang J, Xin S (2014) Upregulation of let-7a inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vein graft intimal hyperplasia in rats. *J Surg Res* 192:223–233. doi:10.1016/j.jss.2014.05.045
22. Caruso P, Dempsey Y, Stevens HC, McDonald RA, Long L, Lu R, White K, Mair KM, McClure JD, Southwood M, Upton P, Xin M, van Rooij E, Olson EN, Morrell NW, MacLean MR, Baker AH (2012) A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples. *Circ Res* 111: 290–300. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.267591
23. Castel D, Mourikis P, Bartels SJ, Brinkman AB, Tajbakhsh S, Stunnenberg HG (2013) Dynamic binding of RBPJ is determined by Notch signaling status. *Genes Dev* 27:1059–1071. doi:10.1101/gad.211912.112
24. Cech TR, Steitz JA (2014) The noncoding RNA revolution—trashing old rules to forge new ones. *Cell* 157:77–94. doi:10.1016/j.cell.2014.03.008
25. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, Tramontano A, Bozzoni I (2011) A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 147:358–369. doi:10.1016/j.cell.2011.09.028
26. Chan MC, Hilyard AC, Wu C, Davis BN, Hill NS, Lal A, Lieberman J, Lagna G, Hata A (2010) Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGF β family of signalling pathways by control of miR-24 expression. *EMBO J* 29:559–573. doi:10.1038/emboj.2009.370
27. Chan MC, Nguyen PH, Davis BN, Ohoka N, Hayashi H, Du K, Lagna G, Hata A (2007) A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* 27:5776–5789. doi:10.1128/MCB.00218-07
28. Chen CN, Li YS, Yeh YT, Lee PL, Usami S, Chien S, Chiu JJ (2006) Synergistic roles of platelet-derived growth factor-BB and interleukin-1 β in phenotypic modulation of human aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2665–2670. doi:10.1073/pnas.0510973103
29. Chen J, Yin H, Jiang Y, Radhakrishnan SK, Huang ZP, Li J, Shi Z, Kilsdonk EP, Gui Y, Wang DZ, Zheng XL (2011) Induction of microRNA-1 by myocardin in smooth muscle cells inhibits cell proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:368–375. doi:10.1161/ATVBAHA.110.218149
30. Chen Q, Yang F, Guo M, Wen G, Zhang C, le Luong A, Zhu J, Xiao Q, Zhang L (2015) miRNA-34a reduces neointima formation through inhibiting smooth muscle cell proliferation and migration. *J Mol Cell Cardiol* 89:75–86. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.10.017
31. Chen X, Talati M, Fessel JP, Hemnes AR, Gladson S, French J, Shay S, Trammell A, Phillips JA, Hamid R, Cogan JD, Dawson EP, Womble KE, Hedges LK, Martinez EG, Wheeler LA, Loyd JE, Majka SJ, West J, Austin ED (2016) Estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone exacerbates bone morphogenetic protein receptor type II-associated pulmonary arterial hypertension through MicroRNA-29-mediated modulation of cellular metabolism. *Circulation* 133:82–97. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016133
32. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA, Huo Y, Delphin ES, Zhang C (2009) MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 105:158–166. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.197517
33. Choe N, Kwon JS, Kim JR, Eom GH, Kim Y, Nam KI, Ahn Y, Kee HJ, Kook H (2013) The microRNA miR-132 targets Lrrfip1 to block vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Atherosclerosis* 229:348–355. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.009
34. Climent M, Quintavalle M, Miragoli M, Chen J, Condorelli G, Elia L (2015) TGF β triggers miR-143/145 transfer from smooth muscle cells to endothelial cells, thereby modulating vessel stabilization. *Circ Res* 116:1753–1764. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305178
35. Consortium EP (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* 489:57–74. doi:10.1038/nature11247

36. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D (2009) miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 460:705–710. doi:10.1038/nature08195
37. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S (2011) Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* 208:535–548. doi:10.1084/jem.20101812
38. Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, Guizarro MV, Bisogna M, Wei J, Socci ND, Levine DA, Michor F, Hernando E (2010) A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. *Am J Pathol* 177:908–917. doi:10.2353/ajpath.2010.091150
39. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A (2008) SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454:56–61. doi:10.1038/nature07086
40. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A (2009) Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem* 284:3728–3738. doi:10.1074/jbc.M808788200
41. Davis-Dusenbery BN, Wu C, Hata A (2011) Micromanaging vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic modulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2370–2377. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226670
42. Deaton RA, Gan Q, Owens GK (2009) Sp1-dependent activation of KLF4 is required for PDGF-BB-induced phenotypic modulation of smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296:H1027–1037. doi:10.1152/ajpheart.01230.2008
43. Dekker J, Rippe K, Dekker M, Kleckner N (2002) Capturing chromosome conformation. *Science* 295:1306–1311. doi:10.1126/science.1067799
44. Derynck R, Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577–584. doi:10.1038/nature02006
45. Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F, Xue C, Marinov GK, Khatun J, Williams BA, Zaleski C, Rozowsky J, Roder M, Kokocinski F, Abdelhamid RF, Alioto T, Antoshechkin I, Baer MT, Bar NS, Batut P, Bell K, Bell I, Chakraborty S, Chen X, Chrast J, Curado J, Derrien T, Drenkow J, Dumais E, Dumais J, Duttagupta R, Falconnet E, Fastuca M, Fejes-Toth K, Ferreira P, Foissac S, Fullwood MJ, Gao H, Gonzalez D, Gordon A, Gunawardena H, Howald C, Jha S, Johnson R, Kapranov P, King B, Kingswood C, Luo OJ, Park E, Persaud K, Preall JB, Ribeca P, Risk B, Robyr D, Sammeth M, Schaffer L, See LH, Shahab A, Skancke J, Suzuki AM, Takahashi H, Tilgner H, Trout D, Walters N, Wang H, Wrobel J, Yu Y, Ruan X, Hayashizaki Y, Harrow J, Gerstein M, Hubbard T, Reymond A, Antonarakis SE, Hannon G, Giddings MC, Ruan Y, Wold B, Carninci P, Guigo R, Gingeras TR (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489:101–108. doi:10.1038/nature11233
46. Doi H, Iso T, Sato H, Yamazaki M, Matsui H, Tanaka T, Manabe I, Arai M, Nagai R, Kurabayashi M (2006) Jagged1-selective notch signaling induces smooth muscle differentiation via a RBP-Jkappa-dependent pathway. *J Biol Chem* 281:28555–28564. doi:10.1074/jbc.M602749200
47. Dueck A, Meister G (2014) Assembly and function of small RNA—argonaute protein complexes. *Biol Chem* 395:611–629. doi:10.1515/hsz-2014-0116
48. Durocher D, Nemer M (1998) Combinatorial interactions regulating cardiac transcription. *Dev Genet* 22:250–262. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1998)22:3<250::AID-DVG7>3.0.CO;2-5
49. Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, Peterson KL, Indolfi C, Catalucci D, Chen J, Courtneidge SA, Condorelli G (2009) The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. *Cell Death Differ* 16:1590–1598. doi:10.1038/cdd.2009.153
50. Engreitz JM, Pandya-Jones A, McDonel P, Shishkin A, Sirokman K, Surka C, Kadri S, Xing J, Goren A, Lander ES, Plath K, Guttman M (2013) The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science* 341:1237973. doi:10.1126/science.1237973
51. Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12:861–874. doi:10.1038/nrg3074
52. Francastel C, Schubeler D, Martin DI, Groudine M (2000) Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:137–143. doi:10.1038/35040083
53. Giege R (2008) Toward a more complete view of tRNA biology. *Nat Struct Mol Biol* 15:1007–1014. doi:10.1038/nsmb.1498
54. Goto Y, Kojima S, Nishikawa R, Enokida H, Chiyomaru T, Kinoshita T, Nakagawa M, Naya Y, Ichikawa T, Seki N (2014) The microRNA-23b/27b/24-1 cluster is a disease progression marker and tumor suppressor in prostate cancer. *Oncotarget* 5:7748–7759. doi:10.18632/oncotarget.2294
55. Gou D, Ramchandran R, Peng X, Yao L, Kang K, Sarkar J, Wang Z, Zhou G, Raj JU (2012) miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303:L682–691. doi:10.1152/ajplung.00344.2011
56. Green DE, Murphy TC, Kang BY, Searles CD, Hart CM (2015) PPARgamma ligands attenuate hypoxia-induced proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells through modulation of MicroRNA-21. *PLoS One* 10:e0133391. doi:10.1371/journal.pone.0133391
57. Gridley T (2010) Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol* 92:277–309. doi:10.1016/S0070-2153(10)92009-7
58. Grosshans H, Filipowicz W (2008) Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* 451:414–416. doi:10.1038/451414a
59. Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, Young G, Lucas AB, Ach R, Bruhn L, Yang X, Amit I, Meissner A, Regev A, Rinn JL, Root DE, Lander ES (2011) lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* 477:295–300. doi:10.1038/nature10398
60. Hacisuleyman E, Goff LA, Trapnell C, Williams A, Hnao-Mejia J, Sun L, McClanahan P, Hendrickson DG, Sauvageau M, Kelley DR, Morse M, Engreitz J, Lander ES, Guttman M, Lodish HF, Flavell R, Raj A, Rinn JL (2014) Topological organization of multichromosomal regions by the long intergenic noncoding RNA Firre. *Nat Struct Mol Biol* 21:198–206. doi:10.1038/nsmb.2764
61. Han DK, Khaing ZZ, Pollock RA, Haudenschild CC, Liao G (1996) H19, a marker of developmental transition, is reexpressed in human atherosclerotic plaques and is regulated by the insulin family of growth factors in cultured rabbit smooth muscle cells. *J Clin Invest* 97:1276–1285. doi:10.1172/JCI118543
62. Han DK, Liao G (1992) Identification and characterization of developmentally regulated genes in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 71:711–719
63. Han Y, Slivano OJ, Christie CK, Cheng AW, Miano JM (2015) CRISPR-Cas9 genome editing of a single regulatory element nearly abolishes target gene expression in mice—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:312–315. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305017
64. Hangauer MJ, Vaughn IW, McManus MT (2013) Pervasive transcription of the human genome produces thousands of previously

