



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Modulation of vascular remodeling : a role for the immune system, growth factors, and transcriptional regulation

Seghers, L.

Citation

Seghers, L. (2011, November 30). *Modulation of vascular remodeling : a role for the immune system, growth factors, and transcriptional regulation.*

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18166>

Version: Corrected Publisher's Version

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/18166>

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

11

Samenvatting / discussie

Therapeutische stimulatie van collateraalvorming is een adagium voor de behandeling van patiënten die lijden aan kritieke ischemie in het been waarbij conventionele revascularisatie therapieën falen. Inzicht in de moleculaire en cellulaire mechanismen van revascularisatie is nodig voor de verdere ontwikkeling en verfijning van therapeutische strategieën voor deze patiënten categorie. In dit proefschrift wordt aandacht besteed aan enkele onderwerpen aangaande deze moleculaire en cellulaire mechanismen, waaronder de betrokkenheid van leukocytenpopulaties in revascularisatie. Daarnaast wordt aandacht besteed aan andere factoren die betrokken zijn bij revascularisatie zoals vasculaire groeifactoren, post-transcriptionele regulatie, en receptoren die betrokken zijn bij de signalering van groeifactoren.

In de afgelopen twee decennia is de kennis over de betrokkenheid van het immuunsysteem bij revascularisatie, in het bijzonder collateraalvorming, substantieel toegenomen. Van diverse leukocytenpopulaties is in experimentele diermodellen aangetoond dat deze cellen een modulerende rol spelen bij arteriogenese. De grote variëteit aan betrokken leukocyten biedt een scala aan mogelijkheden om arteriogenese te stimuleren.

Hoofdstuk 2 geeft een overzicht van de diverse leukocytenpopulaties die betrokken zijn bij arteriogenese en illustreert een rol voor leukocyten van zowel het aangeboren als van het adaptieve immuunsysteem. Hoewel de rol van veel van deze cellen individueel is bestudeerd [1-5], wordt feitelijke samenwerking tussen de diverse leukocyten populaties gesuggereerd. Zo is onder andere communicatie tussen monocytten en T lymfocytten [6, 7] beschreven en het is aannemelijk dat dit ook tussen andere leukocyten populaties gebeurt. Ondanks de veelbelovende resultaten van experimentele studies, zijn tot op heden geen van de beschreven leukocyten toegepast in een klinische setting. Meer inzicht in cellulaire en moleculaire mechanismen is nodig voordat leukocyten kunnen worden toegepast in een specifieke klinische setting. *In vitro* en *in vivo* studies voor meer diepgaand onderzoek naar de betrokkenheid van leukocyten zouden deze informatie kunnen verschaffen.

Om de diverse onderwerpen in dit proefschrift te bestuderen, werd gebruik gemaakt van een experimenteel muismodel waarin perifeer arterieel vaatlijden wordt nagebootst. Dit ischemiemodel in de achterpoot van de muis wordt door diverse onderzoeksgroepen gebruikt bij arteriogenese onderzoek, en verschillende chirurgische benaderingen zijn beschreven voor de inductie van achterpoot ischemie in dit muismodel. Het effect van deze verschillende benaderingen en het niveau van vasculaire occlusie worden vergeleken met betrekking tot het herstel van de doorbloeding, collateraalvorming en vorming van capillairen in de ischemische achterpoot in **hoofdstuk 3**. We laten zien dat de omvang van het arteriële defect (enkele ligatie van de arterie, totale excisie van de arterie, of dubbele ligatie van de arterie) duidelijke consequenties heeft voor het patroon van het doorbloedingsherstel, terwijl het niveau van occlusie (iliacaal of femoraal) hier geen effect op heeft.

In dit proefschrift werd gekozen voor de methode van de enkele ligatie van de arteria femoralis, aangezien bij deze methode de distale doorbloeding effectief wordt onderbroken, terwijl alle zijtakken van pre-existente collateraalarteriën intact blijven. Hierdoor is het mogelijk de groei van collateraalarteriën uit pre-existente arteriolen te bestuderen vanuit een fysiologisch perspectief. Variatie in de aanwezigheid van pre-existente collateraalarteriën is beschreven tussen muizenstammen, en dit heeft een significant effect op het doorbloedingsherstel [8, 9].

