

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Václav Tichý

Role mikroRNA v hypoxické plicní hypertenzi
The role of microRNA in hypoxic pulmonary hypertension

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Václav Hampl, DrSc.

Praha, 2017

Poděkování

Rád bych poděkoval prof. RNDr. Václavu Hamplovi, DrSc. za odborné konzultace a podnětná setkání. Z těch jsem si odnesl nejen poznámky k práci, ale i nadšení do další vědecké činnosti.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 12. 5. 2017

Václav Tichý

Abstrakt

Plicní arteriální hypertenze (PAH) je devastující progresivní choroba, která výrazně zhoršuje kvalitu života a má průměrnou dobu dožití jen několik let. Jedním z důležitých iniciátorů PAH je chronická hypoxie. Po více než šesti desetiletích výzkumu, započatém v roce 1946 von Eulerem a Liljestrandem, byla pro tuto patologii identifikována nová skupina potenciálních regulátorů, která začala být během posledních pěti let intenzivně studována. Jedná se o vysoce konzervované molekuly patřící k nekódujícím RNA. Tyto cca 22 nukleotidů dlouhé mikroRNA (miRNA) fungují jako negativní regulátory exprese různých proteinů. Mnoho z nich reguluje tradiční signální dráhy hypoxické PAH (HIF-1, BMPR2) a miRNA jsou naopak regulovány dalšími signalizacemi. To dohromady vytváří spletitou síť přímých i nepřímých interakcí a zpětnovazebných smyček, kterou je třeba pro porozumění hypoxické PAH studovat. Tato práce shrnuje poznatky o důležitých miRNA molekulách z posledních let a osvětluje část těchto regulačních mechanismů na jednotlivých miRNA molekulách (miR-17-92, miR-21, miR-210, miR-204 a miR143/145).

Klíčová slova: plíce, hypoxie, plicní cirkulace, hypoxická plicní hypertenze, mikroRNA

Abstract

Pulmonary Arterial hypertension (PAH) is a devastating progressive disease that significantly decreases quality of life and has the average survival rate of only few years. One of the significant initiators of PAH is chronic hypoxia. After more than six decades of research that was initiated in 1946 by von Euler and Liljestrand, a new group of potential regulators of this pathology was discovered, that became heavily studied in the last five years. They are highly conserved molecules belonging to non-coding RNA. These 19-23 nucleotides long microRNA (miRNA) act as negative regulators of expression on various proteins. Many of them regulate traditional signalling pathways of hypoxic PAH (HIF-1, BMPR2) and miRNA is in turn regulated by other signalizations. Together, that creates an interconnected network of direct and indirect interactions and feedback loops, that we need to study in order to understand hypoxic PAH. This thesis summarizes findings about important miRNA molecules from the last few years and elucidates part of these regulatory mechanisms on several miRNA molecules (miR-17-92, miR-21, miR-210, miR-204 a miR143/145).

Keywords: lungs, hypoxia, pulmonary circulation, hypoxic pulmonary hypertension, microRNA

Seznam použitých zkratek

ADMA	Asymetrický dimethylarginin
Akt	Protein kináza Akt
BMP	kostní morfogenetický protein, Bone Morphogenic Protein
BMPR2	BMP receptor 2
BRD4	Bromodoménu-obstahující protein 4, Bromodomain-containing protein 4
DDAH	Dimethylarginin dimethylaminohydroláza
E2F3	E2F transkripční faktor 3
ET-1	Endotelin 1
HIF	Hypoxií-indukovaný faktor, Hypoxia-Inducible Factor
HPV	Hypoxická plicní vazokonstrikce
IL-6	Interleukin 6
ISCU1, ISCU2	Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme 1, 2
miRNA, miR	mikroRNA
MKP	MAP kinázová fosfatáza
PAEC	buňky endotelu plicních tepen, Pulmonary Artery Endothelial Cell
PAH	Plicní arteriální hypertenze,
PARP-1	Poly (ADP Ribóza) polymeráza
PASMC	buňky hladké svaloviny plicních tepen, Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell
PDCD4	protein programované buněčné smrti 4, Programmed Cell Death Protein 4
PDGF	Růstový faktor krevních destiček, Platelet-Derived Growth Factor
PDLIM	PDZ a LIM domána
PHD2	protein obsahující prolyl hydroxylázovou doménu, Prolyl Hydroxylase Domain-Containing Protein 2
PKB	Protein kináza B
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qPCR	kvantitativní PCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction
RhoB	RHO GTPáza B
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
ROS	Kyslíkové radikály, Reactive Oxygen Species
Six1	Sineoculis homeobox homolog 1
SMAD9	Mothers Against Decapentaplegic homolog 9
SOD2, SOD3	Superoxid dismutáza 2, 3
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF	Transforming Growth Factor
TRPM3	Transient Receptor Potential cation channel 3
UTR	nepřekládaný úsek, Untranslated Region

1	Úvod.....	1
2	Plicní cirkulace.....	2
3	Hypoxická plicní vasokonstrikce.....	2
4	Plicní arteriální hypertenze.....	5
4.1	Hypoxická plicní hypertenze.....	6
4.1.1	Mechanismus.....	6
4.1.1.1	Hypoxia-Inducible factor 1.....	6
4.1.1.2	Bone Morphogenic Protein.....	7
4.1.1.3	Další signální molekuly.....	7
5	MikroRNA.....	7
5.1	Syntéza.....	8
5.2	Molekulární mechanismus inhibice cílových proteinů.....	8
5.3	Role v plicní hypertenzi.....	9
5.3.1	Zásadní miRNA pro přestavbu plicních cév v hypoxické plicní hypertenzi.....	9
5.3.1.1	miR-17-92.....	10
5.3.1.2	miR-21.....	11
5.3.1.3	miR-210.....	13
5.3.1.4	miR-204.....	14
5.3.1.5	miR-143/145.....	15
5.3.2	Další miRNA.....	15
6	Závěr.....	17
7	Literatura.....	18

1 Úvod

Plicní arteriální hypertenze (PAH) je skupina progresivních chorob, která má průměrnou dobu dožití jen několik let se zhoršující se kvalitou života. Na mechanismu této patologie se podílí různou měrou dvě komponenty - plicní vasokonstrikce a přestavba stěn plicních cév. Jednou z častých příčin je dlouhodobý nedostatek kyslíku neboli chronická hypoxie (např. při onemocněních plic).

Výzkum trvá už několik desítek let a přinesl mnoho užitečných poznatků, z nichž se některé uplatňují v léčbě PAH. Dnes využívané terapeutické zákroky však účinkují pouze na úrovni zpomalování průběhu či zmírňování příznaků nemoci a dosud se nepodařilo vyvinout spolehlivou metodu pro vyléčení této choroby.

Relativní novinka ve výzkumu jsou molekuly mikroRNA, které se výrazně liší od všech dosavadních regulátorů mechanismů plicní hypertenze (jako serotonin, prostacyklin a jiné enzymové produkty). Jsou to krátké úseky RNA, jejichž vliv na PAH začal být během posledních pěti let intenzivně studován.

Hlavním zájmem této práce je popsat roli mikroRNA v mechanismech odpovědi plicních cév na hypoxii. Pro porozumění tématu bude vhodné nejdříve uvést plicní hypertenzi do kontextu.

2 Plicní cirkulace

V cévním systému je hlavním úkolem plic zajistit výměnu plynů mezi vnějším prostředím a krví. To zajišťuje velká tenkostěnná styčná plocha, která se během evoluce zvětšila na strukturální maximum, které objem plic dovolí a které nyní u dospělého člověka činí okolo 70 m². Tato plocha je tvořena stovkami milionů alveolů, mikroskopických vzdušných váčků, které jsou obrostlé velkým množstvím vlásečnic (Ochs et al., 2004). Těmi protéká všechna krev, kterou srdce vydá.

V systémovém oběhu jsou cévy obklopeny přilehlými tkáněmi, které jsou téměř nestlačitelné a tudíž zabraňují nechtěnému rozpínání. V plicním oběhu jsou cévy naopak obklopeny hlavně stlačitelným vzduchem a jsou z principu tenkostěnné, aby mohla probíhat výměna plynů. Jelikož mají malý a velký oběh stejný průtok, krev v plicích musí mít několikrát nižší tlak než krev v systémovém oběhu, aby nedocházelo k průsaku krevní plasmy do alveolů. Toho je dosaženo díky kratším cévám a tenčím stěnám plicních tepen. Zatímco v systémovém oběhu je střední arteriální tlak přibližně 100 mmHg, v plicnici je běžný střední tlak 13-16 mmHg.