- unidentified long intergenic noncoding RNAs. *PLoS Genet* 9: e1003569. doi:10.1371/journal.pgen.1003569
65. Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495:384–388. doi:10.1038/nature11993
 66. Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK (1997) A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CARG elements. *J Biol Chem* 272:10948–10956
 67. Hayashi K, Nakamura S, Nishida W, Sobue K (2006) Bone morphogenetic protein-induced MSX1 and MSX2 inhibit myocardin-dependent smooth muscle gene transcription. *Mol Cell Biol* 26: 9456–9470. doi:10.1128/MCB.00759-06
 68. Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, Huang Y, Ang YS, de Jong PJ, Ivey KN, Srivastava D (2013) microRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart. *Elife* 2:e01323. doi:10.7554/eLife.01323
 69. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D (2013) Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent non-canonical binding. *Cell* 153:654–665. doi:10.1016/j.cell.2013.03.043
 70. Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S (2012) Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 14:249–256. doi:10.1038/ncb2441
 71. Herring BP, Hoggatt AM, Burlak C, Offermanns S (2014) Previously differentiated medial vascular smooth muscle cells contribute to neointima formation following vascular injury. *Vasc Cell* 6:21. doi:10.1186/2045-824X-6-21
 72. Herzing LB, Romer JT, Horn JM, Ashworth A (1997) Xist has properties of the X-chromosome inactivation centre. *Nature* 386: 272–275. doi:10.1038/386272a0
 73. Hill CS, Wynne J, Treisman R (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* 81:1159–1170
 74. Hinson JS, Medlin MD, Taylor JM, Mack CP (2008) Regulation of myocardin factor protein stability by the LIM-only protein FHL2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295:H1067–H1075. doi:10.1152/ajpheart.91421.2007
 75. Hirschi KK, Lai L, Belaguli NS, Dean DA, Schwartz RJ, Zimmer WE (2002) Transforming growth factor-beta induction of smooth muscle cell phenotype requires transcriptional and post-transcriptional control of serum response factor. *J Biol Chem* 277:6287–6295. doi:10.1074/jbc.M106649200
 76. Huang H, Xie C, Sun X, Ritchie RP, Zhang J, Chen YE (2010) miR-10a contributes to retinoid acid-induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 285:9383–9389. doi:10.1074/jbc.M109.095612
 77. Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A (2007) A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* 8:39. doi:10.1186/1471-2164-8-39
 78. Iaconetti C, De Rosa S, Polimeni A, Sorrentino S, Gareri C, Carino A, Sabatino J, Colangelo M, Curcio A, Indolfi C (2015) Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Cardiovasc Res* 107:522–533. doi:10.1093/cvr/cvv141
 79. Ilagan RM, Genheimer CW, Quinlan SF, Guthrie KI, Sangha N, Ramachandranair S, Kelley RW, Presnell SC, Basu J, Ludlow JW (2011) Smooth muscle phenotypic diversity is mediated through alterations in myocardin gene splicing. *J Cell Physiol* 226:2702–2711. doi:10.1002/jcp.22622
 80. Ishii N, Ozaki K, Sato H, Mizuno H, Saito S, Takahashi A, Miyamoto Y, Ikegawa S, Kamatani N, Hori M, Saito S, Nakamura Y, Tanaka T (2006) Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction. *J Hum Genet* 51:1087–1099. doi:10.1007/s10038-006-0070-9
 81. Jalali S, Ramanathan GK, Parthasarathy PT, Aljbran S, Galam L, Yunus A, Garcia S, Cox RR Jr, Lockey RF, Kolliputi N (2012) Mir-206 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and differentiation. *PLoS One* 7:e46808. doi:10.1371/journal.pone.0046808
 82. Jeck WR, Sharpless NE (2014) Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol* 32:453–461. doi:10.1038/nbt.2890
 83. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C (2007) MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res* 100:1579–1588. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.141986
 84. Jiang Y, Yin H, Zheng XL (2010) MicroRNA-1 inhibits myocardin-induced contractility of human vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 225:506–511. doi:10.1002/jcp.22230
 85. Johnson AD, Owens GK (1999) Differential activation of the SmalphaA promoter in smooth vs. skeletal muscle cells by bHLH factors. *Am J Phys* 276:C1420–1431
 86. Kallen AN, Zhou XB, Xu J, Qiao C, Ma J, Yan L, Lu L, Liu C, Yi JS, Zhang H, Min W, Bennett AM, Gregory RI, Ding Y, Huang Y (2013) The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol Cell* 52:101–112. doi:10.1016/j.molcel.2013.08.027
 87. Kang H, Davis-Dusenbery BN, Nguyen PH, Lal A, Lieberman J, Van Aelst L, Lagna G, Hata A (2012) Bone morphogenetic protein 4 promotes vascular smooth muscle contractility by activating microRNA-21 (miR-21), which down-regulates expression of family of dedicator of cytokinesis (DOCK) proteins. *J Biol Chem* 287:3976–3986. doi:10.1074/jbc.M111.303156
 88. Kang K, Peng X, Zhang X, Wang Y, Zhang L, Gao L, Weng T, Zhang H, Ramchandran R, Raj JU, Gou D, Liu L (2013) MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* 288:25414–25427. doi:10.1074/jbc.M113.460287
 89. Keniry A, Oxley D, Monnier P, Kyba M, Dandolo L, Smits G, Reik W (2012) The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol* 14:659–665. doi:10.1038/ncb2521
 90. Kim DK, Zhang L, Dzau VJ, Pratt RE (1994) H19, a developmentally regulated gene, is reexpressed in rat vascular smooth muscle cells after injury. *J Clin Invest* 93:355–360. doi:10.1172/JCI116967
 91. Kim MH, Ham O, Lee SY, Choi E, Lee CY, Park JH, Lee J, Seo HH, Seung M, Choi E, Min PK, Hwang KC (2014) MicroRNA-365 inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by targeting cyclin D1. *J Cell Biochem* 115:1752–1761. doi:10.1002/jcb.24841
 92. Kim S, Hata A, Kang H (2014) Down-regulation of miR-96 by bone morphogenetic protein signaling is critical for vascular smooth muscle cell phenotype modulation. *J Cell Biochem* 115: 889–895. doi:10.1002/jcb.24730
 93. Kim VN, Han J, Siomi MC (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:126–139. doi:10.1038/nm2632
 94. Kiss T (2001) Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J* 20:3617–3622. doi:10.1093/emboj/20.14.3617