Naast de variatie in het voorkomen van collateraalarterie zijtakken, blijken ook verschillen in de respons van het immuunsysteem verantwoordelijk te zijn voor verschillen in het doorbloedingsherstel tussen C57BL/6 en BALB/c muizen, zoals aangetoond in **hoofdstuk 4**. Deze bevinding wordt ondersteund door verschillen in de accumulatie van lymfocyten rond collateraal arteriën tussen deze twee stammen. In dit kader werd de hypothese opgesteld dat lymfocyten een rol spelen in arteriogenese. Arteriogenese is geremd in NK cel deficiënte muizen of in muizen waarin NK cellen zijn gedepleteerd, maar niet in natural killer T (NKT) cel deficiënte muizen.

Daarnaast blijkt dat arteriogenese sterk verminderd is in muizen die CD4+ T cellen missen. Van zowel NK cellen en CD4+ T cellen is aangetoond dat deze zich rondom collateraalarteriën accumuleren, en een verscheidenheid aan inflammatoire cytokines uitscheiden. In toekomstige studies moet de lokale effector functie van deze cellen en hun cytokines gericht worden onderzocht.

Het verschil in immuunrespons tussen C57BL/6 en BALB/c muizen omvat een verschil in de T cel gemedieerde immuniteit, hetgeen geassocieerd is met verschillen in vasculaire remodeling [10], en het omvat genetische verschillen in het Natural Killer gen Complex (NKC), in het bijzonder in de Ly49 NK cel receptor familie [11, 12]. In de F1 generatie van C57BL/6xBALB/c muizen wordt een dominante rol voor C57BL/6 genen in arteriogenese gevonden, aangezien de matige collateraalvorming van BALB/c muizen compleet wordt verbeterd in deze F1 generatie en overeenkomt met de snelle arteriogenese van de C57BL/6 achtergrond stam.

De modulerende rol van C57BL/6 NK cellen en de immuno-genetische verschillen in het NKC tussen C57BL/6 en BALB/c muizen, waren de aanleiding om het effect van deze stam gebonden NKC verschillen te bestuderen op arteriogenese in **hoofdstuk 5**, en op vasculaire remodelering in het algemeen in **hoofdstuk 6**.

In **hoofdstuk 5** laten we zien dat verschillen in het NKC tussen C57BL/6 en BALB/c gekoppeld zijn aan stam gebonden verschillen in het doorbloedingsherstel. BALB/c muizen die congeen zijn voor het gehele C57BL/6 NKC, BALB.B6-CMV1^r (CMV1^r) muizen [13], laten een substantiële verbetering zien van hun slechte arteriogenese naar het niveau van de snelle arteriogenese van C57BL/6 muizen. De congene muizen laten tevens een significante toename van de diameter van de collateraalarteriën zien.

Depletie van NK cellen in CMV1^r muizen leidt vervolgens tot een vertraging van het doorbloedingsherstel, hetgeen aangeeft dat een deel van de verbeterde arteriogenese in deze muizen wordt verklaard door een NK cel gerelateerde factor die aanwezig is in het C57BL/6 NKC, maar afwezig is in het BALB/c NKC.

In aanvulling hierop, laten we zien dat de NKC verschillen tussen C57BL/6 en BALB/c tevens leiden tot verschillen in NK cel functionaliteit en responsiviteit, aangezien *in vitro* NK cel stimulatie van C57BL/6 en CMV1^r NK cellen tot significant meer responsiviteit leidt dan BALB/c NK cellen. Dit geeft een mogelijk mechanisme aan hoe de NKC verschillen kunnen bijdragen aan verschillen in het doorbloedingsherstel tussen deze muizenstammen.