3 Hypoxická plicní vasokonstrikce

Dalším zásadním rozdílem mezi systémovým a plicním oběhem je vasokonstrikční odpověď plicních cév na nedostatek kyslíku. Systémové cévy reagují na hypoxii vasodilací. Tím se zajišťuje adekvátnost dodávky kyslíku potřebě dané tkáně. V malém oběhu není nezbytné perfundovat všechny části plic, protože nutritivní zásobování plicní tkáně zajišťuje jiné (bronchiální) krevní řečiště (část systémového oběhu, která se odděluje z aorty) (Deffebach et al., 1987). Naopak je ale žádoucí krev z plicnice vhodně distribuovat tak, aby její větší podíl připadal na dobře ventilované alveoly. Pokud se totiž části alveolů nedostává potřebného množství kyslíku (např. při lokální částečné či úplné obstrukci dýchacích cév, edému apod.), krev, která tyto oblasti perfunduje, se málo okysličí. Tato málo okysličená (popř. úplně neokysličená) krev se na konci plicního řečiště setká s okysličenou a tím vzniká tzv. žilní příměs (přimíchání žilní, neokysličené krve k arteriální, okysličené krvi). Důsledkem toho je snížení parciálního tlaku kyslíku (P_{O₂}) ve smíšené krvi odtékající do systémového oběhu. K optimalizaci distribuce průtoku krve plicemi slouží lokální vasokonstrikce vyvolaná hypoxií v nedostatečně ventilovaných částech plic (vasokonstrikce je způsob zvýšení odporu cévy zúžením jejího lumenu pomocí hladkého svalstva). Tím se přesměruje krev k lépe

ventilovaným alveolům (protože celkový průtok plicemi - srdeční výdej - zůstává nezměněn). Lokální kvantitativní poměr mezi množstvím kyslíku, přiváděného na alveolo-kapilární rozhraní dýchacími cestami, a jeho odnášením krví směrem k systémovému řečišti (tzv. poměr ventilace-perfuze) je tím udržován poměrně konstantní ve všech částech plic (při snížení ventilace v dané části plic se sníží i její perfuze a poměr se tedy nezmění).

Tento mechanismus se nazývá hypoxická plicní vasokonstrikce (HPV) a byl poprvé popsán von Eulerem a Liljestrandem na kočce, čímž byl odstartován usilovný výzkum, který už trvá přes 70 let (Euler and Liljestrand, 1946).

HPV není řízená nervovým systémem, který dominuje řízení systémové cirkulace, ale je ovládána čistě lokálně. To bylo dokázáno pozorováním tohoto jevu i v celkově denervovaných plicích a dokonce v izolovaných cévách či ve svalových buňkách izolovaných z plicních arteriol (PASMC – podle anglického Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell) (Harder et al., 1985). PASMC jsou tedy účinnou jednotkou (efektorem) HPV a podle většiny studií i místem detekce hypoxie, což z nich dělá atraktivní adepty na výzkum a terapeutické ovlivňování HPV.

Benefit optimalizace okysličování arteriální krve je pravděpodobně hlavním důvodem, proč se HPV udržela v evoluci. Podle některých autorů ale může hlavním důvodem být další funkce tohoto mechanismu - udržování nízkého průtoku krve plicemi a jeho náhlé zvýšení při narození. V prenatálním stadiu nejsou ze zřejmých důvodů plíce plodu téměř vůbec perfundovány a jejich alveoly jsou naplněny tekutinou, která se z nich odstraní velmi rychle během prvních nádechů. V tu chvíli je také potřeba, aby do plicního oběhu začala téct krev. HPV, která po celou dobu prenatálního období udržuje vysoký odpor plicních cév (a tedy nízký průtok, protože většina krve pumpované z pravé komory do plicnice "dává přednost" průtoku lehce nižším odporem skrze *ductus arteriosus* do aorty), se v tu chvíli dilatuje a umožní prakticky okamžitý nárůst průtoku krve plicním oběhem. Spolu se silnou kontrakcí arteriální dučeje a uzavřením foramen ovale (otvor v septu mezi srdečními předsíněmi) tím umožňuje rychlou adaptaci plodu na postnatální způsob transportu krevních plynů (který je následně fixován i morfologickými změnami) (Cassin et al., 1964).

Kromě těchto užitečných funkcí má ale tento mechanismus i nežádoucí účinky. To úzce souvisí s tím, že účinnost udržování poměru ventilace-perfuze pomocí HPV je nepřímo úměrná velikosti postižené části plic. Je-li nedostatečně ventilovaná část plic příliš velká (např. celá jedna plíce či více), vede převedení průtoku do nepostižené části k přílišnému nárůstu zdejšího průtoku a tedy k poklesu zdejšího poměru ventilace-perfuze. Důsledkem je pokles okysličení i v této zdravé části a vzniku venózní příměsi se nezabrání. Navíc, jelikož

vasokonstrikce nemůže mít za následek snížení průtoku plicním řečištěm, vede výsledná přílišná redukce celkového průsvitu plicního řečiště k nárůstu tlaku. To je zejména patrné, jsou-li nedostatku kyslíku vystaveny celé plíce, typicky při pobytu ve vysoké nadmořské výšce, ale také při onemocněních, která vedou k celkové alveolární hypoventilaci (např. obstrukční choroby).

Senzor i efektor HPV jsou umístěny v prekapilární části plicního řečiště (v žilní části řečiště je vasokonstrikce většinou zanedbatelná, resp. je-li silná, jde o podklad vážného onemocnění, výškového plicního edému). Přestože molekulární mechanismus HPV stále není zcela pochopený, během posledních cca 20 let se přehledové práce převážně shodují na této podobě – receptorem hypoxie je mitochondrie PASMČ, jejíž elektronový transportní řetězec produkuje určité množství kyslíkových radikálů (reactive oxygen species - ROS), které je v hypoxických podmínkách snižené. Jejich přítomnost v cytoplasmě udržuje během normoxie napětově ovládané draslíkové kanály (K_v kanály) aktivní, které jsou při nedostatku kyslíku deaktivovány redukčním prostředím, v následku čehož se membránový potenciál buňky depolarizuje. To aktivuje napětově ovládané vápníkové kanály a následný influx Ca^{2+} iontů způsobí konstrikci (Ward and Aaronson, 1999; Ward and McMurtry, 2009).

Bylo dokázáno, že HPV alespoň částečně probíhá i po odstranění Ca^{2+} iontů z okolí PASMČ, tudíž je převažujícím názorem, že kromě kanálů na cytoplasmatické membráně hrají roli také intracelulární zásoby vápenatých iontů v sarkoplasmatickém retikulu (Dipp et al., 2001).

V případě prodloužené hypoxie (trvajíc déle než několik minut) byl v některých modelech pozorován částečný ústup vasokonstrikce, která se ale po určité době obnoví (Bennie et al., 1991; Ward and Robertson, 1995). Kvůli tomu se někdy HPV označuje jako dvoufázová. Povaha odpovědi také závisí na tom, zda byla zkoumána odpověď *in vivo* či *in vitro* a za přítomnosti endotelu (který není pro existenci hypoxické vasokonstrikce podstatný, ale může jí poměrně významně modulovat) (Ward and Aaronson, 1999). Víme, že HPV i její reaktivita se udržuje při chronické plicní hypertenzi, protože po uvedení pokusného organismu zpět do normoxie se během relativně krátké doby tlak sníží. Ne však zcela na původní úroveň, a to kvůli druhé části odpovědi plicních cév na chronickou hypoxii, která odpovídá hypoxické plicní arteriální hypertenzi a tvoří ji (spolu s prodlouženou HPV) morfologické změny plicního cévního řečiště.

4 Plicní arteriální hypertenze

Plicní arteriální (někdy také prekapilární) hypertenze (PAH) je progresivně patologický stav charakterizovaný dlouhodobě zvýšeným odporem plicního arteriálního řečiště. Na tom se různou měrou podílí dvě hlavní komponenty: morfologická přestavba a zvýšení tonu plicního prekapilárního řečiště. Tyto změny tím, že zužují lumen plicních cév a snižují poddajnosti jejich stěny, způsobí zvýšení potřebného tlaku, který musí srdce vyvinout, aby udrželo oběhový systém v chodu.

PAH zahrnuje řadu různých onemocnění. Jednou z nejzávažnějších, i když naštěstí poměrně vzácných, forem představuje primární (esenciální) plicní hypertenze, která má i familiární podskupinu se silným dědičným podkladem (Austin and Loyd, 2013). Poměrně častá je naopak hypoxická PAH (typicky jako sekundární komplikace chronické obstrukční plicní nemoci), na níž je tento text především zaměřen.

Kromě PAH existují i formy plicní hypertenze, ve kterých je hlavní zvýšení odporu postkapilární, zejm. klinicky velmi významná plicní hypertenze při levostranném srdečním selhání.