95. Kohn M, Pazaitis N, Huttelmaier S (2013) Why YRNAs? About versatile RNAs and their functions. *Biomolecules* 3:143–156. doi:10.3390/biom3010143
96. Kosak ST, Groudine M (2002) The undiscovered country: chromosome territories and the organization of transcription. *Dev Cell* 2:690–692
97. Kretz M, Siprashvili Z, Chu C, Webster DE, Zehnder A, Qu K, Lee CS, Flockhart RJ, Groff AF, Chow J, Johnston D, Kim GE, Spitale RC, Flynn RA, Zheng GX, Aiyer S, Raj A, Rinn JL, Chang HY, Khavari PA (2013) Control of somatic tissue differentiation by the long non-coding RNA TINCR. *Nature* 493:231–235. doi:10.1038/nature11661
98. Kumar MS, Owens GK (2003) Combinatorial control of smooth muscle-specific gene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:737–747. doi:10.1161/01.ATV.0000065197.07635.BA
99. Lagna G, Ku MM, Nguyen PH, Neuman NA, Davis BN, Hata A (2007) Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors. *J Biol Chem* 282:37244–37255. doi:10.1074/jbc.M708137200
100. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, Maegdefessel L, Kundu RK, Quertermous T, Tsao PS, Spin JM (2011) MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* 226:1035–1043. doi:10.1002/jcp.22422
101. Leung A, Trac C, Jin W, Lanting L, Akbany A, Saetrom P, Schones DE, Natarajan R (2013) Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 113:266–278. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300849
102. Li L, Li X, The E, Wang LJ, Yuan TY, Wang SY, Feng J, Wang J, Liu Y, Wu YH, Ma XE, Ge J, Cui YY, Jiang XY (2015) Low expression of lncRNA-GAS5 is implicated in human primary varicose great saphenous veins. *PLoS One* 10:e0120550. doi:10.1371/journal.pone.0120550
103. Li P, Liu Y, Yi B, Wang G, You X, Zhao X, Summer R, Qin Y, Sun J (2013) MicroRNA-638 is highly expressed in human vascular smooth muscle cells and inhibits PDGF-BB-induced cell proliferation and migration through targeting orphan nuclear receptor NOR1. *Cardiovasc Res* 99:185–193. doi:10.1093/cvr/cvt082
104. Li P, Zhu N, Yi B, Wang N, Chen M, You X, Zhao X, Solomides CC, Qin Y, Sun J (2013) MicroRNA-663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation. *Circ Res* 113:1117–1127. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.301306
105. Li S, Ran Y, Zhang D, Chen J, Li S, Zhu D (2013) MicroRNA-138 plays a role in hypoxic pulmonary vascular remodelling by targeting Mst1. *Biochem J* 452:281–291. doi:10.1042/BJ20120680
106. Li X, Jiang XY, Ge J, Wang J, Chen GJ, Xu L, Xie DY, Yuan TY, Zhang DS, Zhang H, Chen YH (2014) Aberrantly expressed lncRNAs in primary varicose great saphenous veins. *PLoS One* 9:e86156. doi:10.1371/journal.pone.0086156
107. Liao G, Panettieri RA, Tang DD (2015) MicroRNA-203 negatively regulates c-Abl, ERK1/2 phosphorylation, and proliferation in smooth muscle cells. *Physiol Rep* 3 doi:10.14814/phy2.12541
108. Lin Y, Liu X, Cheng Y, Yang J, Huo Y, Zhang C (2009) Involvement of microRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 284:7903–7913. doi:10.1074/jbc.M806920200
109. Liu N, Bezprozvannaya S, Williams AH, Qi X, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2008) microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. *Genes Dev* 22:3242–3254. doi:10.1101/gad.1738708
110. Liu X, Cheng Y, Chen X, Yang J, Xu L, Zhang C (2011) MicroRNA-31 regulated by the extracellular regulated kinase is involved in vascular smooth muscle cell growth via large tumor suppressor homolog 2. *J Biol Chem* 286:42371–42380. doi:10.1074/jbc.M111.261065
111. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C (2009) A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res* 104:476–487. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.185363
112. Liu Y, Sinha S, McDonald OG, Shang Y, Hoofnagle MH, Owens GK (2005) Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem* 280:9719–9727. doi:10.1074/jbc.M412862200
113. Liu Y, Yang K, Shi H, Xu J, Zhang D, Wu Y, Zhou S, Sun X (2015) MiR-21 modulates human airway smooth muscle cell proliferation and migration in asthma through regulation of PTEN expression. *Exp Lung Res* 41:535–545. doi:10.3109/01902148.2015.1090501
114. Liu ZP, Wang Z, Yanagisawa H, Olson EN (2005) Phenotypic modulation of smooth muscle cells through interaction of Foxo4 and myocardin. *Dev Cell* 9:261–270. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.017
115. Londin E, Loher P, Telonis AG, Quann K, Clark P, Jing Y, Hatzimichael E, Kirino Y, Honda S, Lally M, Ramratnam B, Comstock CE, Knudsen KE, Gomella L, Spaeth GL, Hark L, Katz LJ, Witkiewicz A, Rostami A, Jimenez SA, Hollingsworth MA, Yeh JJ, Shaw CA, McKenzie SE, Bray P, Nelson PT, Zupo S, Van Roosbroeck K, Keating MJ, Calin GA, Yeo C, Jimbo M, Cozzitorto J, Brody JR, Delgrosso K, Mattick JS, Fortina P, Rigoutsos I (2015) Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1106–1115. doi:10.1073/pnas.1420955112
116. Long X, Bell RD, Gerthoffer WT, Zlokovic BV, Miano JM (2008) Myocardin is sufficient for a smooth muscle-like contractile phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1505–1510. doi:10.1161/ATVBAHA.108.166066
117. Long X, Miano JM (2011) Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) utilizes distinct pathways for the transcriptional activation of microRNA 143/145 in human coronary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* 286:30119–30129. doi:10.1074/jbc.M111.258814
118. Long X, Slivano OJ, Cowan SL, Georger MA, Lee TH, Miano JM (2011) Smooth muscle calponin: an unconventional CARG-dependent gene that antagonizes neointimal formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2172–2180. doi:10.1161/ATVBAHA.111.232785
119. Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta N, Steer BM, Ingram AJ, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Marsden PA, Verma S (2012) MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation* 126:S81–90. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.084186
120. Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK (2001) Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* 276:341–347. doi:10.1074/jbc.M005505200
121. Madsen CS, Regan CP, Owens GK (1997) Interaction of CARG elements and a GC-rich repressor element in transcriptional regulation of the smooth muscle myosin heavy chain gene in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:29842–29851
122. Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, Adam M, Nakagami F, Heymann HM, Chemogubova E, Jin H, Roy J, Hultgren R, Caidahl K, Schrepfer S, Hamsten A, Eriksson P, McConnell MV, Dalman RL, Tsao PS (2014) miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. *Nat Commun* 5:5214. doi:10.1038/ncomms6214

123. Manabe I, Owens GK (2001) CARG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *J Clin Invest* 107:823–834. doi:10.1172/JCI11385
124. Mano T, Luo Z, Malendowicz SL, Evans T, Walsh K (1999) Reversal of GATA-6 downregulation promotes smooth muscle differentiation and inhibits intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circ Res* 84:647–654
125. Martin-Garrido A, Williams HC, Lee M, Seidel-Rogol B, Ci X, Dong JT, Lassegue B, Martin AS, Griendling KK (2013) Transforming growth factor beta inhibits platelet derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation via Akt-independent, Smad-mediated cyclin D1 downregulation. *PLoS One* 8:e79657. doi:10.1371/journal.pone.0079657
126. Massague J, Seoane J, Wotton D (2005) Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783–2810. doi:10.1101/gad.1350705
127. McDonald RA, Halliday CA, Miller AM, Diver LA, Dakin RS, Montgomery J, McBride MW, Kennedy S, McClure JD, Robertson KE, Douglas G, Channon KM, Oldroyd KG, Baker AH (2015) Reducing in-stent restenosis: therapeutic manipulation of miRNA in vascular remodeling and inflammation. *J Am Coll Cardiol* 65:2314–2327. doi:10.1016/j.jacc.2015.03.549
128. Meister G, Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343–349. doi:10.1038/nature02873
129. Meloche J, Le Guen M, Potus F, Vinck J, Ranchoux B, Johnson I, Antigny F, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, Perros F, Provencher S, Bonnet S (2015) miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 309:C363–372. doi:10.1152/ajpcell.00149.2015
130. Mercer TR, Gerhardt DJ, Dinger ME, Crawford J, Trapnell C, Jeddloh JA, Mattick JS, Rinn JL (2012) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat Biotechnol* 30:99–104. doi:10.1038/nbt.2024
131. Merlet E, Atassi F, Motiani RK, Mougnot N, Jacquet A, Nadaud S, Capiod T, Trebak M, Lompre AM, Marchand A (2013) miR-424/322 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and neointimal formation in the rat. *Cardiovasc Res* 98:458–468. doi:10.1093/cvr/cvt045
132. Miano JM, Long X (2015) The short and long of noncoding sequences in the control of vascular cell phenotypes. *Cell Mol Life Sci* 72:3457–3488. doi:10.1007/s00018-015-1936-9
133. Miano JM, Long X, Fujiwara K (2007) Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C70–81. doi:10.1152/ajpcell.00386.2006
134. Miller CL, Haas U, Diaz R, Leeper NJ, Kundu RK, Patlolla B, Assimes TL, Kaiser FJ, Perisic L, Hedin U, Maegdefessel L, Schunkert H, Erdmann J, Quertermous T, Sczakiel G (2014) Coronary heart disease-associated variation in TCF21 disrupts a miR-224 binding site and miRNA-mediated regulation. *PLoS Genet* 10:e1004263. doi:10.1371/journal.pgen.1004263
135. Morrissey EE, Ip HS, Lu MM, Parmacek MS (1996) GATA-6: a zinc finger transcription factor that is expressed in multiple cell lineages derived from lateral mesoderm. *Dev Biol* 177:309–322. doi:10.1006/dbio.1996.0165
136. Morrow D, Scheller A, Birney YA, Sweeney C, Guha S, Cummins PM, Murphy R, Walls D, Redmond EM, Cahill PA (2005) Notch-mediated CBF-1/RBP-J{ κ } dependent regulation of human vascular smooth muscle cell phenotype in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C1188–1196. doi:10.1152/ajpcell.00198.2005
137. Moss T, Stefanovsky VY (2002) At the center of eukaryotic life. *Cell* 109:545–548
138. Motterle A, Pu X, Wood H, Xiao Q, Gor S, Ng FL, Chan K, Cross F, Shohreh B, Poston RN, Tucker AT, Caulfield MJ, Ye S (2012) Functional analyses of coronary artery disease associated variation on chromosome 9p21 in vascular smooth muscle cells. *Hum Mol Genet* 21:4021–4029. doi:10.1093/hmg/dds224
139. Nemenoff RA, Horita H, Ostriker AC, Furgeson SB, Simpson PA, VanPutten V, Crossno J, Offermanns S, Weiser-Evans MC (2011) SDF-1 α induction in mature smooth muscle cells by inactivation of PTEN is a critical mediator of exacerbated injury-induced neointima formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1300–1308. doi:10.1161/ATVBAHA.111.223701
140. Nosedá M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, Karsan A (2006) Smooth muscle alpha-actin is a direct target of notch/CSL. *Circ Res* 98:1468–1470. doi:10.1161/01.RES.0000229683.81357.26
141. Osbourn JK, Weissberg PL, Shanahan CM (1995) A regulatory element downstream of the rat SM22 alpha gene transcription start point enhances reporter gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gene* 154:249–253
142. Owens GK (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75:487–517
143. Owens GK (2007) Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Found Symp* 283:174–191, **discussion 191–173, 238–141**
144. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84:767–801. doi:10.1152/physrev.00041.2003
145. Pan Y, Balazs L, Tigyi G, Yue J (2011) Conditional deletion of dicer in vascular smooth muscle cells leads to the developmental delay and embryonic mortality. *Biochem Biophys Res Commun* 408:369–374. doi:10.1016/j.bbrc.2011.02.119
146. Pasmant E, Sabbagh A, Vidaud M, Bieche I (2011) ANRIL, a long, noncoding RNA, is an unexpected major hotspot in GWAS. *FASEB J* 25:444–448. doi:10.1096/fj.10-172452
147. Pauli A, Norris ML, Valen E, Chew GL, Gagnon JA, Zimmerman S, Mitchell A, Ma J, Dubrulle J, Reyon D, Tsai SQ, Joung JK, Saghatelian A, Schier AF (2014) Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* 343:1248636. doi:10.1126/science.1248636
148. Perlman H, Suzuki E, Simonson M, Smith RC, Walsh K (1998) GATA-6 induces p21(Cip1) expression and G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 273:13713–13718
149. Proweller A, Pear WS, Parmacek MS (2005) Notch signaling represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 280:8994–9004. doi:10.1074/jbc.M413316200
150. Qiao W, Chen L, Zhang M (2014) MicroRNA-205 regulates the calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 33:1945–1953. doi:10.1159/000362971
151. Qiu P, Li L (2002) Histone acetylation and recruitment of serum responsive factor and CREB-binding protein onto SM22 promoter during SM22 gene expression. *Circ Res* 90:858–865
152. Qiu P, Ritchie RP, Fu Z, Cao D, Cumming J, Miano JM, Wang DZ, Li HJ, Li L (2005) Myocardin enhances Smad3-mediated transforming growth factor-beta1 signaling in a CARG box-independent manner: Smad-binding element is an important cis element for SM22alpha transcription in vivo. *Circ Res* 97:983–991. doi:10.1161/01.RES.0000190604.90049.71
153. Reddy MA, Jin W, Villeneuve L, Wang M, Lanting L, Todorov I, Kato M, Natarajan R (2012) Pro-inflammatory role of microRNA-200 in vascular smooth muscle cells from diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:721–729. doi:10.1161/ATVBAHA.111.241109
154. Rhee SW, Stimers JR, Wang W, Pang L (2009) Vascular smooth muscle-specific knockdown of the noncardiac form of the L-type calcium channel by microRNA-based short hairpin RNA as a potential antihypertensive therapy. *J Pharmacol Exp Ther* 329:775–782. doi:10.1124/jpet.108.148866

155. Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81:145–166. doi:10.1146/annurev-biochem-051410-092902
156. Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, Scherer SW, Nakabayashi K, Marsden PA (2004) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase by an overlapping antisense mRNA transcript. *J Biol Chem* 279:37982–37996. doi:10.1074/jbc.M400271200
157. Sauvageau M, Goff LA, Lodato S, Bonev B, Groff AF, Gerhardinger C, Sanchez-Gomez DB, Hacisuleyman E, Li E, Spence M, Liapis SC, Mallard W, Morse M, Swerdel MR, D'Ecclesis MF, Moore JC, Lai V, Gong G, Yancopoulos GD, Friendewey D, Kellis M, Hart RP, Valenzuela DM, Arlotta P, Rinn JL (2013) Multiple knockout mouse models reveal lincRNAs are required for life and brain development. *Elife* 2:e01749. doi:10.7554/eLife.01749
158. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ, Owens GK (2015) KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nat Med* 21:628–637. doi:10.1038/nm.3866
159. Shimizu RT, Blank RS, Jervis R, Lawrenz-Smith SC, Owens GK (1995) The smooth muscle alpha-actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270:7631–7643
160. Simon MD, Pinter SF, Fang R, Sarma K, Rutenberg-Schoenberg M, Bowman SK, Kesner BA, Maier VK, Kingston RE, Lee JT (2013) High-resolution Xist binding maps reveal two-step spreading during X-chromosome inactivation. *Nature* 504:465–469. doi:10.1038/nature12719
161. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP (2002) The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 415:810–813. doi:10.1038/415810a
162. St Laurent G, Wahlestedt C, Kapranov P (2015) The landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet TIG* 31:239–251. doi:10.1016/j.tig.2015.03.007
163. Sun Q, Chen G, Streb JW, Long X, Yang Y, Stoeckert CJ Jr, Miano JM (2006) Defining the mammalian CArGome. *Genome Res* 16:197–207. doi:10.1101/gr.4108706
164. Sun SG, Zheng B, Han M, Fang XM, Li HX, Miao SB, Su M, Han Y, Shi HJ, Wen JK (2011) miR-146a and Kruppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. *EMBO Rep* 12:56–62. doi:10.1038/embor.2010.172
165. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, Dinger M, Mattick JS (2010) Non-coding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 220:126–139. doi:10.1002/path.2638
166. Talasila A, Yu H, Ackers-Johnson M, Bot M, van Berkel T, Bennett MR, Bot I, Sinha S (2013) Myocardin regulates vascular response to injury through miR-24/-29a and platelet-derived growth factor receptor-beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2355–2365. doi:10.1161/ATVBAHA.112.301000
167. Tang RH, Zheng XL, Callis TE, Stansfield WE, He J, Baldwin AS, Wang DZ, Selzman CH (2008) Myocardin inhibits cellular proliferation by inhibiting NF-kappaB(p65)-dependent cell cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:3362–3367. doi:10.1073/pnas.0705842105
168. Taurin S, Sandbo N, Yau DM, Sethakorn N, Kach J, Dulin NO (2009) Phosphorylation of myocardin by extracellular signal-regulated kinase. *J Biol Chem* 284:33789–33794. doi:10.1074/jbc.M109.048983
169. Tay Y, Kats L, Salmena L, Weiss D, Tan SM, Ala U, Karreth F, Poliseno L, Provero P, Di Cunto F, Lieberman J, Rigoutsos I, Pandolfi PP (2011) Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell* 147:344–357. doi:10.1016/j.cell.2011.09.029
170. Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR, Kanduri M, Gondor A, Grange T, Ohlsson R, Kanduri C (2004) An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the Kcnq1 imprinting control region. *Mol Cell Biol* 24:7855–7862. doi:10.1128/MCB.24.18.7855-7862.2004
171. Torella D, Iaconetti C, Catalucci D, Ellison GM, Leone A, Waring CD, Boicchio A, Vicinanza C, Aquila I, Curcio A, Condorelli G, Indolfi C (2011) MicroRNA-133 controls vascular smooth muscle cell phenotypic switch in vitro and vascular remodeling in vivo. *Circ Res* 109:880–893. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.240150
172. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329:689–693. doi:10.1126/science.1192002
173. Turczynska KM, Sadegh MK, Hellstrand P, Sward K, Albinsson S (2012) MicroRNAs are essential for stretch-induced vascular smooth muscle contractile differentiation via microRNA (miR)-145-dependent expression of L-type calcium channels. *J Biol Chem* 287:19199–19206. doi:10.1074/jbc.M112.341073
174. Uchida S, Dimmeler S (2015) Long noncoding RNAs in cardiovascular diseases. *Circ Res* 116:737–750. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.302521
175. Velasquez LS, Sutherland LB, Liu Z, Grinnell F, Kamm KE, Schneider JW, Olson EN, Small EM (2013) Activation of MRTF-A-dependent gene expression with a small molecule promotes myofibroblast differentiation and wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:16850–16855. doi:10.1073/pnas.1316764110
176. Vigetti D, Deleonibus S, Moretto P, Bowen T, Fischer JW, Grandoch M, Oberhuber A, Love DC, Hanover JA, Cinquetti R, Karousou E, Viola M, D'Angelo ML, Hascall VC, De Luca G, Passi A (2014) Natural antisense transcript for hyaluronan synthase 2 (HAS2-AS1) induces transcription of HAS2 via protein O-GlcNAcylation. *J Biol Chem* 289:28816–28826. doi:10.1074/jbc.M114.597401
177. Villeneuve LM, Kato M, Reddy MA, Wang M, Lanting L, Natarajan R (2010) Enhanced levels of microRNA-125b in vascular smooth muscle cells of diabetic db/db mice lead to increased inflammatory gene expression by targeting the histone methyltransferase Suv39h1. *Diabetes* 59:2904–2915. doi:10.2337/db10-0208
178. Visel A, Zhu Y, May D, Afzal V, Gong E, Attanasio C, Blow MJ, Cohen JC, Rubin EM, Pennacchio LA (2010) Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature* 464:409–412. doi:10.1038/nature08801
179. Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, Sinha S, Somlyo AP, Somlyo AV, Owens GK (2004) L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circ Res* 95:406–414. doi:10.1161/01.RES.0000138582.36921.9e
180. Wang D, Chang PS, Wang Z, Sutherland L, Richardson JA, Small E, Krieg PA, Olson EN (2001) Activation of cardiac gene expression by myocardin, a transcriptional cofactor for serum response factor. *Cell* 105:851–862
181. Wang DZ, Li S, Hockemeyer D, Sutherland L, Wang Z, Schmitt G, Richardson JA, Nordheim A, Olson EN (2002) Potentiation of serum response factor activity by a family of myocardin-related transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14855–14860. doi:10.1073/pnas.222561499
182. Wang H, Jiang M, Xu Z, Huang H, Gong P, Zhu H, Ruan C (2015) miR-146b-5p promotes VSMC proliferation and migration. *Int J Clin Exp Pathol* 8:12901–12907
183. Wang J, Yan CH, Li Y, Xu K, Tian XX, Peng CF, Tao J, Sun MY, Han YL (2013) MicroRNA-31 controls phenotypic modulation of