In **hoofdstuk 6** tonen we de rol van NK cellen in algemene vasculaire remodelering aan. Daarbij wordt in het bijzonder gekeken naar het effect van de stam gebonden NKC verschillen op algemene vasculaire remodelering. Depletie van NK cellen resulteert na plaatsing van een niet constrictieve cuff rondom de arteria femoralis in een significante reductie van intimale hyperplasie in C57BL/6 muizen, hetgeen aangeeft dat NK cellen een modulerende rol spelen in algemene vasculaire remodelering. Cuff plaatsing en vein grafting in C57BL/6, BALB/c muizen en in de BALB/c muis congeen voor het C57BL/6 NKC, CMV1^r, resulteert in forse intimale hyperplasie in C57BL/6 muizen, en tevens in CMV1^r muizen, terwijl dit significant verminderd is in BALB/c muizen. Dit geeft aan dat de stam gebonden NKC verschillen resulteren in verschillen in vasculaire remodelering. Analyse van de leukocyten accumulatie in de vein graft segmenten toont grote aantallen leukocyten in zowel C57BL/6 en CMV1^r muizen, maar niet in BALB/c muizen. Dit suggereert dat door de stamgebonden NKC verschillen een andere inflammatoire respons wordt geïnduceerd die vervolgens leidt tot verschillen in vasculaire remodelering tussen de muizenstammen. Dit wordt onderschreven door de verschillen in NK cel responsiviteit zoals bevonden in het vorige hoofdstuk. De beschikbaarheid van intra-NKC congenen muizenstammen [14] biedt de mogelijkheid om dit gen locus nader te onderzoeken en daarmee genen en receptoren, in het bijzonder binnen de Ly49 NK cel receptor familie, te identificeren die betrokken zijn bij het moduleren van de NK cel functie tijdens vasculaire remodelering.

Om de vertaalslag te maken naar de humane situatie is het van belang te realiseren dat de mens geen functionele Ly49 genen bezit, maar dat deze in de mens worden vertegenwoordigd door de killer Ig-like receptor family (KIR) [15], waarbinnen ook veel genetische variatie beschreven is [16]. De consequenties van deze verschillen op collateraalvorming in de mens zijn niet bekend, maar kunnen gesuggereerd worden aangezien in een recente studie de link kon worden gelegd tussen diverse single nucleotide polymorphismen (SNPs) in inflammatoire respons gerelateerde genen en de vorming van coronaire collateraalarteriën [17]. Het nader onderzoeken van de functionaliteit

en responsiviteit van het immuunsysteem, zou de ontwikkeling van strategieën ten behoeve van risicofratificatie en therapeutische stimulatie van revascularisatie kunnen bevorderen.

Naast de betrokkenheid van inflammatoire cellen vormen groeifactoren een andere potentiële categorie voor therapeutische revascularisatie. De toepassing van groeifactoren voor de stimulatie van revascularisatie is bestudeerd in diverse diermodellen, preklinische en klinische trials [18]. Desondanks het feit dat toepassing van groeifactoren heeft geleid tot inductie van arteriogenese in veel studies, was de mate van succes in klinische trials veel minder uitgesproken. Veel studies laten een effect zien, maar over deze effecten bestaat veel discussie aangezien veel van de effecten betrekking hebben op de secundaire eindpunten, of doordat effecten ook deels in de placebo groep werden geobserveerd.

Om de doeltreffendheid en veiligheid van de toepassing van groeifactoren als therapeutische stimulatie van revascularisatie te vergroten, en om tot betere inzichten te komen aangaande de interpretatie en het begrijpen van de hiermee samenhangende wisselende resultaten, is meer onderzoek nodig [19, 20].

Één verklaring voor deze wisselende resultaten zou de differentiële expressie van angiogene groeifactoren door ischemisch weefsel kunnen zijn, aangezien dit in patiënten afhankelijk blijkt te zijn van de duur van hypoxie. Dit betreft in het bijzonder de expressie van hypoxie induceerbare pro-angiogene groeifactoren, zoals Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), stromal derived factor-1 (SDF-1), en de corresponderende chemokine receptor CXCR4. In **hoofdstuk 7** was de expressie van VEGF, SDF-1 en CXCR4 toegenomen in ischemisch spierweefsel van patiënten met acute ischemie, terwijl de expressie van deze groeifactoren in chronisch ischemisch spierweefsel was afgenomen tot op uitgangsniveau. Dit zou verklaart kunnen worden door onvermogen van de hypoxische weefsels om voldoende van de transcriptie factor hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) tot expressie te brengen in tijden van chronische ischemie. Een andere belangrijke bevinding in dit hoofdstuk is de sleutelrol van SDF-1 in de retentie van uit het beenmerg afkomstige cellen in hypoxische weefsels.

