

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Neffeová

Molekulární mechanismy vývoje koronárních cév

Molecular mechanism of coronary vasculature development

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Kolesová, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Kolesové, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a vstřícnost při konzultacích bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za trpělivost a podporu při psaní bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.4.2021

Podpis:

Abstrakt

Kardiovaskulární systém je prvním funkčním orgánem, který se vyvíjí u obratlovců během embryonálního vývoje. Srdce je nenahraditelné pro transport živin a odvod odpadních látek. Během vývoje embrya srdce nejenom roste, ale zároveň již plní funkci pumpy pohánějící krevní oběh. S postupujícím vývojem je nutné zajistit dostatečné zásobování srdce kyslíkem a vznikají tak koronární cévy. Vzhledem k tomu, že každý kardiomyocyt je obklopen alespoň jednou koronární kapilárou, hraje interakce mezi kardiomyocyty a buňkami endotelu nepostradatelnou roli ve správném fungování srdce. Pochopení, jakým způsobem mezi sebou komunikují tyto dva typy buněk, je nezbytné pro medicínský výzkum regenerace srdeční tkáně.

V dostupné literatuře je popsána řada faktorů, které se účastní vývoje cév a jejich komunikace s kardiomyocyty. Tyto faktory jsou však popisovány jako samostatné signalizační dráhy, nikoliv jako systém navzájem se ovlivňujících mechanismů. Hlavním cílem této bakalářské práce je propojení jednotlivých signalizačních kaskád a popsaní jejich vzájemné interakce. Detailněji jsou shrnuty hlavní faktory VEGF, Notch, PDGF, Angiopoietin a další. Zmíněné jsou i patologie, které jsou spojeny s mutacemi v signalizačních kaskádách a možnosti využití faktorů v medicíně. Výsledky této práce jsou shrnuty v review „Development and pathologies of coronary microvasculature and its crosstalk with cardiomyocytes“ (Neffeová et al., 2021, accepted), ve kterém jsem sepsala kapitolu o mechanismech komunikace kardiomyocytů s endotelovými buňkami koronární mikrocirkulace.

Klíčová slova: angiogeneze, signalizační molekuly, koronární cévy, srdce, embryonální vývoj

Abstract

The cardiovascular system is the first functional system that develops in vertebrates during embryonic development. Its irreplaceable function is the transport of nutrients and the removal of waste products. During the development the heart not only grows, but also acts as a pump that drives the blood circulation of the embryo. With advancing development, it is necessary to ensure an adequate supply of oxygen to the heart, for that reason coronary arteries are formed. Each cardiomyocyte is surrounded by at least one capillary, therefore the interaction between cardiomyocytes and endothelial cells plays an indispensable role in the proper functioning of the heart. Understanding, how cardiomyocytes and endothelial cells communicate, is essential for medical research in cardiac tissue regeneration.

A number of factors involved in coronary development are described in the literature. However, these factors are described as separate signaling pathways, not as a system of mutually interacting mechanisms.

The main goal of my bachelor thesis is to connect individual signaling cascades important in cardiomyocyte-endothelial cell communication and describe their interactions. The main factors overviewed are VEGF, Notch, PDGF, Angiopoietin and others. Factors function and signalization is reviewed in details. Pathologies that are associated with mutations in signaling cascades and the possibility of using factors in medicine are also mentioned.

This work is going to be published in the review „Development and pathologies of coronary microvasculature and its crosstalk with cardiomyocytes“ (Neffeová et al., 2021, accepted), in which I wrote a chapter on the communication of cardiomyocytes with endothelial cells of the coronary microcirculation.

Key words: angiogenesis, signaling molecules, coronary vessels, heart, embryonic development

Seznam použitých zkratek

ABIN-20	A20-binding inhibitor of NFκB-2
Akt/PKB	protein kinase B
Ang1, 2	angiopoietin1, 2
APH1	anterior pharynx-defective 1
Arnt	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
AV	atrioventrikular
bHLH	basic helix-loop-helix proteiny
CaMK	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase
CBP	CREB binding protein
cGMP	cyclic guanosin monophosphate
CM	cardiomyocytes
Co-A, Co-R	co-activator/repressor
CSL	CBF1 – suppressor of hairless – lag-1
DAG	diacylglycerol
DII4	delta like ligand 4
DSL	delta/serrate/lag-2
DNA	deoxyribonucleic acid
EC	endothelial cells
ECE	endothelin-converting enzyme
ED	embryonic day
EGF	epidermal growth factor
EMT	epithelial-to-mesenchymal transition
EPDCs	epicardium-derived cells
EPO	erythropoietin
ErbB	erythroblastic leukemia viral oncogene
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ET	endothelin
FAK	focal adhesion kinase
FGF2	basic fibroblast growth factor
FiH	factor inhibiting HIF

Flk-1/KDR	fetal liver kinase-1 (VEGFR-2)
Flt-1	fms related receptor tyrosine kinase 1 (VEGFR-1)
GC	guanylate cyclase
HH	Hamburger-Hamilton stages
HIF-1	hypoxia-inducible factor
IEM	internal elastic membrane (<i>membrana elastica externa</i>)
IKK α	I κ B kinase
IP3	inositol trisphosphate
Jag	Jagged
KDR	kinase insert domain receptor
MAML1	mastermind-like 1
Man	mastermind
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
MLCK	myosin light-chain kinase
mRNA	messenger RNA
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NICD	notch intracellular domain
NO	nitric oxide
NOS	NO-synthase
Npr3-CreER	natriuretic peptide receptor 3, Cre recombinases
Nrg-1, 2	neuregulin-1, 2
ODD	oxygen-dependent degradation
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF receptor
PGI ₂	prostaglandin I ₂ (prostacyclin)
PHD2	prolyl hydroxylase-2
PIGF	placental growth factor
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase
PEN2	presenilin enhancer 2