- human vascular smooth muscle cells by regulating its target gene cellular repressor of E1A-stimulated genes. *Exp Cell Res* 319: 1165–1175. doi:10.1016/j.yexcr.2013.03.010
184. Wang P, Xue Y, Han Y, Lin L, Wu C, Xu S, Jiang Z, Xu J, Liu Q, Cao X (2014) The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science* 344:310–313. doi:10.1126/science.1251456
 185. Wang S, Zhang X, Yuan Y, Tan M, Zhang L, Xue X, Yan Y, Han L, Xu Z (2015) BRG1 expression is increased in thoracic aortic aneurysms and regulates proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the long non-coding RNA HIF1A-AS1 in vitro. *Eur J Cardiothorac Surg* 47:439–446. doi:10.1093/ejcts/ezu215
 186. Wang YS, Wang HY, Liao YC, Tsai PC, Chen KC, Cheng HY, Lin RT, Juo SH (2012) MicroRNA-195 regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointimal formation. *Cardiovasc Res* 95:517–526. doi:10.1093/cvr/cvs223
 187. Wang Z, Wang DZ, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN (2004) Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature* 428: 185–189. doi:10.1038/nature02382
 188. White SL, Low RB (1996) Identification of promoter elements involved in cell-specific regulation of rat smooth muscle myosin heavy chain gene transcription. *J Biol Chem* 271:15008–15017
 189. Willingham AT, Orth AP, Batalov S, Peters EC, Wen BG, Aza-Blanc P, Hogenesch JB, Schultz PG (2005) A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* 309:1570–1573. doi:10.1126/science.1115901
 190. Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL (2009) Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* 23: 1494–1504. doi:10.1101/gad.1800909
 191. Wu G, Cai J, Han Y, Chen J, Huang ZP, Chen C, Cai Y, Huang H, Yang Y, Liu Y, Xu Z, He D, Zhang X, Hu X, Pinello L, Zhong D, He F, Yuan GC, Wang DZ, Zeng C (2014) LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation* 130:1452–1465. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011675
 192. Wu WH, Hu CP, Chen XP, Zhang WF, Li XW, Xiong XM, Li YJ (2011) MicroRNA-130a mediates proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertension. *Am J Hypertens* 24:1087–1093. doi: 10.1038/ajh.2011.116
 193. Xie C, Huang H, Sun X, Guo Y, Hamblin M, Ritchie RP, Garcia-Barrio MT, Zhang J, Chen YE (2011) MicroRNA-1 regulates smooth muscle cell differentiation by repressing Kruppel-like factor 4. *Stem Cells Dev* 20:205–210. doi:10.1089/scd.2010.0283
 194. Xin M, Small EM, Sutherland LB, Qi X, McAnally J, Plato CF, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2009) MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev* 23: 2166–2178. doi:10.1101/gad.1842409
 195. Xu F, Ahmed AS, Kang X, Hu G, Liu F, Zhang W, Zhou J (2015) MicroRNA-15b/16 attenuates vascular neointima formation by promoting the contractile phenotype of vascular smooth muscle through targeting YAP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:2145–2152. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305748
 196. Xu J, Li L, Yun HF, Han YS (2015) MiR-138 promotes smooth muscle cells proliferation and migration in db/db mice through down-regulation of SIRT1. *Biochem Biophys Res Commun* 463:1159–1164. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.076
 197. Yang J, Li X, Morrell NW (2014) Id proteins in the vasculature: from molecular biology to cardiopulmonary medicine. *Cardiovasc Res* 104:388–398. doi:10.1093/cvr/cvu215
 198. Yang WJ, Yang DD, Na S, Sandusky GE, Zhang Q, Zhao G (2005) Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. *J Biol Chem* 280:9330–9335. doi:10.1074/jbc.M413394200
 199. Yoshida T, Hoofnagle MH, Owens GK (2004) Myocardin and Prx1 contribute to angiotensin II-induced expression of smooth muscle alpha-actin. *Circ Res* 94:1075–1082. doi:10.1161/01.RES.0000125622.46280.95
 200. Yoshida T, Kaestner KH, Owens GK (2008) Conditional deletion of Kruppel-like factor 4 delays downregulation of smooth muscle cell differentiation markers but accelerates neointimal formation following vascular injury. *Circ Res* 102:1548–1557. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.176974
 201. Yoshida T, Kawai-Kowase K, Owens GK (2004) Forced expression of myocardin is not sufficient for induction of smooth muscle differentiation in multipotential embryonic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1596–1601. doi:10.1161/01.ATV.0000137190.63214.c5
 202. Yoshida T, Sinha S, Dandre F, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, Kremer BE, Wang DZ, Olson EN, Owens GK (2003) Myocardin is a key regulator of CARG-dependent transcription of multiple smooth muscle marker genes. *Circ Res* 92:856–864. doi:10.1161/01.RES.0000068405.49081.09
 203. Yu X, Zhang L, Wen G, Zhao H, Luong LA, Chen Q, Huang Y, Zhu J, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q (2015) Upregulated sirtuin 1 by miRNA-34a is required for smooth muscle cell differentiation from pluripotent stem cells. *Cell Death Differ* 22:1170–1180. doi: 10.1038/cdd.2014.206
 204. Zhang B, Gunawardane L, Niazi F, Jahanbani F, Chen X, Valadkhan S (2014) A novel RNA motif mediates the strict nuclear localization of a long noncoding RNA. *Mol Cell Biol* 34: 2318–2329. doi:10.1128/MCB.01673-13
 205. Zhang M, Ren Y, Wang Y, Wang R, Zhou Q, Peng Y, Li Q, Yu M, Jiang Y (2015) Regulation of smooth muscle contractility by competing endogenous mRNAs in intracranial aneurysms. *J Neuropathol Exp Neurol* 74:411–424. doi:10.1097/NEN.0000000000000185
 206. Zhao H, Wen G, Huang Y, Yu X, Chen Q, Afzal TA, le Luong A, Zhu J, Shu Y, Zhang L, Xiao Q (2015) MicroRNA-22 regulates smooth muscle cell differentiation from stem cells by targeting methyl CpG-binding protein 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35:918–929. doi:10.1161/ATVBAHA.114.305212
 207. Zhao Y, Feng G, Wang Y, Yue Y, Zhao W (2014) Regulation of apoptosis by long non-coding RNA HIF1A-AS1 in VSMCs: implications for TAA pathogenesis. *Int J Clin Exp Pathol* 7:7643–7652
 208. Zhao Y, Samal E, Srivastava D (2005) Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436:214–220. doi:10.1038/nature03817
 209. Zheng L, Xu CC, Chen WD, Shen WL, Ruan CC, Zhu LM, Zhu DL, Gao PJ (2010) MicroRNA-155 regulates angiotensin II type 1 receptor expression and phenotypic differentiation in vascular adventitial fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 400:483–488. doi:10.1016/j.bbrc.2010.08.067
 210. Zhou J, Li YS, Nguyen P, Wang KC, Weiss A, Kuo YC, Chiu JJ, Shyy JY, Chien S (2013) Regulation of vascular smooth muscle cell turnover by endothelial cell-secreted microRNA-126: role of shear stress. *Circ Res* 113:40–51. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.280883

Review Article

Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling

Núria Coll-Bonfill¹, Melina Mara Musri^{1,3}, Victor Ivo^{1,2}, Joan Albert Barberà^{1,2}, Olga Tura-Ceide^{1,2}

¹Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain; ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, Spain; ³Instituto de Investigación Médica M, Y M. Ferreyra, INIMEC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

Received October 27, 2014; Accepted October 31, 2014; Epub March 15, 2015; Published March 31, 2015

Abstract: Pulmonary artery remodelling it is a major feature of pulmonary hypertension (PH). It is characterised by cellular and structural changes of the pulmonary arteries causing higher pulmonary vascular resistance and right ventricular failure. Abnormal deposition of smooth muscle-like (SM-like) cells in normally non-muscular, small diameter vessels and a deregulated control of endothelial cells are considered pathological features of PH. The origin of the SM-like cells and the mechanisms underlying the development and progression of this remodelling process are not understood. Endothelial cells within the intima may migrate from their organised layer of cells and transition to mesenchymal or SM-like phenotype in a process called endothelial-mesenchymal transition (EnMT). Traditionally, Waddington's epigenetic landscape illustrates that fates of somatic cells are progressively determined to compulsorily follow a downhill differentiation pathway. EnMT induces the transformation of cells with stem cell traits, therefore contrasting Waddington's theory and confirming that cell fate seems to be far more flexible than previously thought. The prospect of therapeutic inhibition of EnMT to delay or prevent PH may represent a promising new treatment modality.