Het onvermogen van chronisch ischemisch spierweefsel om groeifactoren te produceren geeft aan dat in een chronische hypoxische staat een nieuw evenwicht wordt gecreëerd. Dit zou kunnen betekenen dat stimulatie van revascularisatie in patiënten met chronische ischemie mogelijk een andere benadering behoeft. Als suggestie voor therapeutische optimalisering, zou een groeifactor behandeling altijd gecombineerd moeten worden met bewegingstherapie om hiermee acute ischemie over chronische ischemie na te bootsen.

Om meer inzicht te verkrijgen in de complexe signalering van vasculaire groeifactoren, wordt de laatste tijd meer aandacht besteed aan de modulatie van de expressie en translatie van genen door kleine interfererende RNA moleculen genaamd microRNA (miR). Van miRs is het aangetoond dat deze betrokken zijn bij het reguleren van angiogene

celeigenschappen [21] door enerzijds het remmen van de translatie van messenger RNA (mRNA) moleculen naar eiwitten en anderzijds door het bevorderen van mRNA degradatie [22]. In **hoofdstuk 8** laten we zien dat het zeer endotheel specifieke miR-126 [23] pro-angiogene eigenschappen heeft, door het faciliteren van ischemie geïnduceerde capillaire angiogenese. Specifieke remming van miR-126 resulteert in verminderde capillaire angiogenese in de ischemische achterpoot na ligatie van de a. femoralis in C57BL/6 muizen. Mogelijk faciliteert miR-126 angiogenese door verminderde repressie van VEGF gemedieerde signalering. De regulatoire capaciteit van miRs [24, 25] biedt de mogelijkheid van gecoördineerde controle van gen expressie, terwijl miRs ook de uitstekende kwaliteit hebben om celtype specifieke differentiatie en modulatie van de celfunctie te reguleren. Aangezien miRs aan een zeer specifiek expressie profiel voldoen, bieden ze een veel belovende therapeutische benadering met een laag risico op ongunstige bijwerkingen. Wellicht is het zelfs mogelijk om verminderde functie van beenmerg-, immuun-, of endotheelcellen te verbeteren.

Endotheelcellen spelen een belangrijke rol in zowel arterio- als angiogenese, bijvoorbeeld door de expressie van receptoren waardoor cytokines en groeifactoren endotheel cel eigenschappen kunnen moduleren tijdens revascularisatie. Transforming growth factor-beta (TGF- β) is een voorbeeld van een dergelijk cytokine dat endotheelceleigenschappen moduleert tijdens revascularisatie, en waarvan tevens is aangetoond dat het collateraalvorming stimuleert [26]. TGF- β signaleert via verschillende TGF- β receptoren, zoals activin receptor-like kinase 1 (ALK1) en de co-receptor endoglin [27, 28]. Voor beide receptoren is een actieve rol gesuggereerd in shear-stress gedreven vasculaire adaptatie [29, 30].

Hoofdstuk 9 onthult een differentiële rol voor endoglin en ALK1 in shear stress gedreven groei van collateraalarteriën en ischemie geïnduceerde capillaire angiogenese, hetgeen wordt bestudeerd in muizen met een haplo-insufficiëntie voor endoglin of voor ALK1. Haplo-insufficiëntie voor endoglin toont aan dat endoglin betrokken is bij de modulatie van zowel shear stress gedreven groei van collateraalarteriën evenals bij modulatie van ischemie geïnduceerde capillaire angiogenese, terwijl haplo-insufficiëntie voor ALK1 alleen resulteert in verstoorde ischemie geïnduceerde capillaire angiogenese zoals blijkt uit de vorming van dysplastische capillairen. De differentiële rol van endoglin en ALK1 in shear stress gedreven groei van collateraalarteriën wordt bevestigd door toegenomen mRNA niveaus van endoglin, maar niet van ALK1, in embryonale muis endotheelcellen die *in vitro* zijn blootgesteld aan shear stress. Dysfunctie van endotheelcellen door bijvoorbeeld haplo-insufficiëntie voor deze TGF- β receptoren, zou kunnen verklaren waarom stimulatie van revascularisatie met groeifactoren geremd is in bepaalde gevallen.