PEO	proepicardial organ
PGI ₂	prostaglandin I ₂
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC γ	phospholipase C- γ
P300/PDB	CBP-CREB-binding protein
Rac	ras-related C3 botulinum toxin substrate
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin Kappa J region
ROCK	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase
Src	proto-oncogen tyrosine protein kinase Src
TA	<i>tunica intima</i>
TACE	tumour-necrosis factor- α (TNF α)-converting enzyme (ADAM)
TAD	transactivation domain
TI	<i>tunica intima</i>
Tie1, 2	Ang receptor (TEK)
TM	<i>tunica media</i>
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF faktor
VHL	von Hippel-Lindau
vWf	von Willebrand factor
WT	wild type
Wt1	Wilm's tumor-1 gene

Obsah

1	Úvod	1
2	Vývoj koronárních cév	2
3	Anatomie koronárních cév	4
4	Molekulární mechanismy vaskulogenese a angiogenese	5
4.1	Signalizační faktory.....	8
4.1.1	HIF	8
4.1.1.1	Signalizace	9
4.1.2	VEGF	10
4.1.2.1	Signalizace	11
4.1.3	NOTCH.....	12
4.1.3.1	Signalizace	13
4.1.4	Endotelin	14
4.1.4.1	Signalizace	15
4.1.5	Oxid dusnatý	16
4.1.5.1	Signalizace	17
4.1.6	Angiopietin.....	18
4.1.6.1	Signalizace	18
4.1.7	Neuregulin.....	19
4.1.7.1	Signalizace	20
4.1.8	PDGF.....	20
4.1.8.1	Signalizace	21
5	Závěr.....	23
6	Seznam použité literatury	24

1 Úvod

Onemocnění koronárních artérií patří k nejčastějším příčinám úmrtí u pacientů ve vyspělých státech. Tato onemocnění se vyznačují dysfunkcí koronárních tepen, které zásobují srdeční svalovinu kyslíkem a potřebnými živinami. Mimo běžné příčiny neprůchodnosti cévy nahromaděním aterosklerotických plaků či krevní sraženinou (trombem), je velmi častou příčinou porušení cévní stěny středních a malých koronárních cév (coronary microvascular disease), obojí vede k ischemii srdeční tkáně – infarktu myokardu.

K léčbě onemocnění je nejdříve nutné porozumět základním mechanismům vývoje koronárních cév a komunikaci kardiomyocytů s buňkami endotelu cév.

V této bakalářské práci jsou popsány molekulární mechanismy signalizace osmi hlavních faktorů, které se účastní komunikace mezi endotelem a kardiomyocyty v rámci vývoje a neovaskularizace koronárních cév. Zásadním přínosem této práce je představení těchto faktorů jako systému, ve kterém jednotlivé faktory nepracují izolovaně, ale ovlivňují se navzájem.

Klíčovým signálem kaskády je růstový faktor krevních cév – VEGF, který v reakci na hypoxii indukované faktory HIF atrahuje buňky endotelu k růstu do neokysličeného myokardu. VEGF zároveň podporuje expresi Delta ligandů (Dll4), které po navázání k receptoru Notch dokážou regulovat růst cév. Stabilita cév je zas ovlivněna Angiopoietiny. Faktor PDGF podporuje endotelovou proliferaci prostřednictvím VEGF a stabilizuje cévní stěnu naváděním pericytů. Posledními zmíněnými faktory v této práci jsou oxid dusnatý (NO), zvyšující permeabilitu cév a Neuregulin, který umožňuje diferenciaci buněk ve zralé kardiomyocyty.

Velká část těchto faktorů byla detekována i u dospělých jedinců s ischemií srdeční tkáně. Reaktivace těchto signalizačních drah tak hraje důležitou roli v regeneraci myokardu.

2 Vývoj koronárních cév

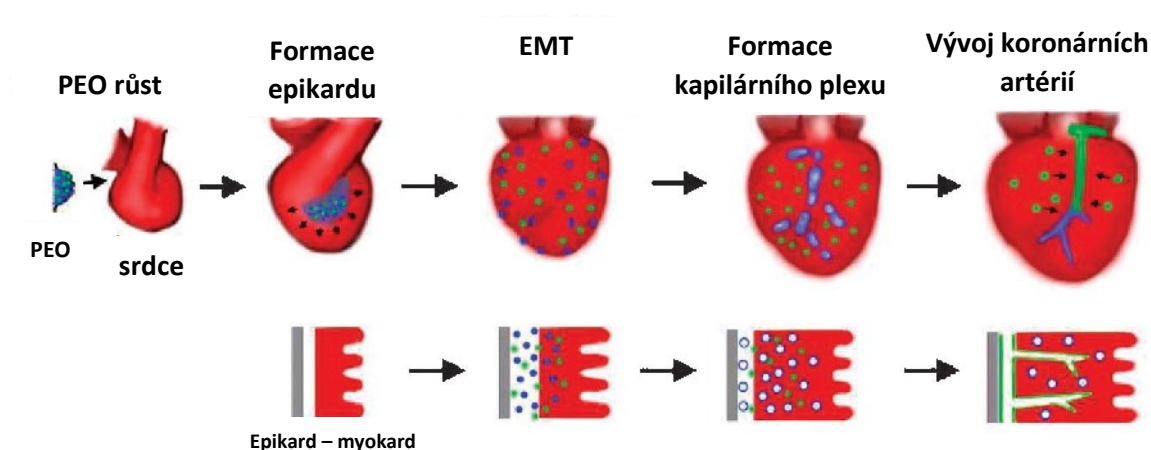
Koronární cévy vznikají mechanismy angiogeneze a vaskulogeneze. Za vaskulogenezi se považuje vývoj primárních cév z angiogenních buněk, které doposud nevytvářely cévní stěnu. Angiogeneze je naopak proces, kdy cévy vznikají tzv. pučením z již existujících cév. Během 4. týdne vývoje lidského embrya začíná primitivním kardiovaskulárním systémem proudit krev (Čihák, 2016; Risau, 1997; Risau and Flamme, 1995; Wada et al., 2003).