Mechanismus vzniku PAH zahrnuje nekonvenční aktivity PASMC a endotelu plicních tepen (PAEC – pulmonary artery endothelial cell). V buňkách těchto tkání se při PAH změni profil exprese, což se někdy označuje jako přepnutí fenotypu (phenotype-switch) a zahrnuje aktivaci abnormálních signálních drah. Tyto dráhy vedou k proliferaci, růstu, migraci a k odolnosti proti apoptóze. Vrstva PASMC se tvoří i v nejtenčích plicních prekapilárních „arteriolách“¹, kde se běžně nevyskytuje. U plicních tepen, které již hladký sval mají, jde u PAH o jeho hypertrofii a také zvýšenou aktivitu, proliferaci a migraci fibroblastů a s tím spojené ukládání proteinů extracelulární matrix (kolagen a elastin) (Santos et al., 2002). To vede ke snížené poddajnosti stěny plicních prekapilárních (ve smyslu všech, které jsou před kapilárami, t.j. i větších artérií) cév (Mandegar et al., 2004). Dalším z typických projevů PAH je dediferenciace těchto buněk, což je podmínkou pro proliferaci a projevuje se snižováním exprese markerových proteinů, jako jsou u PASMC např.: α -actin and SM22 α (Favot et al., 2005; McDonald et al., 2012). Některé studie naznačují, že PAEC transdiferencují na buňky podobné těm hladkého svalu (smooth-muscle-like cells) (Zhu et al., 2006).

Za zmínku stojí, že fenotyp PAH je nápadně podobný některým projevům rakoviny (Rai et al., 2008). Proliferační a růstová aktivita je u PAH alespoň z části podmíněna aktivací stejných signálních drah (např. Akt/PKB), jaké jsou známé u nádorových buněk. Některé

¹ Umístěním těsně před kapilárami odpovídají systémovým arteriolám, ale ne stavbou - na rozdíl od těch systémových jsou tenkostěnné a mají minimum hladkého svalu.

z nich jsou zmíněny níže. Další podobností je ostatně i desítky let trvající a zatím neúspěšné hledání spolehlivých terapeutických zásahů, které by vedly k vyléčení obou skupin nemocí.

4.1 Hypoxická plicní hypertenze

Jednou z častých příčin PAH je nedostatek kyslíku. Hypoxická plicní arteriální hypertenze (hypoxická PAH) se začíná projevovat desítky minut po vystavení organismu hypoxii, fixuje se po několika dnech a zhruba po 7-10 dnech (u laboratorních potkanů) už příliš neprogreduje. Po uvedení organismu zpět do normoxie tlak v plicnici poměrně rychle poněkud poklesne, ale trvá několik měsíců, než se zcela normalizuje.

Závažnost hypoxické PAH závisí na intenzitě hypoxie, na zvířecím modelu a také na vývojovém stadiu jedince. Plicní tkáň je v perinatálním období zranitelnější a i vystavení hypoxii způsobí silnější hypoxickou PAH než během dospívání a dospělosti. Perinatální hypoxie celoživotně zvyšuje reaktivitu plicních cév na hypoxii (Hampl and Herget, 1990).

Zvýšený tlak v plicnici při hypoxické PAH způsobuje vývin hypertrofie pravé komory srdce a může vést k jejímu následnému selhání, popř. smrti. To se klinicky označuje *cor pulmonale* (Welsh and Peacock, 2013).

4.1.1 Mechanismus

Uvedené fenotypy jsou způsobeny změnami v expresi strukturních proteinů, růstových faktorů, cytokinů a dalších signálních molekul výše zmíněných typů buněk. Tyto změny jsou v posledních dvaceti letech předmětem horlivého výzkumu, což přináší nové hypotézy a otázky ohledně regulace a vzniku hypoxické PAH, z kterých si zde některé uvedeme.

4.1.1.1 Hypoxia-Inducible factor 1

Důležitou signální drahou, která morfologické změny v reakci na hypoxii ovlivňuje, je Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1). Jedná se o transkripční faktor, jehož degradace je závislá na přítomnosti kyslíku a tudíž jsou v hypoxii jeho hladiny zvýšeny. Je to heterodimer s podjednotkami HIF-1 α a HIF-1 β . Reguluje mnoho různých signálních drah a sám je také několika ovlivněn (Fukai et al., 2015).

4.1.1.2 Bone Morphogenic Protein

Na význam signální dráhy zahrnující Bone Morphogenic Protein (BMP) poukázal nález mutace genu pro transmembránový BMP Receptor 2 (BMPR2) u většiny rodin s

familiární formou PAH (Newman et al., 2001). Řada studií následně ukázala, že tato signální kaskáda hraje významnou roli i u dalších forem PAH, včetně hypoxické. BMPR2 je protein na cytoplasmatické membráně, který po navázání extracelulárního ligandu aktivuje vnitrobuněčné signální molekuly. Mezi ně patří především SMAD9, která se dále přemístí do jádra, kde v komplexu s dalšími SMAD proteiny funguje jako transkripční faktor. Aktivita BMP signalizace je naopak spojena se zmírněním vaskulárních přestaveb a mutace v genech pro její důležité články je tedy častým důvodem vrozené PAH (Rabinovitch et al., 2008).

4.1.1.3 Další signální molekuly

Na signalizaci spojené s hypoxickou PAH se také podílí oxid dusnatý (NO), který působí vasodilatačně a antiproliferačně, ale také prozánětlivě, prostacyklin (vasodilatant produkovaný buňkami endotelu), endothelin-1, serotonin a další (Abid et al., 2012; Rabinovitch et al., 2008).

Vedle těchto „tradičních“ signálů se jako velmi relevantní modulátor PAH jeví relativně nedávno objevená skupina molekul microRNA. To jsou posttranskripční modulátory exprese, které často regulují výše uvedené signály nebo jsou jimi naopak regulovány. O těchto molekulách a jejich vlivu na hypoxickou plicní hypertenzi pojednává zbytek této práce.

5 MikroRNA

MikroRNA (miRNA) jsou endogenní oligonukleotidy o délce přibližně 22 nukleotidů, patřící do skupiny nekódujících RNA (ncRNA). Jsou to velmi konzervované modulátory buněčného profilu exprese - podobnosti homologů jednotlivých molekul miRNA odpovídají fylogenetickým příbuznostem organismů. Přes jejich starobylost byly tyto molekuly poprvé identifikovány v roce 1993 a pod názvem mikroRNA se začaly detailněji studovat až v posledních cca patnácti letech (Lee et al., 1993; Pasquinelli and Ruvkun, 2002). Od té doby se ukázalo, že mají zásadní vliv na většinu procesů, které v buňce probíhají, regulují přes polovinu celkové exprese buňky a již pro ně bylo identifikováno přes 2500 genů v lidském genomu (miRBase - v21) (Friedman et al., 2008).

Každá molekula miRNA má sekvenci, která jí umožňuje vazbu na messenger RNA (mRNA) určitých proteinů. Hlavním mechanismem funkcí miRNA molekul je negativní regulace cílových proteinů, což probíhá skrze navázání na mRNA vlákno a jeho následnou degradaci či inhibici transkripce.

MikroRNA molekuly se značí zkratkou miR a číslem pořadí, v jakém byla molekula objevena (např. miR-1). Písmena a/b za číslem molekuly značí, že jde o dvě molekuly, které jsou téměř totožné a liší se jen v 1-2 nukleotidech (např. miR-18a). Dvě maturované miRNA, které jsou původně z jedné vlásenky pre-miRNA, se značí dodatečným -3p nebo -5p, pokud se nacházejí v přibližně stejných počtech (např. miR-17-5p). Pokud se jedno vlákno vyskytuje výrazně častěji, je bez speciálního označení a méně časté vlákno má za číslem *. Klastř několika miRNA se značí pomlčkou (např. miR-17-92) (Ambros et al., 2003; Griffiths-Jones et al., 2006). Klastř ze dvou miRNA značím lomítkem (např. miR-143/145).

5.1 Syntéza

Geny miRNA mohou být na nejrůznějších místech genomu, od odlehlých samostatných lokusů v nekódujících regionech po introny kódujících genů a dokonce exony kódujících genů, ze kterých jsou syntetizovány pomocí alternativního sestřihu. Z těchto lokusů jsou prepisovány RNA polymerázou 2 (či méně často RNA polymerázou 3) buď jako jednotlivá budoucí molekula miRNA nebo jako klastř, ze kterého později vznikne několik molekul miRNA. Tím vznikne primární neupravená pri-miRNA. Některé maturované miRNA mohou vzejít z několika různých pri-miRNA, které mají různé regulační mechanismy. Příkladem je miR-9, která může vzejít ze tří různých lokusů (Shan et al., 2014).

Tato pri-miRNA molekula má několik set nukleotidů a je upravena sestřihovými enzymy Drosha nebo Pasha, které ji zbaví přebytečných částí a nastříhají na potřebné prekurzorové části v podobě vlásenkových struktur.

Tyto upravené, ale ne zcela maturované miRNA (tzv. pre-miRNA) jsou dále asociovány s proteinem Exportin-5 do komplexu, ve kterém jsou vyneseny z jádra do cytoplasmy. Tam jsou zastříženy několik nukleotidové přebývající konce proteinem Dicer, čímž vznikne duplex, jehož jedno vlákno (většinou sense) vytvoří RNA-induced silencing complex (RISC) a druhé vlákno se většinou dále procesu neúčastní a je degradováno (Filipowicz et al., 2008).