Conclusie

Revascularisatie is een multifactorieel proces, hetgeen een grote hoeveelheid aan mogelijke therapeutische doelen biedt voor het stimuleren van revascularisatie. Door de snelle ontwikkelingen binnen dit onderzoeksveld worden veel nieuwe therapeutische strategieën geëxploreerd in een translationele onderzoekssetting.

Vanwege de grote verscheidenheid aan therapeutische strategieën, kan stratificatie van het ziekte profiel van iedere individuele patiënt worden aanbevolen, waarin vasculaire risicofactoren, en functionaliteit van endotheelcellen, beenmerg en van het immuunsysteem in kaart moeten worden gebracht. Door deze benadering kan in de toekomst een op het individu toegespitste behandeling worden geleverd, waarbij de patiënt precies wordt ondersteund waar dit nodig is.

In dit proefschrift wordt de rol beschreven van leukocyten bij het herstellen van doorbloeding. In het bijzonder wordt een rol voor NK cellen en CD4+ T lymfocyten getoond, en laten we zien dat genetische verschillen in het Natural Killer gen complex verschillen in vasculaire remodelering bewerkstelligen. Daarnaast laten we zien hoe de expressie van groei factoren en de signalering en regulatie van gen expressie revascularisatie moduleren.

Toekomstig onderzoek is gewenst om het inzicht te verdiepen in deze moleculaire en cellulaire mechanismen en interacties die een rol spelen in revascularisatie. In het bijzonder dient toekomstig onderzoek zich te richten op de interindividuele verschillen in inflammatoire respons, en de daarbij behorende verschillen in de compositie en conditie van circulerende leukocyten populaties. Samenwerking tussen artsen en basaal wetenschappers is essentieel om de nieuwe therapeutische strategieën van de labtafel succesvol in de kliniek te kunnen implementeren.

Referenties

1. Hellingman A, van der Vlugt L, Lijkwan M, Bastiaansen A, Sparwasser T, Smits H, Hamming J, Quax P. A limited role for regulatory T cells in post-ischemic neovascularization. *J Cell Mol Med* 2011 March 22.
2. Stabile E, Burnett MS, Watkins C, Kinnaird T, Bachis A, la Sala A., Miller JM, Shou M, Epstein SE, Fuchs S. Impaired arteriogenic response to acute hindlimb ischemia in CD4-knockout mice. *Circulation* 2003 July 15;108(2):205-10.
3. Stabile E, Kinnaird T, la Sala A., Hanson SK, Watkins C, Campia U, Shou M, Zbinden S, Fuchs S, Kornfeld H, Epstein SE, Burnett MS. CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation* 2006 January 3;113(1):118-24.
4. van Weel V, Toes RE, Seghers L, Deckers MM, de Vries MR, Eilers PH, Sipkens J, Schepers A, Eefting D, van Hinsbergh VWM, van Bockel JH, Quax PHA. Natural killer cells and CD4+ T-cells modulate collateral artery development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 November;27(11):2310-8.
5. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C, Recalde A, Duriez M, Levy BI, Lutgens E, Mallat Z, Silvestre JS. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation* 2009 October 6;120(14):1415-25.
6. Hellingman AA, Zwaginga JJ, van Beem RT, Hamming JF, Fibbe WE, Quax PH, Geutskens SB. T-cell-pre-stimulated monocytes promote neovascularisation in a murine hind limb ischaemia model. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2011 March;41(3):418-28.
7. van Beem RT, Noort WA, Voermans C, Kleijer M, ten BA, van Ham SM, van der Schoot CE, Zwaginga JJ. The presence of activated CD4(+) T cells is essential for the formation of colony-forming unit-endothelial cells by CD14(+) cells. *J Immunol* 2008 April 1;180(7):5141-8.
8. Chalothorn D, Clayton JA, Zhang H, Pomp D, Faber JE. Collateral density, remodeling, and VEGF-A expression differ widely between mouse strains. *Physiol Genomics* 2007 July 18;30(2):179-91.
9. Helisch A, Wagner S, Khan N, Drinane M, Wolfram S, Heil M, Ziegelhoeffer T, Brandt U, Pearlman JD, Swartz HM, Schaper W. Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 March;26(3):520-6.
10. Schulte S, Sukhova GK, Libby P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. *Am J Pathol* 2008 June;172(6):1500-8.
11. Anderson SK, Dewar K, Goulet ML, Leveque G, Makrigiannis AP. Complete elucidation of a minimal class I MHC natural killer cell receptor haplotype. *Genes Immun* 2005 September;6(6):481-92.
12. Ryan JC, Naper C, Hayashi S, Daws MR. Physiologic functions of activating natural killer (NK) complex-encoded receptors on NK cells. *Immunol Rev* 2001 June;181:126-37.
13. Scalzo AA, Lyons PA, Fitzgerald NA, Forbes CA, Shellam GR. The BALB.B6-Cmv1r mouse: a strain congenic for Cmv1 and the NK gene complex. *Immunogenetics* 1995;41(2-3):148-51.
14. Scalzo AA, Brown MG, Chu DT, Heusel JW, Yokoyama WM, Forbes CA. Development of intra-natural killer complex (NKC) recombinant and congenic mouse strains for mapping and functional analysis of NK cell regulatory loci. *Immunogenetics* 1999 March;49(3):238-41.