Keywords: Endothelial to mesenchymal transition, remodelling, endothelial cells, pulmonary hypertension, cellular reprogramming

Pulmonary hypertension

Pulmonary hypertension (PH) is a complex and progressive disease characterised by increased blood pressure in pulmonary arteries. Hemodynamically, it is defined by a *mean* pulmonary artery pressure at rest exceeding 25 mmHg [1]. Pulmonary vessel remodelling, which consists of intimal, medial and adventitial hypertrophy, leads to a reduction of the vascular lumen [2]. This causes an increase in pulmonary resistance, severe PH, right ventricular failure, and early death [3]. Currently, there is no cure for PH, but available treatments can lessen symptoms and improve quality of life. PH can occur due to genetic or sporadic causes, but the exact basis of PH remain unknown [4, 5].

Pulmonary arterial remodelling

Pulmonary artery remodelling it is a major feature of PH. It is characterised by cellular and structural changes affecting all three layers of the vessel wall of the pulmonary arteries [6, 7]. Common pulmonary vascular remodelling changes in PH include increased intimal and/or medial stiffening and thickening, elevated expression of smooth muscle α -actin, collagen synthesis/deposition, and inflammation [8]. Abnormal deposition of smooth muscle-like (SM-like) cells in normally non-muscular, small diameter vessels and a deregulated control of endothelial cells are considered important pathological features of PH [9]. Also, increased production of extracellular matrix proteins, with deposition of collagen and elastin contribute to lumen narrowing and PH [10]. It is this remodel-

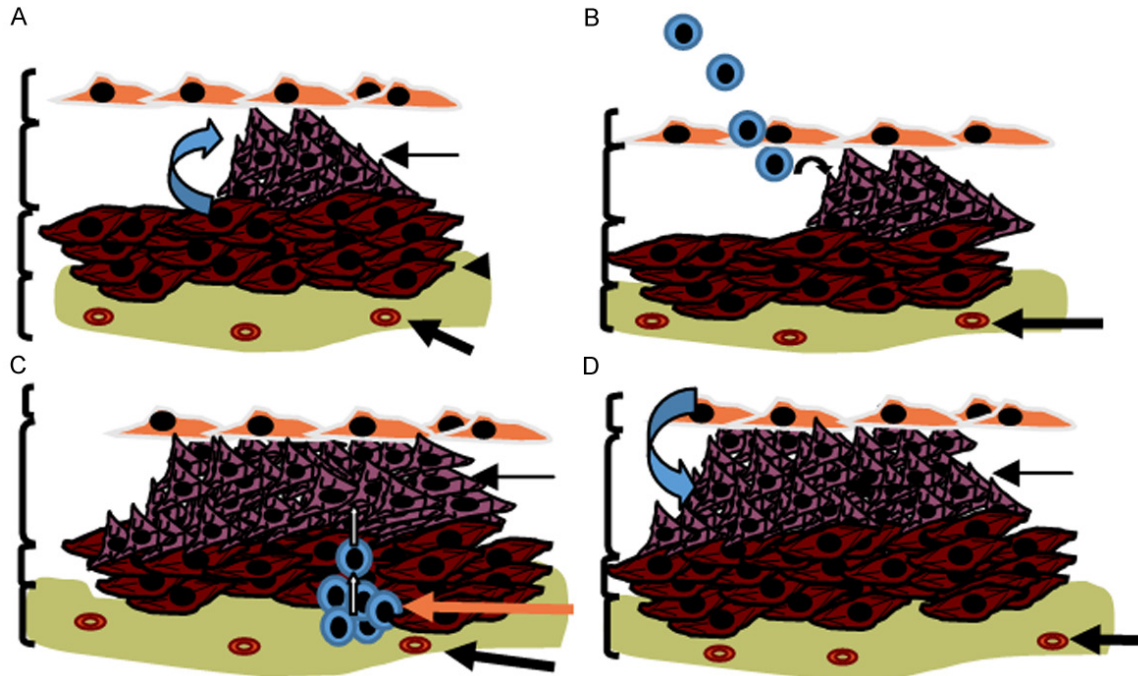


Figure 1. The origin of the SM-like cells in pulmonary arterial remodelling. Resident vascular smooth muscle cells (SMCs) from the medial layer retain high cell plasticity and, under specific circumstances, undergo phenotypic switch towards a synthetic or “de-differentiated” state (A). Differentiated SMCs become highly proliferative and migratory. Circulating progenitor cells could be recruited to sites of vascular injury and assume a SM-like phenotype (B). Resident progenitor cells in the adventitia may also serve as a source of SM-like cells and contribute to the pathophysiological changes in vascular structure (C). Additionally, Endothelial cells within the intima may migrate from their organised layer of cells and transition to mesenchymal or SM-like phenotype in a process called endothelial-mesenchymal transition (EnMT) (D).

ling process inside the pulmonary vessels that is responsible for elevation of pulmonary vascular resistance, progressive PH, right ventricular failure and finally death [11].

The origin of the SM-like cells and the mechanisms underlying the development and progression of this remodelling process are not completely understood. It is been thought that muscularisation of the intimal layer of the vessel wall is caused by proliferation of resident vascular smooth muscle cells of the medial layer which migrate to the intima [12, 13] (**Figure 1A**). Smooth muscle cells of the medial layer retain high cell plasticity and, under specific circumstances, can undergo phenotypic switch towards a synthetic or “de-differentiated” state. De-differentiated SMCs express high levels of extracellular matrix components and reduced expression of SMC contractile proteins. In contrast to differentiated SMCs, de-differentiated SMCs become highly proliferative and migratory [14, 15]. Recently, other possible sources of SM-like cells in the intimal layer of pulmonary vessels have been postu-

lated. Circulating progenitor cells have been shown to be recruited to sites of vascular injury and assume a SM-like phenotype [16-19] (**Figure 1B**). Resident progenitor cells present in the adventitia have also been postulated to be involved in vascular remodelling [20] (**Figure 1C**). Additionally, resident endothelial cells within the intima may delaminate from their organised layer of cells in the vessel lining, transition to mesenchymal or SM-like phenotype in a process called endothelial-mesenchymal transition (EnMT) and migrate to their underlying tissue [13, 21] (**Figure 1D**). *In vitro*, these altered cells have an indistinguishable morphology from de-differentiated SMCs and express abundant extracellular matrix proteins. In this review we will go over the evidences for EnMT of vascular endothelial cells and its potential implications in PH.

Endothelial-mesenchymal transition (EnMT)

Endothelial cells may contribute to vascular remodelling through EnMT. This is a process of endothelial cell “*transformation*” into mesen-

chymal cells, by which endothelial cells lose their endothelial characteristics and gain a spindle shaped mesenchymal-like phenotype [22, 23]. EnMT is a central process during embryonic development [24-26]. In heart development, endocardial cells with a clearly endothelial phenotype are able to give rise to mesenchymal heart cushion cells through a process of EnMT [27-29]. Arciniegas *et al*, have also shown that EnMT is an important event in aortic and pulmonary artery development [30] and in the development of the normal arterial intima [31]. Moreover, morphological studies in human embryos suggest that EnMT also occurs during the maturation of both arteries and veins [32].

Recently, some studies have shown that EnMT could also happen in adult life in a variety of pathologic settings, including PH [33, 34], atherosclerosis [35] and wound healing [36]. In 1997, Romero *et al* showed that capillary endothelial cells could undergo mesenchymal transition in response to chronic inflammatory stimuli [37]. Additionally, a number of *in vitro* studies have demonstrated that endothelial cells from a variety of vascular beds retain the ability to transition into mesenchymal or SM-like cells under specific culture conditions [38, 42].

A loss of cell-to-cell contact seems to be a triggering step in the development of EnMT [43]. Cell-cell adhesion glycoprotein, VE-cadherin, plays an important role in vascular biology by controlling the cohesion and organization of cell-cell junctions. The loss of expression of VE-cadherin, consistently preceded endothelial phenotype downregulation and SM-like transformation [44].

Signalling during EnMT

There are several key signalling pathways contributing to the remodelling process and to date, a number of studies have demonstrated the induction of EnMT *in vitro*. It has been suggested that the TGF- β 1 signalling pathway is involved in EnMT [45]. Both mouse and human endothelial cells cultured in the presence of TGF- β 1 have shown SM-like cell morphology and an up-regulation of α -SM actin [46-48]. Recently, studies have shown that both TGF- β 1 and Wnt-signalling pathways could synergize in the EnMT process [49, 50]. Moreover, in addition to TGF- β 1 and Wnt-signalling pathways, the

Notch pathway has also been shown to be involved in both vascular development and intimal lesion formation processes [51-53]. Although it is known that all these signalling pathways contribute to EnMT, it is not clear whether Notch, Wnt, TGF- β 1, or the combination of all pathways, provide the initiation signal for EnMT *in vivo* [54]. Furthermore, it is likely that other signalling pathways such as VEGF, NFAT and BMP, which interact with TGF- β 1 and Notch signalling, also mediate EnMT [55].

Despite these signalling studies, the transcriptional networks which mediate EnMT remain largely unidentified. Recently, the role of the Snail family of transcriptional repressors has been highlighted in control of different transcriptional programs of mesenchymal stem cell differentiation [56]. Snail proteins including Slug are involved in a broad spectrum of biological functions including epithelial to mesenchymal transition (EMT), cell differentiation, cell motility, cell-cycle regulation and apoptosis. In the context of EnMT, Snail and Slug play a critical role in disrupting cell-cell junctions and down-regulating VE-cadherin gene expression [57-59].