Historický pohled na vývoj koronárních cév se s průběhem času zásadně proměňoval. Nejpůvodnější studie zastávaly názor, že koronární artérie vyrůstají z aorty (Bennett, 1936; Grant, 1926; Hutchins et al., 1988; Lewis Frederic T., 1904). Pozdější experimenty na chimérách křepelčích embryích či genetické mapování na myších (genetic cell lineage tracing) prokázaly, že je tomu naopak a artérie se napojují k aortě až po vytvoření vaskulárního plexu (Bogers et al., 1989; Groot et al., 2004; Männer, 1999; Pérez-Pomares et al., 2002; Tian et al., 2013).

Vývoj koronárních tepen je vícestupňový proces, který nejdříve zahrnuje formaci raného plexu a následně jeho remodelaci ve zralou cévní síť. Během rané fáze embryogeneze je srdeční stěna natolik tenká, že nepotřebuje zásobení cévami, dokáže se okysličovat pomocí krve, která protéká samotným orgánem, principem difúze. Následným zesílením srdeční svaloviny a zvýšením metabolismu dochází k aktivaci vaskularizace komor (Dunwoodie, 2009; Red-Horse and Siekmann, 2019). U člověka k tomu dochází ve třetím týdnu zárodečného vývoje (u myší od ED9,5) z proepikardiálního orgánu (PEO), který je lokalizován na perikardiálním povrchu *septum transversum*, blízko *sinus venosus*. Buňky z PEO putují k povrchu myokardu a formují tak epikard. Některé buňky putují do oblasti subepikardu a podstupují EMT (epithelial-mesenchymal transition). Z mezenchymových buněk (tzv. epidermal-derived cells – EPDCs) migrujících myokardem vzniká mimo jiné i hladká svalovina cév (Colliva et al., 2020; Liu and Feng, 2012; Mikawa and Gourdie, 1996; Reese et al., 2002; Virágh and Challice, 1981; Wada et al., 2003). Tento vývoj epikardu potvrdil Männer a spol., u embryí kuřat s odstraněným PEO se nevyvíjel epikard (Männer, 1993).

Většina endotelových buněk a buněk hladké svaloviny koronárních cév se vyvíjejí z mezodermy laterální ploténky. Epikard obklopující myokard dává vzniknout koronárním cévám vnější povrchu srdce a mikrocévám, které jsou uloženy uvnitř myokardu (Dunwoodie, 2009).

I v 21. století je publikovaná celá řada review a článků zabývajících se původem endotelu koronárních cév. Publikovaná data se však v mnoha ohledech liší a ani dnes neexistuje jeden obecně uznávaný závěr endotelového původu. Nejčastěji citované a nejuznávanější pohledy na tuto problematiku představují publikace od Kristy Red-Horse. Výsledky Red-Horse ukazují, že koronární artérie nepochází z PEO, ale z endotelových sproutů *sinus venosus* odkud se rozrůstají po povrchu myokardu a vytvářejí tak koronární plexus (Red-Horse et al., 2010).



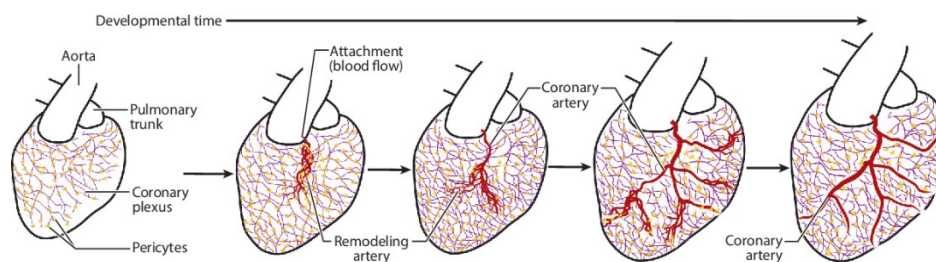
Obr. 1 Vývoj koronárních artérií z proepikardiálního orgánu (PEO).

Horní část schéma zobrazuje průnik PEO (modrá) do srdce ve fázi looping, EMT a formaci plexu v budoucí arteriální síť. Ve spodní části je model mezenchymální migrace a diferenciaci na průřezu myokardu. Upraveno podle (Reese et al., 2002).

Tento zdroj endotelu potvrdily i studie Chen et al., 2014 a Tian et al., 2014. Dalším, avšak minoritním zdrojem je endokard lemující srdeční komory, z kterého buňky migrují, vytvářejí krevní ostrůvky a napojují se na koronární plexus v blízkosti interventrikulárního septa (Red-Horse et al., 2010). Pozdější výzkum, který podobně jako studie Red-Horse využil metodu klonální analýzy (Npr3-CreER) potvrdil zásadní příspěvek endotelu v artériích interventrikulárního septa, u artérií stěn ventrikulu byl původ z endokardu minimální (Zhang et al., 2016).

Koronární artérie se napojují na ascendentní aortu na úrovni pravého a levého *sinus aortae*. Bogers et al., 1989 zaregistrovali přítomnost koronárních tepen ve stěně aorty dříve, než se vytváří koronární ostia. Tento objev podpořil názor, že koronární cévy vrůstají do aorty, nikoliv z ní (Bogers et al., 1989) a byl potvrzen dalšími pokusy na křepelčích chimérách (Poelmann et al., 1993), kuřatech (Waldo et al., 1990) a potkanech (Tomanek et al., 1996). Nejdříve začíná do aorty vrůstat cév hned několik a až posléze se uplatní dvě – *arteria coronaria dextra* a *arteria coronaria sinistra* (Ando et al., 2004). Raný vaskulární plexus je složen z malých, velikostně stejných cév. Po napojení plexu k aortě začíná systémem proudit krev a dochází k remodelaci cév ve kterém je plexus přeměněn v hierarchickou síť artérií, kapilár a vén (Pleva et al., 2014; Sharma et al., 2017). Viz obr. 1 a 2.