5.2 Molekulární mechanismus inhibice cílových proteinů

Jakmile je jednovláknová miRNA molekula v RISC komplexu (někdy označováno jako miRISC), může se navázat na mRNA svých cílových proteinů. To probíhá na nepřekládaném regionu na 3' konci (3' UTR) mRNA. Navázáním tohoto komplexu pak molekula mRNA přestává být překladatelná, a to jedním ze dvou důvodů – buď je mRNA

nalámána (a následně degradována) nebo zůstane mRNA v celku, ale navázaný komplex fyzicky brání asociaci s ribozomem, čímž se inhibuje exprese. Vzhledem k nízkému počtu nukleotidů a možnosti nedokonalé komplementace nejsou miRNA specifické pouze pro mRNA jednoho proteinu, ale naopak mají většinou široký záběr působnosti a často má jedna miRNA stovky cílových mRNA.

Molekuly miRNA tedy fungují jako negativní regulátory mnoha genů, což je dobře popsáný proces. Jejich role v plicní hypertenzi ale už tak jednoznačná není.

5.3 Role v plicní hypertenzi

Role miRNA v hypoxické PAH se stala předmětem výzkumu až před cca pěti lety, přestože se souvisejícím proliferačním fenotypem byly miRNA spojeny už dříve (Brennecke et al., 2003; Hayashita, 2005). Valná většina výzkumu se zaměřuje pouze na vliv v přestavbách cévní stěny, přestože hypoxická plicní vasokonstrikce je podstatnou součástí hypoxické PAH. Tématu mikroRNA v HPV se věnuje jen několik studií. Poukazují na roli miR-190 a miR-328 v modulaci průchodu iontů vápníku přes cytoplasmatickou membránu skrze regulaci exprese iontových kanálů (Guo et al., 2012; Li et al., 2014). Toto téma by tím pádem mohlo být jedním ze zajímavých potenciálních směrů pro další výzkum plicní hypertenze.

Dále byla změna hladiny nejrůznějších miRNA experimentálně spojena s vývojem PAH působením na expresi jednotlivých článků signálních drah ovlivňujících strukturní změny plicních tepen - především proliferace, migrace a odolnost proti apoptóze PAEC a PASMOC, jak je shrnuto dále v této práci.

Regulace miRNA molekul v hypoxické PAH probíhá více způsoby. Jedním z nejčastějších je aktivace exprese pomocí HIF-1 či nepřímá regulace jinými miRNA molekulami.

5.3.1 Zásadní miRNA pro přestavbu plicních cév v hypoxické plicní hypertenzi

V této části diskutuji miRNA nejčastěji spojované s hypoxickou PAH.

5.3.1.1 *miR-17-92*

miR-17-92 je klastr, jehož transkript obsahuje šest prekurzorů pro tyto maturované miRNA – miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a a miR-92a. Tento klastr je nepopíratelně zásadní pro vývoj plic, jak bylo demonstrováno na myších, které tuto miRNA

neměly, v důsledku čehož měly nedovyvinuté plíce a zemřely krátce po porodu (Ventura et al., 2008). Už přímá vazba na BMP a HIF-1 signální dráhy z něj činí jednu z nejdůležitějších mikroRNA v hypoxické PAH.

Chen et al. pozorovali po uvedení PASMČ do hypoxie přechodné zvýšení hodnot miR-17-92 a následné snížení po 24 hodinách. Toto snížení mělo za následek pokles exprese markerových proteinů pro PASMČ (smooth muscle 22 α , α -smooth muscle actin a calponin) a zvýšenou proliferační aktivitu (Chen et al., 2015). To poukazuje na důležitost miR-17-92 při udržování diferenciovaného fenotypu buňky.

Klastr přímo blokuje 3' UTR sekvenci na mRNA HIF-1 α . A naopak exprese miR-17-92 je potlačována HIF-1 α skrze inhibici Myc transkripčního faktoru - molekuly, která expresi tohoto klastru indukuje. Tato negativní zpětnovazebná smyčka je v souladu se zvýšenou expresí HIF-1 α při hypoxické plicní hypertenzi a se snižováním množství miR-17-92 v průběhu této patologie (Taguchi et al., 2008).

Další drahou, kterou klastr ovlivňuje, je BMP. Exprese miR-17-92 je regulovaná cytokinem interleukinem-6 (IL-6) skrze STAT3 signál. Při inhibici STAT3 (pomocí siRNA), se sníží exprese klastru miR-17-92, která byla původně podnícena IL-6. Tato interakce byla dále osvětlena nálezem konzervovaného vazebného místa pro STAT3 na promotoru genu tohoto klastru a potvrzena korelací hodnot množství STAT3 a miR-17-92 v buňce. Dvě miRNA z tohoto klastru (miR-17-5p a miR-20a) přímo nasedají na mRNA membránového receptoru BMPR2 (Brock et al., 2009). Z toho vyplývá, že hodnoty IL-6, které jsou v PAEC při plicní hypertenzi zvýšené, indukují STAT3/miR-17-92 signální dráhu a to vede ke snížení exprese proteinu BMPR2. Snížení aktivity BMP signalizace vede k patologickým přestavbám plicních cév (Brock et al., 2009).

Už před několika lety bylo dokázáno, že hypoxická změna exprese klastru souvisí s aktivitou tumor-supresorového proteinu p53. Snížení exprese miR-17-92 bylo potlačeno v buňkách s nedostatkem p53. Tato souvislost byla dále podpořena nálezem vazebného místa pro p53 v promotoru genu pro miR-17-92, které se překrývá s vazebným místem pro transkripční faktor TATA-binding protein. Navázání p53 tím zabraňuje iniciaci transkripce. Z toho vyplývá, že protein p53 blokuje klastr miR-17-92. Zvýšená exprese tohoto klastru zabránila apoptóze a v souladu s tím inhibice jeho členů (miR-17-5p a miR-20a) apoptózu naopak indukovala (Yan et al., 2009). To poukazuje v kombinaci s ostatními funkcemi miR-17-92 na různorodost vlivu tohoto klastru.

Potlačení miR-17 také vedlo k zmírnění přestaveb skrze indukci p21 (Pullamsetti et al., 2012), což je inhibitor cyclin-dependentních kináz a je také regulována proteinem p53 (Xiong et al., 1993).

Další recentně objevenou cílovou molekulou klastru je protein PDLIM5, který je důležitý pro TGF- β /SMAD signalizaci, jejíž aktivita hraje roli v regulaci diferenciaci PSMC (Chen et al., 2012).

Jedním z posledních objevených cílů je PHD2. Inhibice translace tohoto proteinu je nejspíš důležitý článek mechanismu, který způsobuje proliferaci PSMC v důsledku vystavení hypoxii. Nedostatek PHD2 je také přímo spjat se zvýšenou produkcí HIF-1 α , což dohromady s přímou negativní regulací mRNA tohoto proteinu, poukazuje na netriviální regulační vztah mezi klastrem miR-17-92 a HIF-1 α a dá se předpokládat, že v této signalizaci bude hrát důležitou roli buněčný kontext (Chen et al., 2016).

Klastr indukuje proliferaci i u dalších druhů buněk (např.: u kardiomyocytů) (Chen et al., 2013) a jako mnoho microRNA hraje miR-17-92 roli i v různých typech rakoviny (Courboulon et al., 2015).

Jak shrnul Zhou et al., přispívá tedy tento klastr k PAH remodelací plicních cév proliferací PSMC a udržováním buňky v nediferenciovaném stavu (Zhou et al., 2015).

5.3.1.2 *miR-21*

miR-21 má samostatný primární transkript. V distálních plicních tepnách byla nalezena zvýšená exprese při hypoxické plicní hypertenzi a potlačení miR-21 způsobilo snížení hypoxické PAH. Vliv na proliferaci (jakožto jeden z patologických jevů způsobujících plicní hypertenzi) *in vitro* s těmito poznatky souzněl (Yang et al., 2012).

Pullamsetti et al. hodnotili terapeutickou funkci inhibitoru miR-21 a pozorovali snížení systolického tlaku pravé komory a potlačení muskularizace plicních tepen myši s hypoxickou PAH (Pullamsetti et al., 2012).

Zvýšení hodnot miR-21 při hypoxii v PSMC má za následek snížení množství tumor-supresorového proteinu PTEN, o kterém je známo, že negativně reguluje růstovou a proliferační signální dráhu Akt/PKB. To znamená, že pokud PTEN nemůže inhibovat Akt/PKB dráhu, následuje indukce proliferace a migrace buněk. miR-21 je také mezičlánek mechanismu potlačujícího hypoxickou proliferaci PSMC při uvedení PPAR agonistů (testováno pro potenciální terapeutické účinky). Jejich působením totiž hodnoty miR-21 poklesnou a skrze regulaci PTEN/Akt/PKB dráhy se sníží proliferace (Green et al., 2015);

Sarkar et al., 2010). Další studie také poukazuje na zvýšení hodnot miR-21 Akt2 signalizací v hypoxii, což značí pozitivní zpětnou vazbu exprese miR-21 (Polytarchou et al., 2011).