EMT/EnMT

EnMT is related to the more generally recognized mechanism of somatic cell plasticity; epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) [60]. EMT involves a phenotypic cellular switch, in this case, from an epithelial to mesenchymal phenotype [61]. EnMT, EMT and its reverse pathway, mesenchymal to epithelial transition (MET) are key biological processes that occur naturally during embryonic life [62, 63]. Cellular switching from an epithelial to mesenchymal phenotype (EMT), and conversely from a mesenchymal to epithelial phenotype (MET) are important biologic programs fundamental to the generation of several complex body patterns throughout evolution [64, 65]. EMT plays a central role in germ layer specification (endoderm, ectoderm and mesoderm) and a range of different recurrent EMT/MET cycles occur before final organ formation [66]. In lungs for example, EMT is a natural process that exists to allow airway branching during fetal development. During cardiac development, EMT/MET is crucial in valve formation and heart septation [67]. In other organs, such as the kidney, suc-

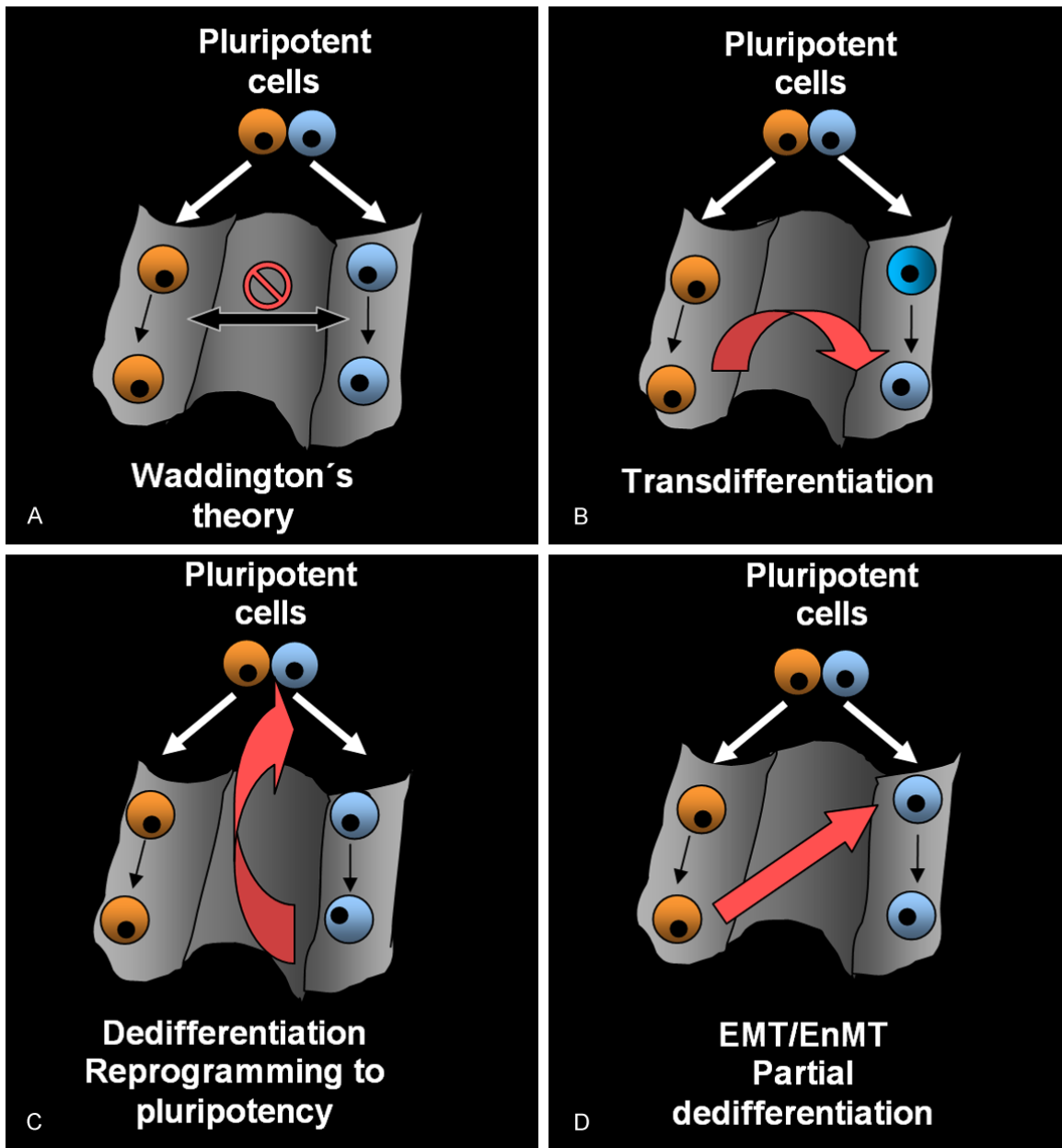


Figure 2. Cellular differentiation and reprogramming patterns. Waddington's epigenetic landscape. Somatic cells take on a specific fate by compulsorily progressing from the pluripotent state to a terminal differentiated state (A). Transdifferentiation. A mature cell switches its phenotype and function to that of another mature differentiated cell type without undergoing an intermediate pluripotent state or becoming a progenitor cell (B). Dedifferentiation of reprogramming to pluripotency. Differentiated cells return to an immature state and regain pluripotency (C). EMT/EnMT; partial dedifferentiation. Cells change their specific fate, dedifferentiate and acquire a more immature, proliferative phenotype from another somatic lineage without converting to a pluripotent cell (D).

cessive phases of EMT/MET are necessary to ultimately give rise to nephrons or nephric ducts [68]. Moreover in the adult, EMT contributes to pathology of tissue fibrosis, tumour progression, and tumour metastasis, which results when cells delaminate from the primary tumour, allows them to migrate [69, 70].

Cellular reprogramming

Traditionally, Waddington's epigenetic landscape illustrates that fates of somatic cells are progressively determined to compulsorily follow a downhill differentiation pathway [71] (**Figure 2A**). As such any reversal of cell differentiation

status would require external intervention in nuclear function such as nuclear transfer [72, 73] or the introduction of several transcription factors [74]. The plasticity of somatic cell fate is a complex concept that has evolved through decades of research. It is currently known that some somatic cells seem to possess a greater plasticity when exposed to certain stimuli. Smith *et al*, showed in 1998 that Oct4 transcription factor is required for maintaining mouse embryonic stem cell pluripotency [75], and in 2006 Takahashi and Yamanaka *et al*, were able to reprogram mouse fibroblasts to induced pluripotent stem cells (iPS) using 4 transcription factors (Sox2, Klf4, Oct4 and c-Myc) [76]. EMT and EnMT are examples of remarkable somatic cell plasticity occurring naturally though organogenesis. There is current evidence that cells undergoing EMT/EnMT acquire stem cell properties [77, 78] and it has recently been postulated that MET is a key cellular mechanism required for transforming somatic cells toward the generation of induced pluripotent stem cells [79]. Li *et al*, showed that while Sox2/Oct4 upregulation suppresses the EMT mediator Snail, c-Myc downregulates TGF- β 1 and TGF- β receptor 2, whilst, Klf4 induces the expression of epithelial genes including E-cadherin [80]. These recent findings are important and raise many questions. They oppose Waddington's epigenetic view in which a fully differentiated cell had completed a downhill journey into a valley from which it could not then escape. Cell fate seems now to be far more flexible than previously thought [81].

Transdifferentiation refers to a process where one mature cell switches its phenotype and function to that of another mature differentiated cell type without undergoing an intermediate pluripotent state or becoming a progenitor cell [82] (**Figure 2B**). Davis *et al*, showed in 1987, that mouse embryonic fibroblasts could transdifferentiate directly into mature myoblasts [83]. EMT/EnMT induces the generation of cells with stem cell traits, thus it does not fulfil Takahashi's definition of transdifferentiation. Dedifferentiation is a process which induces cell rejuvenation. It refers to a process where cells travel back up their differentiation path, to become more immature and finally convert into a pluripotent cell [84] (**Figure 2C**). EMT/EnMT could be considered an initial stage

of cellular dedifferentiation or reprogramming processes where cells dedifferentiate and acquire a more immature, proliferative phenotype but do not convert to a pluripotent cell. Cellular reprogramming and change of cell fate decisions through EMT/EnMT provides new ways to traverse across Waddington's epigenetic landscape (**Figure 2D**). As EMT/EnMT are essential and occurs frequently during embryonic development one could postulate that cellular reprogramming occurs spontaneously in the embryo and in certain adult pathological conditions.

Reversibility of EMT/EnMT. Future perspectives

During embryogenesis, EMT and its reverse process, MET, occur spontaneously during organ morphogenesis [85]. However, less is known about the reversibility of EnMT [86]. It has been suggested that endothelial cells transformed to a more SM-like cell phenotype could be restored by administration of FGF [87]. Recently our group have shown that *in vitro*, following withdrawal of TNF- α , SM-like cells acquired a normal phenotype (manuscript submitted). However, more studies are necessary to determine the reversibility of this EnMT process *in vitro* and *in vivo*.

It is accepted that EMT/EnMT occurs not only during embryonic development but also in the pathogenesis of various cardiovascular diseases such as heart failure and PH. The prospect of therapeutic manipulation of EnMT/EMT in the treatment of these conditions is particularly attractive [88, 89]. In particular, therapies directed at inhibiting EnMT to delay or prevent PH, may represent a promising new treatment modality. Nevertheless, additional studies are needed to identify the precise molecular mechanism of EnMT in disease, to provide novel insights into the mechanisms of such diseases and to determine which signalling components might be viable therapeutic targets.

Acknowledgements

The authors would like to thank K. Samuel for her always faithful advice.