Angiogenesi můžeme zaznamenat i v tumorech, které pomocí cév přijímají potřebné živiny a kyslík (Tsuzuki et al., 2001). Role vaskulogenese v patologiích u dospělých byla shrnuta např. v revue Pérez-Pomares a Tomanek and Schattelman (Pérez-Pomares et al., 2016; Tomanek and Schattelman, 2000)



Obr. 2 Model vývoje koronárních artérií.

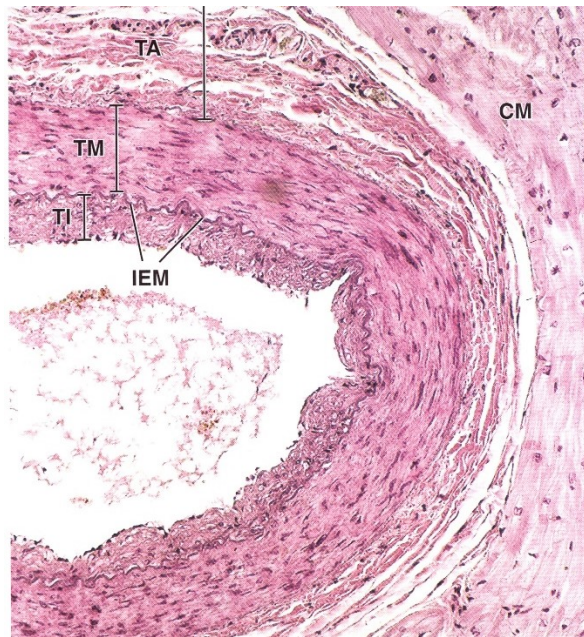
Koronární plexus (fialová) obklopen pericyty (žlutá) migruje po povrchu myokardu a cévy se vnořují i dovnitř svaloviny. Následně se plexus napojí na aortu a dochází k jeho remodelaci ve zralé artérie (červené). Převzato z (Sharma et al., 2017)

3 Anatomie koronárních cév

Cirkulaci živin srdce zajišťují koronární tepny (*arteriae coronariae*) a žíly (*venae cordis*). Protože se mezi cévami srdce vyskytují anastomózy jen v malé míře, z funkčního hlediska fungují koronární cévy jako cévy konečné. Při obstrukci cévy tak dochází k ischemii tkáně, k tzv. infarktu myokardu (Pollard, 2000).

U savců koronární systém sestává ze sítě tepen, arteriol, kapilár, venul a žil (Seiler et al., 2013) a paralelní sítě lymfatických cév (Klaourakis et al., 2021; Norman and Riley, 2016). Artérie a vény jsou složeny z vnitřní endotelové vrstvy, střední vrstvy tvořené hladkou svalovinou a z vnější vrstvy tvořené pojivovou tkání. Artérie se od vén liší především silnější mediální vrstvou s větším zastoupením hladké svaloviny a elastinu.

Histologicky je koronární systém podobný artériím zbytku těla. Histologický snímek koronární tepny na obr. 3. Vnitřní část artérií tvoří *tunica intima*, tvořená podlouhlými buňkami kontinuálního endotelu orientovanými ve směru toku krve. Jedná se o jednovrstevný dlaždicový epitel, který navazuje na *membrana elastica interna* (bazální membrána), síť elastických a kolagenních vláken. U větších cév se vyskytuje subendotelová vrstva řídkého kolagenního vaziva. Prostřední vrstva se nazývá *tunica media*. Jedná se o nejsilnější část arteriální stěny, která je tvořena cirkulárně uspořádanou hladkou svalovinou. Nalézáme zde i kolagenní a elastická vlákna. Podle zastoupení těchto vláken dělíme tepny na tepny elastického či svalového typu. Větší cévy obsahují vyšší zastoupení elastických vláken, aby tak odolaly tlakovým a objemovým změnám během střídání systoly a diastoly. Poslední část se nazývá *tunica externa (adventitia)*, složená z fibrilárního vaziva. Ta je od mediální vrstvy oddělena *membrana elastica externa*. Cévy o průměru větším než 1 mm, kterým nestačí přísun živin z krve protékající lumen, jsou penetrovány přídatnými cévkami, tzv. *vasa vasorum* (Čihák, 2016; Konrádová et al., 2000; Reese et al., 2002)



Obr.3 Histologický snímek koronární tepny

Mikroskopický snímek průřezu koronární tepny dospělého člověka s popisem jednotlivých vrstev cévy. Na obrázku tunica intima (TI), membrana elastica interna (IEM), tunica media (TM), kardiomyocyty (CM), tunica adventitia (TA). Zvětšeno 175krát. Převzato z učebnice Histology (Ross and Pawlina, 2016)

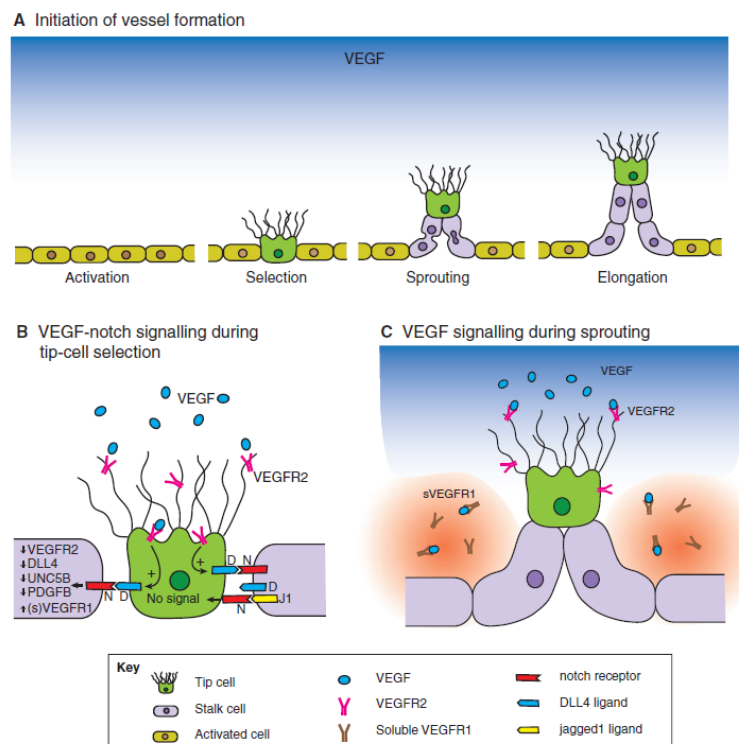
4 Molekulární mechanismy vaskulogeneze a angiogeneze