Jiná studie ukázala nadprodukcí miR-21 signální drahou BMP (nezávisle na HIF-1 α) v myších PAEC a uměle zvýšeným množstvím HIF-1 α v lidských PASMČ, což značí alespoň dvě cesty hypoxické indukce (a opět upozorňuje na komplexitu celého systému). Jelikož je BMPR2 zároveň cílovou molekulou miR-21, odkrývá tento objev zpětnou vazbu, která udržuje aktivitu signální dráhy BMP a hodnotu miR-21 v rovnováze (Parikh et al., 2012).

Závislost exprese miR-21 na BMP signalizaci, byla podpořena i v modelu dědičné PAH. Mutace v genu pro signální protein SMAD9, který je pro BMP signalizaci zásadní, způsobila inhibici exprese miR-21 (Drake et al., 2011).

Také bylo ukázáno, že tato molekula negativně reguluje hodnoty DDAH1, což je enzym metabolizující asymetrický dimethylarginin (ADMA). ADMA je inhibuje syntézu vasodilatačního NO. Inhibice miR-21 podle očekávání zvýšila hodnoty DDAH1, což zabránilo akumulaci ADMA a skrze produkci NO zmírnilo vývoj PAH (Iannone et al., 2014).

miR-21 má také vliv na produkci ROS. Přímou inhibuje superoxid dismutázy (SOD2 a SOD3), což jsou enzymy, které štěpí superoxid. Inhibice snižování hodnot superoxidu tak způsobuje poškozování buněčné struktury, ale i konstrikci hladkého svalstva a nejspíš i proliferaci (Demiryürek and Wadsworth, 1999; Zhang et al., 2012).

Ve studii Hale et al. byla nahlášena zvýšená hladina vnitrobuněčných, ale i extracelulárních hodnot miR-21 v reakci lidských PAEC na hypoxii, přestože v této studii sloužila miR-21 hlavně jako kontrola (Hale et al., 2014). To naznačuje možný význam této molekuly v mezibuněčné signalizaci. Ten však nebyl dále zkoumán.

Molekula miR-21 má při plicní hypertenzi nejednoznačnou funkci. Její působení potlačuje proliferaci a migraci buněk endotelu cév skrze inhibici PPAR α (Zhou et al., 2011). Ale v buňkách hladké svaloviny naopak zvýšená exprese miR-21 indukuje proliferaci a snižuje míru apoptózy. Ve svalových buňkách totiž negativně reguluje hodnoty proteinu Programmed Cell Death Protein 4 (PDCD4), který indukuje apoptózu buněk hladké svaloviny cévní stěny (Song et al., 2012).

V experimentu na potkanech dále Caruso et al. popsali, že hodnoty miR-21 při hypoxické plicní hypertenzi nebyly oproti kontrole změněny, ale při PAH vyvolané monokrotalinem byly sniženy (Caruso et al., 2010). Stejně tak u pacientů s PAH nepozorovali žádnou změnu hodnot miR-21 v PASMČ Courboulin et al. (Courboulin et al., 2011).

Zajímavé je, že v rakovinném kontextu byla miR-21 naopak propojena se sníženou angiogenezí skrze přímou negativní regulaci mRNA RhoB, která kromě toho také zvyšuje

kontraktilitu a růst PSMC (Connolly et al., 2010; Sabatel et al., 2011; Wojciak-Stothard et al., 2012).

Zřejmé je, že má tato molekula několik na sobě nezávislých regulačních mechanismů a angažuje se v nejdůležitějších signálních drahách pro přestavbu cévních stěn plicních tepen. Přestože je v reakci na chronickou hypoxii nejčastěji pozorováno zvýšení její exprese, působení miR-21 není vždy jednoznačné a do značné míry závisí na buněčném kontextu.

5.3.1.3 *miR-210*

V lidských PSMC vystavených chronické hypoxii je hladina miR-210 zvýšená. Tato nadprodukce je přímo závislá na aktivitě HIF-1 α signalizace (Jin et al., 2015; Kulshreshtha et al., 2007). Jedním z hlavních projevů inhibice této miRNA je výrazně zvýšená míra apoptózy. Antiapoptotický efekt miR-210 je nejspíš způsoben přímou degradací mRNA transkripčního faktoru E2F3 (Gou et al., 2012). Ten je znám svou proapoptotickou aktivitou v souvislosti s poškozením DNA (Martinez et al., 2010). miR-210 byla také nalezena v plasmě organismů vystavených hypoxii, což poukazuje na možnost regulace odpovědi na hypoxii na systémové úrovni. Regulátorem exprese a vypouštění této molekuly lidskými PAEC buňkami do extracelulárního prostoru je protein Argonaut 2 (Hale et al., 2014).

Mitogen-activated protein kinase fosfatáza (MKP) 1 je přímou cílovou molekulou miR-210, tudíž byly při inhibici exprese této miRNA hodnoty proteinu MPK-1 i jeho mRNA zvýšeny a také snížena proliferace lidských PSMC. Myši s inhibovanou MPK-1 měly silnou plicní hypertenzi vyvolanou hypoxií i přes miR-210 inhibici, která tuto odpověď jinak obchází. Z toho vyplývá, že je miR-210 důležitým faktorem v hypoxické PAH skrze regulaci MPK-1.

Jedna studie prováděná na lidských a myších PAEC upozorňuje na význam železo-sírných (Fe-S) klastrů v buněčné odpovědi na chronickou hypoxii. miR-210 totiž přímo blokuje translaci ISCU1 a ISCU2, proteiny podílející se na produkci těchto Fe-S klastrů, které jsou důležitou součástí normálního mitochondriálního fungování. Konkrétní mechanismus, kterým nedostatek Fe-S klastrů podněcuje hypoxickou odpověď autoři dále nezkoumali, proto by to mohlo být zajímavé téma pro další experimenty (Beinert et al., 1997; Chan et al., 2009; White et al., 2015).

Stejně tak je přemíra miR-21 spojená s různými druhy rakoviny (např. s adenokarcinomem plic a s rakovinou prsu), kde i značí sníženou pravděpodobnost přežití pacienta a tudíž by se dala potenciálně využít jako biomarker (Cui et al., 2015; Wang et al., 2014).

5.3.1.4 miR-204

Hodnoty miR-204 jsou ve chronicky hypoxických PASMC sníženy a to podporuje proliferaci a potlačuje apoptózu (Courboulin et al., 2011). Gen pro miR-204 je umístěn v intronu (tomu se říká mirtron) genu pro protein TRPM3. Tato souvislost naznačuje společné regulační mechanismy, což podporuje i nález korelace hodnot exprese transkriptů těchto obou molekul, které jsou při hypoxii snižené. TRPM3 ale nejspíš velkou roli v PAH nehraje, jelikož jeho blokáda (na rozdíl od blokády miR-204) neindukovala PAH fenotyp (Courboulin et al., 2011; Wang et al., 2010).

Zajímavé vysvětlení snížených hodnot miR-204 přinesl výzkum Meloche et al., který ukazuje, že DNA-opravující enzym Poly ADP-ribose Polymeráza 1 (PARP-1), jehož exprese je v PAH indukována kvůli poškození DNA, přímo negativně reguluje expresi miR-204, což podněcuje aktivitu signálních drah vedoucích k patologickým jevům, které jsou s touto miRNA spojené. Tudíž má aktivita PARP-1 zároveň opravný i patologický efekt (Meloche et al., 2014).

Dále byla miR-204 potlačena transkripčním faktorem krevních destiček (Platelet Derived Growth Factor, PDGF), endothelinem 1 (ET-1) a angiotensinem II. V těchto signalizacích hraje velkou roli signální molekula a transkripční faktor Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3). To vedlo ke vzniku teorie, že STAT3 je mezičlánek této regulace a že tento signál negativně reguluje miR-204. Tato teorie byla podpořena pozorováním negativní korelace mezi těmito dvěma molekulami. STAT3 také negativně reguluje miR-204, což vytváří pozitivní zpětnovazebnou smyčku pro hypoxickou expresi STAT3 (Paulin et al., 2011). Zvýšené hodnoty tohoto signálu vedou ke sníženým hodnotám BMPR2, která je spjata s vývojem PAH skrze několik miRNA (Courboulin et al., 2011).

Zajímavým zjištěním, podtrhujícím důležitost buněčného kontextu v aktivitě mikroRNA, bylo pozorování sedmkrát vyššího nárůstu exprese miR-204 v PASMC než v PAEC za podmínek hypoxické plicní hypertenze (Courboulin et al., 2011).

Přímou cílovou molekulou miR-204 je Bromodomain-Containing Protein 4 (BRD4), který tak může být v hypoxii navýšen. To způsobí pokles hodnot proteinu p21, což souvisí s potlačením zastavení buněčného cyklu a může vést k proliferaci (Meloche et al., 2015b).