Address correspondence to: Tura-Ceide O, Institut D'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Hospital Clínic de Barcelona, Villarroel 170, Bar-

EnMT and vascular remodelling

celona 08036, Spain. Tel: 34-93-2275400 (4808);
E-mail: tura@clinic.ub.es

References

- [1] McLaughlin VV, McGoon MD. Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 114: 1417-31.
- [2] Hopkins N, Mcloughlin P. The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis? *J Anat* 2002; 201: 335-48.
- [3] Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2002; 20: 1559-72.
- [4] Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1997; 336: 111-7.
- [5] Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2013; 91: 297-309.
- [6] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [7] Hassoun PM. Deciphering the "matrix" in pulmonary vascular remodelling. *Eur Respir J* 2005; 25: 778-9.
- [8] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [9] Yi ES, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, Hansen LA, Park K, Friedman PJ. Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 1577-86.
- [10] Hassoun PM. Deciphering the "matrix" in pulmonary vascular remodelling. *Eur Respir J* 2005; 25: 778-9.
- [11] Jungebluth P, Macchiarini P. Stem cell-based therapy and regenerative approaches to diseases of the respiratory system. *Br Med Bull* 2011; 99: 169-87.
- [12] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [13] Fleenor BS, Marshall KD, Rippe C, Seals DR. Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation. *J Vasc Res* 2012; 49: 59-64.
- [14] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75: 487-517.
- [15] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84: 767-801.
- [16] Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res* 2010; 88: 502-11.
- [17] Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van RN, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 2006; 168: 659-69.
- [18] Liu Y, Sinha S, McDonald OG, Shang Y, Hoofnagle MH, Owens GK. Kruppel-like factor 4 abrogates myocardium-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem* 2005; 280: 9719-27.
- [19] Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1008-14.
- [20] Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 134-45.
- [21] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [22] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [23] Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5(Suppl 1 Proceedings of Fibroproliferative disorders: from biochemical analysis to targeted therapiesPetro E Petrides and David Brenner): S7.
- [24] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.

EnMT and vascular remodelling

- [25] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 1795-808.
- [26] Markwald RR, Fitzharris TP, Smith WN. Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev Biol* 1975; 42: 160-80.
- [27] Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 2004; 95: 459-70.
- [28] Eisenberg LM, Markwald RR. Molecular regulation of atrioventricular valvuloseptal morphogenesis. *Circ Res* 1995; 77: 1-6.
- [29] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, Dejana E. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 2004; 166: 359-67.
- [30] Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, Ramirez R. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 2005; 12: 193-200.
- [31] Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, Ramirez R. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 2005; 12: 193-200.
- [32] Hall SM, Hislop AA, Haworth SG. Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 26: 333-40.
- [33] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [34] Zhu P, Huang L, Ge X, Yan F, Wu R, Ao Q. Trans-differentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int J Exp Pathol* 2006; 87: 463-74.
- [35] Mironov AA, Rekhter MD, Kolpakov VA, Andreeva ER, Polishchuk RS, Bannykh SI, Filippov SV, Peretjatko LP, Kulida LV, Orekhov AN. Heterogeneity of smooth muscle cells in embryonic human aorta. *Tissue Cell* 1995; 27: 31-8.
- [36] Lee JG, Kay EP. FGF-2-induced wound healing in corneal endothelial cells requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1376-86.
- [37] Romero LI, Zhang DN, Herron GS, Karasek MA. Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 1997; 173: 84-92.
- [38] Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992; 103: 521-9.
- [39] Cooley BC, Nevado J, Mellad J, Yang D, St HC, Negro A, Fang F, Chen G, San H, Walts AD, Schwartzbeck RL, Taylor B, Lanzer JD, Wragg A, Elagha A, Beltran LE, Berry C, Feil R, Virmani R, Ladich E, Kovacic JC, Boehm M. TGF-beta signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med* 2014; 6: 227ra34.
- [40] Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal trans-differentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002; 90: 1189-96.
- [41] Ishisaki A, Hayashi H, Li AJ, Imamura T. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 1303-9.
- [42] Qiao L, Nishimura T, Shi L, Sessions D, Thrasher A, Trudell JR, Berry GJ, Pearl RG, Kao PN. Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension. *Circulation* 2014; 129: 692-703.
- [43] Cavarretta E, Latronico MV, Condorelli G. Endothelial-to-mesenchymal transition and microRNA-21: the game is on again. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 165-6.
- [44] Cavarretta E, Latronico MV, Condorelli G. Endothelial-to-mesenchymal transition and microRNA-21: the game is on again. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 165-6.
- [45] Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992; 103: 521-9.
- [46] Diez M, Musri MM, Ferrer E, Barbera JA, Peinado VI. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res* 2010; 88: 502-11.
- [47] van Meeteren LA, ten DP. Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 177-86.
- [48] Wang H, Radjendirane V, Wary KK, Chakrabarty S. Transforming growth factor beta regulates cell-cell adhesion through extracellular matrix remodeling and activation of focal adhesion kinase in human colon carcinoma Moser cells. *Oncogene* 2004; 23: 5558-61.
- [49] Aisagbonhi O, Rai M, Ryzhov S, Atria N, Feoktistov I, Hatzopoulos AK. Experimental myocardial infarction triggers canonical Wnt signaling and endothelial-to-mesenchymal transition. *Dis Model Mech* 2011; 4: 469-83.

EnMT and vascular remodelling

- [50] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iur-laro M, Piccolo S, Dejana E. Beta-catenin is re-quired for endothelial-mesenchymal transforma-tion during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 2004; 166: 359-67.
- [51] Iso T, Hamamori Y, Keddes L. Notch signaling in vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 543-53.
- [52] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iur-laro M, Piccolo S, Dejana E. Beta-catenin is re-quired for endothelial-mesenchymal transforma-tion during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 2004; 166: 359-67.
- [53] Nosedá M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pol-let I, Montpetit R, Shahidi R, Dorovini-Zis K, Li L, Beckstead B, Durand RE, Hoodless PA, Kar-san A. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endo-thelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res* 2004; 94: 910-7.
- [54] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-9.
- [55] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-9.
- [56] Torreggiani E, Lisignoli G, Manferdini C, Lam-bertini E, Penolazzi L, Vecchiatini R, Gabusi E, Chieco P, Facchini A, Gambari R, Piva R. Role of Slug transcription factor in human mesenchy-mal stem cells. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 740-51.
- [57] Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: im-plications in development and cancer. *Develop-ment* 2005; 132: 3151-61.
- [58] Conacci-Sorrell M, Simcha I, Ben-Yedidia T, Blechman J, Savagner P, Ben-Ze'ev A. Autoreg-ulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J Cell Biol* 2003; 163: 847-57.
- [59] Nieto MA. The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 155-66.
- [60] van Meeteren LA, ten DP. Regulation of endo-thelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 2012; 347: 177-86.
- [61] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchy-mal transition: potential contribution to vascu-lar remodeling in chronic pulmonary hyperten-sion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [62] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchy-mal transition: potential contribution to vascu-lar remodeling in chronic pulmonary hyperten-sion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [63] Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epi-thelial-mesenchymal transitions in develop-ment and disease. *Cell* 2009; 139: 871-90.
- [64] Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchy-mal transition: potential contribution to vascu-lar remodeling in chronic pulmonary hyperten-sion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1-L8.
- [65] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endo-thelial-to-mesenchymal transition: from cardio-vascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 1795-808.
- [66] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endo-thelial-to-mesenchymal transition: from cardio-vascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 795-808.
- [67] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endo-thelial-to-mesenchymal transition: from cardio-vascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 1795-808.
- [68] Yoshino T, Saito D, Tadokoro R, Takahashi Y. In vivo gene manipulations of epithelial cell sheets: a novel model to study epithelial-to-mesenchymal transition. *Dev Growth Differ* 2011; 53: 378-88.
- [69] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mech-anisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178-96.
- [70] Ocana OH, Nieto MA. Epithelial plasticity, stem-ness and pluripotency. *Cell Res* 2010; 20: 1086-8.
- [71] Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; 505: 641-7.
- [72] Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 1962; 4: 256-73.
- [73] Wakayama T, Perry AC, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-74.
- [74] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of plurip-otent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- [75] Smith A. Cell therapy: in search of pluripotency. *Curr Biol* 1998; 8: R802-R804.
- [76] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of plurip-otent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.

EnMT and vascular remodelling

- [77] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 1795-808.
- [78] McDonald OG, Wu H, Timp W, Doi A, Feinberg AP. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18: 867-74.
- [79] Esteban MA, Bao X, Zhuang Q, Zhou T, Qin B, Pei D. The mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22: 423-8.
- [80] Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 51-63.
- [81] Takahashi K. Cellular reprogramming—lowering gravity on Waddington’s epigenetic landscape. *J Cell Sci* 2012; 125: 2553-60.
- [82] Takahashi K. Cellular reprogramming—lowering gravity on Waddington’s epigenetic landscape. *J Cell Sci* 2012; 125: 2553-60.
- [83] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 87-1000.
- [84] Takahashi K. Cellular reprogramming—lowering gravity on Waddington’s epigenetic landscape. *J Cell Sci* 2012; 125: 2553-60.
- [85] Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005; 233: 706-20.
- [86] Cavarretta E, Latronico MV, Condorelli G. Endothelial-to-mesenchymal transition and microRNA-21: the game is on again. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 165-6.
- [87] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-9.
- [88] Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 2012; 125: 1795-808.
- [89] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer* 2008; 99: 1375-9.