Za vývoj cév obecně (nejen koronárních cév) je zodpovědných hned několik faktorů a jejich receptorů. Vaskulogeneze je iniciovaná působením růstového faktoru fibroblastů (FGF2 - basic fibroblast growth factor) (Čihák, 2016). Jedná se o faktor s pleiotropickým efektem v odlišných buňkách a odlišných orgánových systémech (Bikfalvi et al., 1997). FGF2 je zodpovědný za diferenciaci mezenchymálních buněk v angioblasty (prekurzory endotelových buněk), které vytváří krevní ostrůvky, tzv. hemangioblasty. Ty se skládají z hematopoetických buněk nacházejících se v centru ostrůvku a z angioblastů, které jsou na obvodu (Poole et al., 2001).

Angiogeneze je zahájena angiogenními signály aktivací endotelových buněk, které jsou doposud v klidovém stádiu. Nejdříve dochází k degradaci bazální membrány pomocí proteáz a k disociaci pericytů, které cévu obklopují a stabilizují. Následně dochází k proliferaci endotelových buněk. Tomuto procesu se říká z „sprouting“, tzv. pučení. Vedoucí buňky tohoto sproutingu se nazývají „tip cells“ (vrcholové buňky) a vytvářejí filopodia, která směřují k místu angiogenního stimulu (Fagiani and Christofori, 2013; Gerhardt et al., 2003; Ruhrberg et al., 2002). Vedoucí buňky jsou následovány „stalk cells“ (buňky následující), které utvářejí lumen cévy. Odlišný fenotyp těchto typů buněk je dán rozdílnou genovou expresí genů, mezi které patří např. Notch, VEGF, PDGFB a další.

Hlavním regulátorem specifiky buněk je Notch signalizační dráha. Aktivace této dráhy spojením Notch se svým ligandem (Delta, Jagged) způsobí transkripci genů, které změni osud dané buňky a pomocí laterální inhibice zabráni stejnému osudu buňce přilehlé. V rámci angiogeneze Notch aktivace zabraňuje tvorbě tip cells a podporuje tvorbu stalk cells (Geudens and Gerhardt, 2011; Hellström et al., 2007).

Mezi nejdůležitější mitogeny stimulující sprouting patří VEGF a jeho receptor VEGFR-2. Tento faktor produkují kardiomyocyty, které tak odpovídají na nízkou koncentraci kyslíku. Expres VEGF je exprimována na základě dimerizace HIF podjednotek. HIF-1 α není v hypoxickém prostředí degradován a tak po dimerizaci s beta podjednotkou zahájí transkripci genů stimulujících vaskularizaci (Alberts, 2002; Diez et al., 2007; Gustafsson et al., 2005). Zároveň VEGF podporuje produkci Dll4. Angiogeneze je však korigována negativní zpětnou vazbou, kdy Notch inhibuje expresi VEGF a tím zabraňuje nadměrné denzitě cév v tkáni. Inhibice v signalizační dráze Notch indukují nadměrné větvení cév (Leslie et al., 2007; Siekmann and Lawson, 2007). Počátky angiogeneze (sprouting) ovlivněné komunikací mezi VEGF a NOTCH viz obr. 4.