15. Barten R, Torkar M, Haude A, Trowsdale J, Wilson MJ. Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors. *Trends Immunol* 2001 January;22(1):52-7.
16. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, Milne S, Jones T, Sheer D, Beck S, Trowsdale J. Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 April 25;97(9):4778-83.
17. Zhang J, Regieli JJ, Schipper M, Entius MM, Liang F, Koerselman J, Ruven HJ, van der Graaf Y, Grobbee DE, Doevendans PA. Inflammatory gene haplotype-interaction networks involved in coronary collateral formation. *Hum Hered* 2008;66(4):252-64.
18. van Weel V, van Tongeren RB, van Hinsbergh VWM, van Bockel JH, Quax PHA. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. *Ann Vasc Surg* 2008 July;22(4):582-97.
19. Rajagopalan S, Mohler ER, III, Lederman RJ, Mendelsohn FO, Saucedo JF, Goldman CK, Blebea J, Macko J, Kessler PD, Rasmussen HS, Annex BH. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003 October 21;108(16):1933-8.
20. Simons M, Annex BH, Laham RJ, Kleiman N, Henry T, Dauerman H, Udelson JE, Gervino EV, Pike M, Whitehouse MJ, Moon T, Chronos NA. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002 February 19;105(7):788-93.
21. Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science* 2009 June 26;324(5935):1710-3.
22. Kuehbacher A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 2008 January;29(1):12-5.
23. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell* 2008 August;15(2):261-71.
24. Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005 October 31;579(26):5911-22.
25. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de BE, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005 July 8;309(5732):310-1.
26. Grundmann S, van Royen N, Pasterkamp G, Gonzalez N, Tijmsa EJ, Piek JJ, Hofer IE. A new intra-arterial delivery platform for pro-arteriogenic compounds to stimulate collateral artery growth via transforming growth factor-beta1 release. *J Am Coll Cardiol* 2007 July 24;50(4):351-8.
27. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol* 2010 September;20(9):556-67.
28. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 November;8(11):857-69.
29. Corti P, Young S, Chen CY, Patrick MJ, Rochon ER, Pekkan K, Roman BL. Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Development* 2011 April;138(8):1573-82.

30. Matsubara S, Bourdeau A, terBrugge KG, Wallace C, Letarte M. Analysis of endoglin expression in normal brain tissue and in cerebral arteriovenous malformations. *Stroke* 2000 November;31(11):2653-60.