Po vnesení této miRNA do rakovinných buněk bylo pozorováno zmírnění migrace a proliferace. miR-204 (konkrétně miR-204-5p vlákno) přímo blokuje mRNA Sineoculis homeobox homologu 1 (Six1). Umělým zvýšením hladiny Six1 se naopak snížily hodnoty

exprese miR-204. To značí pozitivní zpětnou vazbu inhibice exprese miR-204, která je spojena s proliferací a migrací (J. Zeng et al., 2016).

5.3.1.5 *miR-143/145*

miR-143/145 je klastř dvou miRNA, kódovaný jako jeden pre-miR transkript, který je následně sestřižen na dvě části – miR-143 a miR-145.

Na rozdíl od většiny (jestli ne od všech) důležitých mikroRNA regulátorů PAH se mohou jedinci, kteří tuto miRNA postrádají, dožít dospělosti (Xin et al., 2009).

BMP i TGF- β signalizace nezávisle indukují expresi tohoto klastř (Davis-Dusenbery et al., 2011). V myších i lidských plicních tepnách byly pozorovány zvýšené hodnoty miR-143/145 při hypoxické i dědičné (mutací v *BMPR2*) PAH (Caruso et al., 2012). V dědičné PAH je jedním z pravděpodobných vysvětlení těchto hodnot - i přes mutaci *BMPR2*, nutného článku BMP signalizace - právě kompenzace TGF- β signálními molekulami (Davis-Dusenbery et al., 2011).

Zatímco inhibice miR-145 potlačila hypoxickou PAH, inhibování miR-143 nemělo na hypoxickou odpověď vliv. Jako důležité vlákno se jeví miR-145-3p, které indukuje proliferační fenotyp i u PAEC skrze přenos extracelulárními váčky, na nichž se zkoumaly možnosti mezibuněčného přenosu a farmakologických aplikací miRNA (Caruso et al., 2012; Deng et al., 2015).

5.3.2 Další miRNA

Vliv na plicní hypertenzi byl testován u řady dalších miRNA.

Prvním krokem tohoto testování (po výběru konkrétní molekuly) bývá porovnání hodnot jejich exprese při plicní hypertenzi s kontrolami pomocí qPCR. Následuje inhibice této miRNA v buňkách pomocí komplementačních oligonukleotidových inhibitorů a sledování vlivu na vývoj PAH v hypoxii. Dále se naopak sleduje fenotyp buňky po vnesení uměle vytvořené miRNA do buňky. Pokud inhibici miRNA následuje mírnější vývoj PAH a zvýšenou expresi následuje silnější PAH, je tato molekula označena za zásadní pro vývoj plicní hypertenze. Obvyklé je dále určit alespoň jednu cílovou molekulu zprostředkující vliv na PAH.

Působení takové molekuly může mít i opačné účinky, avšak větší část studií hlásí zvýšené (nebo nezměněné) hodnoty miRNA v PAH. Ve studii z roku 2011 dokonce Courboulin et al. měřili hodnoty 337 molekul miRNA v lidských PASMČ při chronické

hypoxii a snížené hodnoty byly nalezeny pouze u jedné (miR-204) (Courboulin et al., 2011). Od té doby však byly objeveny další molekuly, které jsou v plicní hypertenzi běžně potlačovány a byly u nich pozorovány antiproliferační účinky. Mezi ně patří mimo jiné miR-34, miR-96, miR-100 a miR-223 (Wallace et al., 2015; Wang et al., 2015, 2016; Y. Zeng et al., 2016).

Další důležitou miRNA je miR-9, jejíž množství v cytoplasmě testovaných buněk se znásobilo během 24 hodin hypoxie více než pětkrát. S hypoxickou PAH ji pojí transkripční faktor myocardin, jehož mRNA miR-9 přímo blokuje a který aktivuje expresi markerových proteinů buněk hladké svaloviny. miR-25, miR-39 a miR-106b byly také nadprodukovány, ale jen cca dvakrát (Shan et al., 2014).

Stejně jako miR-9, je i miR-322 jednou z molekul, jejíž expresi indukuje HIF-1 α . Ta se účastní i zpětné regulace HIF-1 α a také ovlivňuje hypoxickou PAH pomocí BMP signalizace (Zeng et al., 2015).

Hypoxie také zvyšuje hodnoty miR-27a, která přímo inhibuje PPAR γ , což vede k indukci PAH aktivací exprese ET-1 (Kang et al., 2013).

Mezi miRNA, které jsou chronickou hypoxií výrazně potlačovány, patří miR-29a-3p, jejíž inhibice přispívá k plicní hypertenzi zvýšením proliferační, migrační a růstové aktivity fibroblastů plicních tepen (Luo et al., 2015) a miR-223, jejíž absence (podobně jako miR-204) indukuje proliferaci PASMC skrze zvýšenou expresi enzymu PARP-1 (Meloche et al., 2015a).

Stejně tak jsou sníženy hodnoty miR-103 a miR-107, prakticky totožných mikroRNA, jejichž maturované sekvence se liší pouze v jednom nukleotidu. Ty přímo negativně regulují HIF-1 α , podobně jako klastř miR-17-92 (Deng et al., 2016).

Yue et al. prezentovali zajímavou roli miR-206, která je v hypoxii také inhibována a také přímo blokuje mRNA HIF-1 α , ale při vnesení pre-miR-206 do buňky bylo pozorováno navýšení HIF-1 α hodnot a intenzivnější HIF-indukovaná proliferace než u kontrol. Jako jedno vysvětlení této nekonvenční funkce autoři navrhují různé funkce miR-206 v závislosti na jejím množství (Yue et al., 2013).

Některé studie podporují teorii o tzv. „master miRNA regulators“, což jsou miRNA, které regulují mnoho různých signálních drah a často nepřímo i jiné miRNA molekuly a mají tak zásadní vliv v regulační síti. Některé z těchto molekul jsou uvedené výše (Chan et al., 2012).

Naše porozumění problematice se prohlubuje, z nových poznatků však často vzejde více nových otázek než odpovědí. Mezi výzvy výzkumu miRNA interakcí a jejich změn v reakci na hypoxii patří překryv jejich funkcí, pleiotropie, množství jejich cílových molekul a v neposlední řadě i závislost na buněčném kontextu.

6 Závěr

Povaha této problematiky nejspíš vyžaduje specifický přístup k výzkumu nových funkcí mikroRNA v plicní hypertenzi. Mnoho prací na toto téma se v posledních letech soustředilo na měření aktivity miR molekul a souvisejících signálů a na knockdown/overexpression přístup jakožto měřítka jejich významu. Tyto experimenty přinášejí hodnotné poznatky pro další vědecké úsilí a velká část z nich je citována i zde. Seznamy miRNA s jejich cílovými molekulami nám však neumožní využívání těchto znalostí na terapeutické úrovni. Přestože už existují klinické studie miRNA (Janssen et al., 2013), zatím neproběhla žádná, která by se zabývala miRNA v plicní hypertenzi. Je možné, že se miRNA ani nedají využít jako jednoduché farmaceutické regulátory a že odpovědí bude spíše jemné vyvažování aktivit spektra signálních drah v buňce, k tomu však zatím chybí potřebné technologie.

Zajímavým směrem budoucího vědeckého bádání by také mohla být role mikroRNA v HPV, jak je popsáno v kapitole 5.3.

Velký pokrok v úvahách o přístupu k roli mikroRNA v plicní hypertenzi přinesl znamenitý přehledový článek od Negi et al. z března 2017, ve kterém autoři navrhuji čtyři zásadní pilíře budoucího výzkumu pro dešifrování této role. Těmi jsou: 1) pokročilé metody získávání „high-density“ dat pro prevenci výzkumu pouze na známých signálních drah, 2) využívání a optimalizace *in silico* analýzy sítí genové exprese, 3) rozeznání kontextově specifických vlastností mikroRNA a 4) důsledná validace všech objevů (Negi et al., 2017).

V každém případě bude pro využití miRNA zapotřebí komplexnějšího přístupu, který bude mířit na vyšší úroveň porozumění vnitřně propojených signálů, které k patologii plicní hypertenze (nejen hypoxické) vedou.