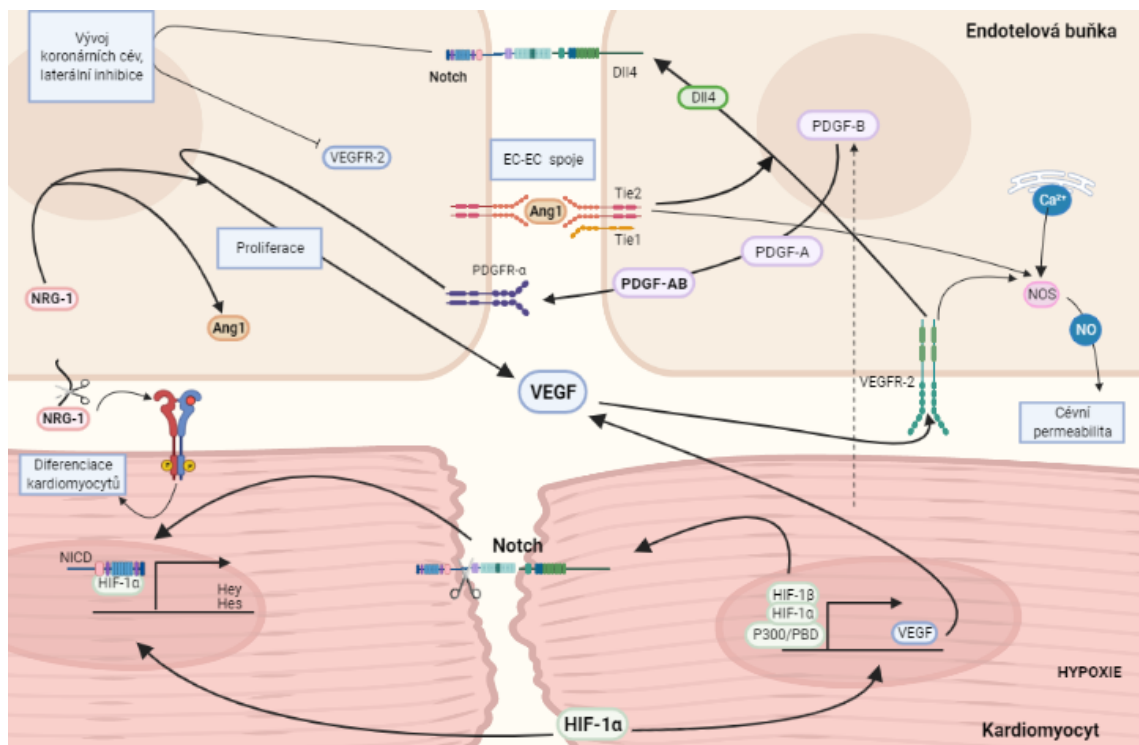


Obr. 4 Model angiogeneze

A) Inicijace formace cévy. Buňky aktivovaného endotelu se diferencují do dvou typů buněk – tip cell a stalk cell. Dochází ke sproutingu a následné elongaci směrem k oblasti vysoké koncentrace VEGF. Aktivace zahájena zvýšenou koncentrací VEGF (modře). B) VEGF/Notch negativní zpětná vazba. C) Solubilní VEGFR1 (sVEGFR1) produkovaný buňkami vedle sproutu, utváří koridor pro usměrnění rostoucí cévy směrem k VEGF. Převzato z (Geudens and Gerhardt, 2011).

Poté, co je vytvořen základ cévy s jejím lumen dochází k maturaci cév a rekrutování pericytů a buněk hladké svaloviny. Za rekrutování pericytů je zodpovědný platelet-derived growth faktor (PDGF-B) (Wilkinson-Berka et al., 2004). Ten zároveň podporuje angiogenesi indukcí exprese VEGF v buňkách endotelu. Pericyty produkují i Angiopoietin, resp. jeden z jeho typů, Ang1, který zajišťuje stabilitu cév. Stabilita cév je podpořena i vytvářením EC-EC spojů pomocí Ang1 a receptoru Tie1 a Tie2 (viz obr. 5). Jeho antagonistou je endotelem produkovaný Ang2, který má destabilizační účinky a napomáhá disociaci pericytů a tak i sproutingu cév. Ang1 zároveň zvyšuje permeabilitu cév prostřednictvím endotelové NO syntázy eNOS a podporuje expresi Dll4 (Barouch et al., 2002; Geudens and Gerhardt, 2011; Patan, 1998; Saharinen et al., 2017; Visconti et al., 2002). Expres Ang1 a VEGF je podporována i Neuregulinem (Nrg-1) (Iivanainen et al., 2007; Zeng et al., 2013)

Pro propojování artérií a vén do jednotného systému, kterým proudí krev je nepostradatelná signalizace pomocí Ephrinů. Wang et al., 1998 prokázali odlišnou expresi Ephrinů v endotelu artérií a vén. Arteriální buňky produkují transmembránový ligand ephrin-B2, který se váže na receptor Eph-B4 na povrchu endotelu žil. Cílené mutace v expresi Ephrinů způsobují defekty přeměny primárního plexu ve zralou koronární síť (Wang et al., 1998).



Obr. 5 Schéma komunikace endotelových buněk a buněk srdeční svaloviny během angiogenese. Šípkami je znázorněna vzájemná regulace faktorů. Schéma vytvořené pro review (Neffeová et al., 2021, accepted) v programu BioRender. Přeloženo do českého jazyka.

4.1 Signalizační faktory

4.1.1 HIF

Transkripční faktor HIF-1 (hypoxial-inducible factor) hraje u savců klíčovou roli v okysličování tkání, a tedy v udržování kyslíkové homeostázi. Jedná se o dimerní protein, který v reakci na nízkou koncentraci kyslíku iniciuje angiogenesi v hypoxických místech, jako jsou ischemické svaly či nádory. HIF-1 indukuje transkripci více než 60 proteinů, mezi které patří například erythropoietin, insuline-like growth factor- α a hlavní mediátor HIF signalizace VEGF faktor (Krishnan et al., 2008; J.-W. Lee et al., 2004).

Tento protein se skládá ze dvou podjednotek. Z jedné varianty HIF- β podjednotky (HIF-1 β /Arnt, Arnt2, Arnt3) a jedné ze tří variant podjednotky HIF- α (HIF-1 α , HIF-2 α nebo HIF-3 α), jejíž exprese, buněčná lokalizace a stabilita je závislá na koncentraci kyslíku, zatímco beta podjednotka je exprimovaná neustále bez vlivu na oxygenaci. Obě podjednotky obsahují N-terminální basic helix-loop-helix motivy (bHLH), ke kterým se váže molekula DNA. V alfa podjednotce se dále nachází oxygen-dependent degradation (ODD) doména, která je hydroxylována proline-hydroxylase-2 (PHD-2). Hydroxylace činí podjednotku náchylnou k proteasomální degradaci za normoxických podmínek, a tak nedochází k signalizaci (Ruas and Poellinger, 2005).

Dále jsou součástí alfa podjednotky dvě transaktivní domény (TAD), které regulují HIF-1 cílené geny. CREB binding protein (CBP) a p300 jsou dva transkripční ko-aktivátory HIF-1 α , interagující s C-terminální TAD (C-TAD) (Dunwoodie, 2009; Menendez-Montes et al., 2016).

Aktivita HIF signalizační dráhy je nezbytná pro správný vývoj srdce. Absence HIF-1 α či HIF-1 β vede k závažným abnormalitám v morfogenezi srdce, absence HIF-2 α nebo HIF-3 α nikoliv. Během vývoje je HIF-1 α exprimován v místech hypoxie, do ED9,5 je myokardium obecně hypoxické (pod 2 %), od ED13,5 je hypoxie omezena na oblast výtokového traktu, myokard mezikomorového septa a atrioventrikulárních polštářků (z angličtiny, cushions – struktura odvozena z endokardu, která utváří budoucí atrioventrikulární septum a chlopně) (Dunwoodie, 2009; Krishnan et al., 2008; J.-W. Lee et al., 2004).

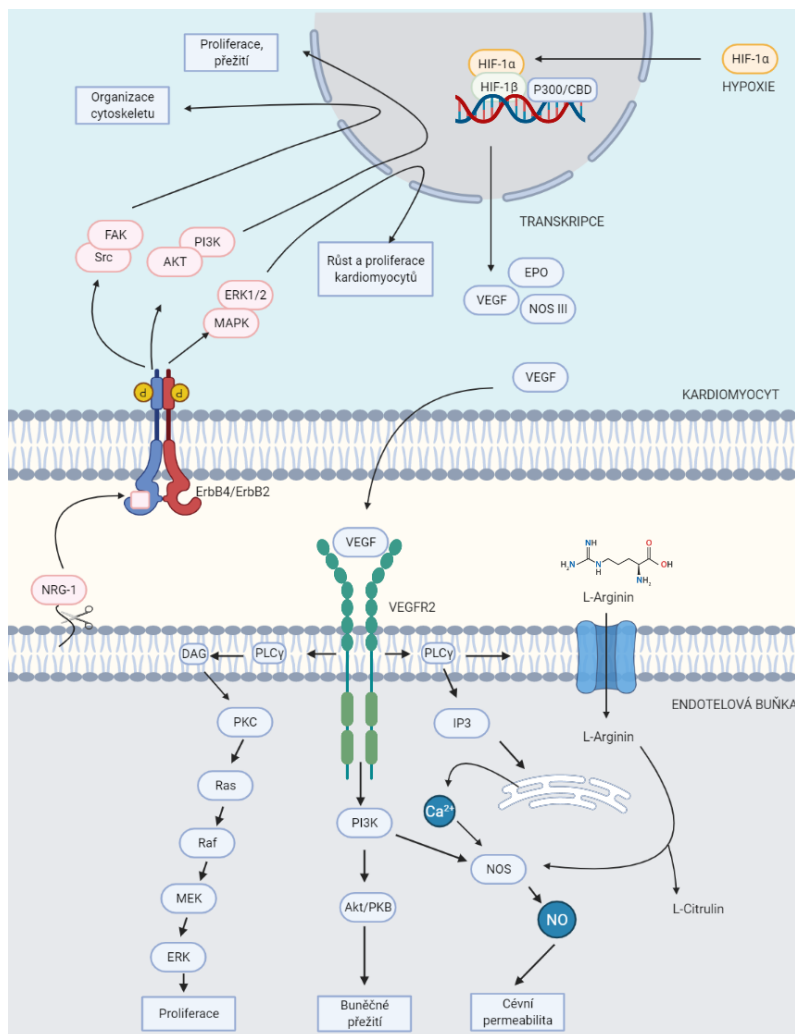
Myší embrya s knock-outovaným genem pro HIF-1 α se dožívají nanejvýš ED10 (looping stage). Z tohoto důvodu nelze touto metodou potvrdit nepostradatelnost HIF faktoru ve vývoji koronárních cév, které vznikají až v pozdějších stádiích. Mezi morfologické defekty delece HIF-1 β a HIF-1 α patří hyperplazie či hypoplazie (dle zasažené alely), zvýšená proliferace kardiomyocytů, redukce nebo absence trabekul. Ztráta HIF-1 α či HIF-2 α v endotelu se neprojevila žádnými malformacemi na rozdíl od delecí v kardiomyocytech, které potvrdili důležitost exprese HIF v myokardu pro vývoj srdce (Adelman et al., 2000; Aitola and Pelto-Huikko, 2003; Dunwoodie,

2009; Huang et al., 2004). Částečná delece HIF-1 α z kardiomyocytů způsobila signifikantní redukci mikrovaskularity (Huang et al., 2004).

HIF-1 se dále účastní procesů imunologické odpovědi a anaerobního metabolismu, ale je zodpovědný i za přežívání a proliferaci rakovinných buněk. Tyto vlastnosti jej řadí mezi možné adepty genové terapie. Aktivací jeho exprese by tak mohl pomoci při léčbě ischemických chorob zatímco jeho inhibicí by se mohlo zamezit růstu nádorů (Ziello et al., 2007).

4.1.1.1 Signalizace

V normoxických podmínkách myokardu (pod 5 % koncentrace kyslíku) dochází k hydroxylaci dvou prolinových zbytků alfa podjednotky pomocí prolyl hydroxylázy-2 (PHD-2). Hydroxylované podjednotky jsou rozpoznány von Hippel-Lindau (VHL)/E3 ubikvitin ligasovým komplexem, a předurčeny tak k degradaci na proteasomech. Zároveň jsou hydroxylované asparaginové zbytky v TAD pomocí FiH (faktor inhibující HIF), které brání navázání transkripční ko-aktivátorů CBP/p300 (viz obr. 6).



Obr. 6 Schéma kaskád signalizačních faktorů VEGF, HIF, Neuregulin (Nrg) a oxid dusnatý (NO).

Schéma vytvořené pro revue (Neffeová et al., 2021, accepted) v programu BioRender. Přeloženo do českého jazyka.

Během hypoxie je inhibována hydroxylace prolinových a asparaginových zbytků. Alfa podjednotka se tak akumuluje v jádře a dimerizuje s beta podjednotkou. Po navázání aktivačních genů, p300 a CBP na domény TAD se zprostředkuje transkripce HIF cílených genů (target genes) (Gustafsson et al., 2005; J.-W. Lee et al., 2004; Ruas and Poellinger, 2005; ZIELLO et al., 2007).