7 Literatura

- Abid, S., Houssaini, A., Chevarin, C., Marcos, E., Tissot, C.M., Gary-Bobo, G., Wan, F., Mouraret, N., Amsellem, V., Dubois-Rande, J.L., Hamon, M., Adnot, S., 2012. Inhibition of gut- and lung-derived serotonin attenuates pulmonary hypertension in mice. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 303, L500–L508.
- Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D.P., Burge, C.B., Carrington, J.C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., Tuschl, T., 2003. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9, 277–9.
- Austin, E., Loyd, J., 2013. Heritable Forms of Pulmonary Arterial Hypertension. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 34, 568–580.
- Beinert, H., Holm, R.H., Münck, E., 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277, 653–9.
- Bennie, R.E., Packer, C.S., Powell, D.R., Jin, N., Rhoades, R.A., 1991. Biphasic contractile response of pulmonary artery to hypoxia. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 261.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B., Cohen, S.M., 2003. bantam Encodes a Developmentally Regulated microRNA that Controls Cell Proliferation and Regulates the Proapoptotic Gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25–36.
- 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.
- Caruso, P., Dempsey, 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 Novelty and Significance. *Circ. Res.* 111.
- 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., Dempsey, 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.
- Cassin, S., Dawes, G.S., Mott, J.C., Ross, B.B., Strang, L.B., 1964. The vascular resistance of the foetal and newly ventilated lung of the lamb. *J. Physiol.* 171, 61–79.
- Chan, S.Y., Zhang, Y.-Y., Hemann, C., Mahoney, C.E., Zweier, J.L., Loscalzo, J., 2009. MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell Metab.* 10, 273–284.
- Chan, Y.C., Banerjee, J., Choi, S.Y., Sen, C.K., 2012. miR-210: the master hypoxamir. *Microcirculation* 19, 215–23.
- Chen, J., Huang, Z.-P., Seok, H.Y., Ding, J., Kataoka, M., Zhang, Z., Hu, X., Wang, G., Lin, Z., Wang, S., Pu, W.T., Liao, R., Wang, D.-Z., 2013. mir-17–92 Cluster Is Required for and Sufficient to Induce Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Hearts Novelty and Significance. *Circ. Res.* 112.
- Chen, T., Zhou, G., Zhou, Q., Ibe, J.C.F., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Raj, J.U., 2012. MiR-17~92 Regulates Differentiation Of Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Via A TGF-² Dependent Pathway. In: B26.

- Pulmonary Vascular Signaling in Pulmonary Hypertension. American Thoracic Society, pp. A2613–A2613.
- 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.
- Chen, T.J., Zhou, Q.Y., Tang, H.Y., Bozkanat, M., Yuan, J.X.J., Raj, J.U., Zhou, G.F., 2016. miR-17/20 Controls Prolyl Hydroxylase 2 (PHD2)/Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) to Regulate Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. *J. Am. Heart Assoc.* 5.
- Connolly, E.C., Van Doorslaer, K., Rogler, L.E., Rogler, C.E., 2010. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol. Cancer Res.* 8, 691–700.
- 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.
- Courboulin, A., Ranchoux, B., Cohen-Kaminsky, S., Perros, F., Bonnet, S., 2015. MicroRNA networks in pulmonary arterial hypertension: share mechanisms with cancer? *Curr. Opin. Oncol.* 28, 72–82.
- Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., Ilie, M., Hofman, P., Nagase, H., Mari, B., Krüger, A., 2015. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. *Oncogene* 34, 3640–3650.
- Davis-Dusenbery, B.N., Chan, M.C., Reno, K.E., Weisman, A.S., Layne, M.D., Lagna, G., Hata, A., 2011. down-regulation of Kruppel-like factor-4 (KLF4) by microRNA-143/145 is critical for modulation of vascular smooth muscle cell phenotype by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein 4. *J. Biol. Chem.* 286, 28097–110.
- Deffebach, M.E., Charan, N.B., Lakshminarayan, S., Butler, J., 1987. The bronchial circulation. Small, but a vital attribute of the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 463–81.
- Demiryürek, A.T., Wadsworth, R.M., 1999. Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol. Ther.* 84, 355–365.
- Deng, B., Du, J., Hu, R., Wang, A.P., Wu, W.H., Hu, C.P., Li, Y.J., Li, X.H., 2016. MicroRNA-103/107 is involved in hypoxia-induced proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells by targeting HIF-1 beta. *Life Sci.* 147, 117–124.
- Deng, L., Blanco, F.J., Stevens, H., Lu, R., Caudrillier, A., McBride, M., McClure, J.D., Grant, J., Thomas, M., Frid, M., Stenmark, K., White, K., Seto, A.G., Morrell, N.W., Bradshaw, A.C., MacLean, M.R., Baker, A.H., 2015. MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* 117, 870–883.
- Dipp, M., Nye, P.C.G., Evans, A.M., 2001. Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 281.
- Drake, K.M., Zygmunt, D., Mavrakis, L., Harbor, P., Wang, L., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Aldred, M.A., 2011. Altered MicroRNA processing in heritable pulmonary arterial hypertension: An important role for Smad-8. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184, 1400–1408.
- Euler, U.S. v., Liljestrand, G., 1946. Observations on the Pulmonary Arterial Blood Pressure in the Cat. *Acta Physiol. Scand.* 12, 301–320.
- Favot, L., Hall, S.M., Haworth, S.G., Kemp, P.R., 2005. Cytoplasmic YY1 Is Associated with Increased Smooth Muscle-Specific Gene Expression: Implications for Neonatal Pulmonary Hypertension. *Am. J. Pathol.* 167,

1497–1509.

- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N., 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102–114.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2008. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.
- Fukai, K., Nakamura, A., Hoshino, A., Nakanishi, N., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Ono, K., Tateishi, S., Ikeda, K., Ogata, T., Ueyama, T., Matoba, S., 2015. Pyk2 aggravates hypoxia-induced pulmonary hypertension by activating HIF-1 alpha. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 308, H951–H959.
- Gou, D., Ramchandran, R., Peng, X., Yao, L., Kang, K., Sarkar, J., Wang, Z., Zhou, G., Zhou, G., Raj, J.U., 2012. miR-210 has an antiapoptotic effect in pulmonary artery smooth muscle cells during hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 303, L682–91.
- Green, D.E., Murphy, T.C., Kang, B.Y., Searles, C.D., Hart, M., 2015. PPAR gamma Ligands Attenuate Hypoxia-Induced Proliferation in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells through Modulation of MicroRNA-21. *PLoS One* 10.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., Enright, A.J., 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140–D144.
- Guo, L., Qiu, Z., Wei, L., Yu, X., Gao, X., Jiang, S., Tian, H., Jiang, C., Zhu, D., 2012. The MicroRNA-328 regulates hypoxic pulmonary hypertension by targeting at insulin growth factor 1 Receptor and L-type calcium channel- β_1C . *Hypertension* 59, 1006–1013.
- Hale, A., Lee, C., Annis, S., Min, P.K., Pande, R., Creager, M.A., Julian, C.G., Moore, L.G., Mitsialis, S.A., Hwang, S.J., Kourembanas, S., Chan, S.Y., 2014. An Argonaute 2 switch regulates circulating miR-210 to coordinate hypoxic adaptation across cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1843, 2528–2542.
- Hampl, V., Herget, J., 1990. Perinatal Hypoxia Increases Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in Adult Rats Recovering from Chronic Exposure to Hypoxia. *Am. Rev. Respir. Dis.* 142, 619–624.
- Harder, D.R., Madden, J.A., Dawson, C., 1985. A Membrane Electrical Mechanism for Hypoxic Vasoconstriction of Small Pulmonary Arteries from Cat. *Chest* 88, 233S–235S.
- Hayashita, Y., 2005. A Polycistronic MicroRNA Cluster, miR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628–9632.
- Iannone, L., Zhao, L., Dubois, O., Duluc, L., Rhodes, C.J., Wharton, J., Wilkins, M.R., Leiper, J., Wójciak-Stothard, B., 2014. miR-21/DDAH1 pathway regulates pulmonary vascular responses to hypoxia. *Biochem. J.* 462, 103–112.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B.D., Kauppinen, S., Levin, A.A., Hodges, M.R., 2013. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* 368, 1685–1694.
- Jin, Y.P., Pang, T.T., Nelin, L.D., Wang, W., Wang, Y.L., Yan, J.C., Zhao, C., 2015. MKP-1 is a target of miR-210 and mediate the negative regulation of miR-210 inhibitor on hypoxic hPASMC proliferation. *Cell Biol. Int.* 39, 113–120.
- Kang, B.Y., Park, K.K., Green, D.E., Bijli, K.M., Searles, C.D., Sutliff, R.L., Michael Hart, C., 2013. Hypoxia mediates mutual repression between microRNA-27a and PPAR γ in the pulmonary vasculature. *PLoS One* 8.

- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.-G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., Ivan, M., 2007. A microRNA signature of hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1859–67.
- 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.
- Li, S.S., Ran, Y.J., Zhang, D.D., Li, S.Z., Zhu, D.L., 2014. MicroRNA-190 Regulates Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction by Targeting a Voltage-Gated K(+)Channel in Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Cell. Biochem.* 115, 1196–1205.
- Luo, Y., Dong, H.Y., Zhang, B., Feng, Z., Liu, Y., Gao, Y.Q., Dong, M.Q., Li, Z.C., 2015. MiR-29a-3p attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary adventitial fibroblast activation. *Hypertension* 65, 414–420.
- Mandegar, M., Fung, Y.-C.B., Huang, W., Remillard, C. V., Rubin, L.J., Yuan, J.X.-J., 2004. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc. Res.* 68, 75–103.
- Martinez, L.A., Goluszko, E., Chen, H.-Z., Leone, G., Post, S., Lozano, G., Chen, Z., Chauchereau, A., 2010. E2F3 is a mediator of DNA damage-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 30, 524–36.
- 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.
- 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., 2015a. MiR-223 Reverses Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* ajpcell.00149.2015.
- Meloche, J., Pflieger, A., Vaillancourt, M., Paulin, R., Potus, F., Zervopoulos, S., Graydon, C., Courboulin, A., Breuils-Bonnet, S., Tremblay, È., Couture, C., Michelakis, E.D., Provencher, S., Bonnet, S., 2014. Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 129.
- Meloche, J., Potus, F., Vaillancourt, M., Bourgeois, A., Johnson, I., Deschamps, L., Chabot, S., Ruffenach, G., Henry, S., Breuils-Bonnet, S., Tremblay, È., Nadeau, V., Lambert, C., Paradis, R., Provencher, S., Bonnet, S., 2015b. Bromodomain-Containing Protein 4 Novelty and Significance. *Circ. Res.* 117.
- Negi, V., Chan, S.Y., Zhang, D., Chen, J., Li, S., Zhu, D., 2017. Discerning functional hierarchies of microRNAs in pulmonary hypertension. *JCI Insight* 2, 1–15.
- Newman, J.H., Wheeler, L., Lane, K.B., Loyd, E., Gaddipati, R., Phillips, J.A., Loyd, J.E., 2001. Mutation in the Gene for Bone Morphogenetic Protein Receptor II as a Cause of Primary Pulmonary Hypertension in a Large Kindred. *N. Engl. J. Med.* 345, 319–324.
- Ochs, M., Nyengaard, J.R., Jung, A., Knudsen, L., Voigt, M., Wahlers, T., Richter, J., Gundersen, H.J.G., 2004. The Number of Alveoli in the Human Lung. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 120–124.
- 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.
- Pasquinelli, A.E., Ruvkun, G., 2002. Control of Developmental Timing by MicroRNAs and Their Targets. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 495–513.
- Paulin, R., Meloche, J., Jacob, M.H., Bissierier, M., Courboulin, A., Bonnet, S., 2011. Dehydroepiandrosterone

- inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *AJP Hear. Circ. Physiol.* 301, H1798–H1809.
- Polytarchou, C., Iliopoulos, D., Hatzia Apostolou, M., Kottakis, F., Maroulakou, I., Struhl, K., Tsiachlis, P.N., 2011. Akt2 Regulates All Akt Isoforms and Promotes Resistance to Hypoxia through Induction of miR-21 upon Oxygen Deprivation. *Cancer Res.* 71.
- 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.
- Rabinovitch, M., Champion, H.C., Tucker, A.D., Rosen, A., Fanburg, B.L., 2008. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 118, 2372–9.
- Rai, P.R., Cool, C.D., King, J.A.C., Stevens, T., Burns, N., Winn, R.A., Kasper, M., Voelkel, N.F., 2008. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 178, 558–64.
- Sabatel, C., Malvaux, L., Bovy, N., Deroanne, C., Lambert, V., Gonzalez, M.-L.A., Colige, A., Rakic, J.-M., Noël, A., Martial, J.A., Struman, I., 2011. MicroRNA-21 Exhibits Antiangiogenic Function by Targeting RhoB Expression in Endothelial Cells. *PLoS One* 6, e16979.
- 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.
- 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–L871.
- Shan, F.B., Li, J.X., 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.
- Song, J. tao, Hu, B., Qu, H. yan, Bi, C. long, Huang, X. zhen, Zhang, M., 2012. Mechanical Stretch Modulates MicroRNA 21 Expression, Participating in Proliferation and Apoptosis in Cultured Human Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS One* 7, e47657.
- Taguchi, A., Yanagisawa, K., Tanaka, M., Cao, K., Matsuyama, Y., Goto, H., Takahashi, T., 2008. Identification of hypoxia-inducible factor-1?? as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res.* 68, 5540–5545.
- 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-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell* 132, 875–886.
- Wallace, E., Morrell, N.W., Yang, X.D., Long, L., Stevens, H., Nilsen, M., Loughlin, L., Mair, K.M., Baker, A.H., MacLean, M.R., 2015. A sex-specific microRNA-96/5-hydroxytryptamine 1B axis influences development of pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191, 1432–1442.
- Wang, A.P., Li, X.H., Gong, S.X., Li, W.Q., Hu, C.P., Zhang, Z., Li, Y.J., 2015. miR-100 suppresses mTOR signaling in hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 765, 565–573.
- Wang, F.E., Zhang, C., Maminishkis, A., Dong, L., Zhi, C., Li, R., Zhao, J., Majerciak, V., Gaur, A.B., Chen, S., Miller, S.S., 2010. MicroRNA-204/211 alters epithelial physiology. *FASEB J.* 24, 1552–71.

- Wang, J., Zhao, J., Shi, M., Ding, Y., Sun, H., Yuan, F., Zou, Z., 2014. Elevated Expression of miR-210 Predicts Poor Survival of Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 9, e89223.
- Wang, P., Xu, J., Hou, Z.L., Wang, F.F., Song, Y.L., Wang, J., Zhu, H., Jin, H.B., 2016. miRNA-34a promotes proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells by targeting PDGFRA. *Cell Prolif.* 49, 484–493.
- Ward, J.P., Aaronson, P.I., 1999. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respir. Physiol.* 115, 261–271.
- Ward, J.P., McMurtry, I.F., 2009. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9, 287–296.
- Ward, J.P., Robertson, T.P., 1995. The role of the endothelium in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Exp. Physiol.* 80, 793–801.
- Welsh, D.J., Peacock, A.J., 2013. Cellular Responses to Hypoxia in the Pulmonary Circulation. *High Alt. Med. Biol.* 14, 111–116.
- White, K., Lu, Y., Annis, S., Hale, A.E., Chau, B.N., Dahlman, J.E., Hemann, C., Opotowsky, A.R., Vargas, S.O., Rosas, I., Perrella, M.A., Osorio, J.C., Haley, K.J., Graham, B.B., Kumar, R., Saggarr, R., Saggarr, R., Wallace, W.D., Ross, D.J., Khan, O.F., Bader, A., Gochuico, B.R., Matar, M., Polach, K., Johannessen, N.M., Prosser, H.M., Anderson, D.G., Langer, R., Zweier, J.L., Bindoff, L.A., Systrom, D., Waxman, A.B., Jin, R.C., Chan, S.Y., 2015. Genetic and hypoxic alterations of the microRNA-210-ISCU1/2 axis promote iron-sulfur deficiency and pulmonary hypertension. *EMBO Mol. Med.* 7, 695–713.
- Wojciak-Stothard, B., Zhao, L., Oliver, E., Dubois, O., Wu, Y., Kardassis, D., Vasilaki, E., Huang, M., Mitchell, J.A., Harrington, L.S., Prendergast, G.C., Wilkins, M.R., 2012. Role of RhoB in the Regulation of Pulmonary Endothelial and Smooth Muscle Cell Responses to Hypoxia. *Circ. Res.* 110, 1423–1434.
- 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, 2166–78.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D., 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704.
- 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.
- Yang, S., Banerjee, S., Freitas, A. de, Cui, H., Xie, N., Abraham, E., Liu, G., 2012. miR-21 regulates chronic hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 302.
- Yue, J.Q., Guan, J., Wang, X.Y., Zhang, L.L., Yang, Z.X., Ao, Q.L., Deng, Y.T., Zhu, P.C., Wang, G.P., 2013. MicroRNA-206 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through targeting of the HIF-1 alpha/Fhl-1 pathway. *Lab. Investig.* 93, 748–759.
- Zeng, J., Wei, M., Shi, R., Cai, C., Liu, X., Li, T., Ma, W., 2016. MiR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial–mesenchymal transition in breast cancer. *Tumor Biol.* 37, 2729–2735.
- Zeng, Y., Liu, H.T., Kang, K., Wang, Z.W., Hui, G., Zhang, X.Y., Zhong, J.S., Peng, W.D., Ramchandran, R., Raj, J.U., Gou, D.M., 2015. Hypoxia inducible factor-1 mediates expression of miR-322: potential role in proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Sci. Rep.* 5.
- Zeng, Y., Zhang, X.Y., Kang, K., Chen, J.D., Wu, Z.Q., Huang, J.Y., Lu, W.J., Chen, Y.Q., Zhang, J., Wang,

- Z.W., Zhai, Y.J., Qu, J.L., Ramchandran, R., Raj, J.U., Wang, J., Gou, D.M., 2016. MicroRNA-223 attenuates hypoxia-induced vascular remodeling by targeting RhoB/MLC2 in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Sci. Rep.* 6.
- Zhang, X., Ng, W.-L., Wang, P., Tian, L., Werner, E., Wang, H., Doetsch, P., Wang, Y., 2012. MicroRNA-21 Modulates the Levels of Reactive Oxygen Species by Targeting SOD3 and TNF α . *Cancer Res.* 72.
- Zhou, G., Chen, T., Usha Raj, J., 2015. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 52, 139–151.
- Zhou, J., Wang, K.-C., Wu, W., Subramaniam, S., Shyy, J.Y.-J., Chiu, J.-J., Li, J.Y.-S., Chien, S., 2011. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor-alpha in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 10355–10360.
- 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.