4.1.2 VEGF

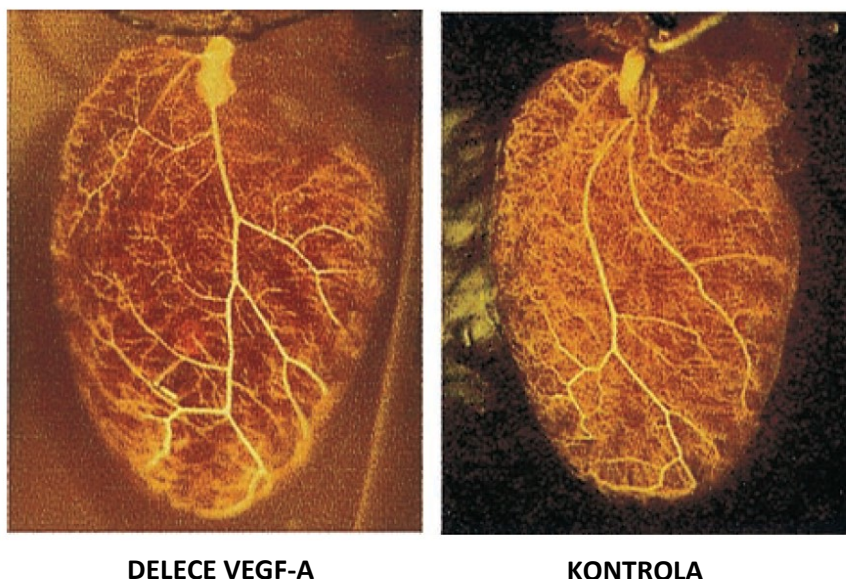
Růstový faktor krevních cév (Vascular endothelial growth factor – VEGF) strukturálně patří do rodiny PDGF. Jeho struktura obsahuje osm konzervovaných cysteinových zbytků, což je pro tuto rodinu specifické. Obecně je známo pět typů VEGF mRNA, které kódují VEGF faktory (VEGF-A, B, C, D a placentální růstový faktor – PlGF). Navzájem se odlišují různou molekulovou hmotností a biologickými funkcemi. To je způsobeno alternativním sestřihem stejného genu (Neufeld et al., 1994).

V rámci angiogenese považujeme za nejdůležitější z těchto typů VEGF-A isoformu, také uváděnou zkráceně jako VEGF. Je důležitým hráčem v procesech angiogenese *in vivo*, vaskulogenese a neoangiogenese, zprostředkovává endotelovou proliferaci, přežívání, vasodilataci a zvyšuje cévní permeabilitu. VEGF také kontroluje EMT během formace atrioventrikulárních polštářků (Chang et al., 2004; Colliva et al., 2020; Coultas et al., 2005; Nilsson and Heymach, 2006; Risau and Flamme, 1995).

Flk-1/KDR null mutantní myši vykazují narušený vývoj endotelových a hematopoetických buněk. Také null mutace Flt-1 vedla k časně embryonální smrti v ED8,5 z důvodu nadměrného růstu a dezorganizaci endotelových buněk (Hiratsuka et al., 1998). Dle Shalaby et al., se nevytváří krevní ostrůvky v žádném stádiu včetně žloutkového váčku (Shalaby et al., 1995). Obdobné výsledky snížené denzity cév se potvrdily i u postnatální delece VEGF receptorů VEGFR-1 a -2 (Ho and Fong, 2015; Karaman et al., 2018).

Myši se specifickou delecí VEGF-A v myokardu se vyznačují nízkou hustotou mikrovaskulatury v srdeční svalovině (viz obr. 7), ale i ztenčenou a dilatovanou stěnou komor a zvýšenou expresí hypoxických faktorů (Giordano et al., 2001). Mutanti s 50% redukcí exprese umírají během ED9,5. Nadměrná exprese VEGF-A způsobuje také ztenčení stěny myokardu, avšak s vysokou nadprodukcí trabekul, defekty ventrikulárního septa a výtokového traktu a zvětšením epikardiálních cév. Letalita se pohybuje mezi ED12,5-ED14 (Miquerol et al., 2000).

Zvýšená exprese VEGF mRNA se může vyskytovat i v tkáních postižených hypoxií, př. akutní či chronické myokardiální ischemii se vyznačují zvýšenou expresí v kardiomyocytech i v hladké svalovině cév (Chintalgattu et al., 2003; Métais et al., 1998). Častá je VEGF exprese v nádorech, které si tak zajišťují přísun kyslíku a živin (Ferrara and Adamis, 2016). Terapie inhibicí faktorů VEGF je ve fázi klinického testování (Almeida et al., 2020; Dieterich and Detmar, 2016).



Obr. 7 Snímek porovnávající vaskularizaci u zdravých myších embryí (ED13,5) a delecemi VEGF-A

Cílená delece VEGF-A v kardiomyocytech myšního embrya stádia ED13,5 (KO) v porovnání se zdravou kontrolou. Delece vedla k výraznému snížení zastoupení cév koronární mikrocirkulace. Změny u velkých cév koronárního řečiště nebyly zaznamenány. Upraveno podle (Giordano et al., 2001).

4.1.2.1 Signalizace

Signalizaci je zprostředkovává vazbou na receptory s tyrosin kinázovou aktivitou, které jsou exprimovány převážně na endotelových buňkách. VEGF se váže na receptory VEGFR1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) a VEGFR-3 (Flk-1). VEGFR1 se vyznačuje vysokou afinitou ke svým ligandům, ale slabou kinázovou aktivitou (Friesel et al., 1986; Maciag and Burgess, 1986). Slouží tedy jako negativní regulátor signalizace VEGF-A/VEGFR2, protože vycytává volné VEGF ligandy. Dle studie Partanen et al., 1999 se výskyt VEGF receptorů vždy nepřekrývá. Jejich přítomnost se lišila i dle velikosti či typu cévy a měnila se i během různých fází vývoje lidského plodu (Partanen Taina A. et al., 1999).

VEGFR-2 sestává z extracelulární, transmembránové a intracelulární domény. Intracelulární doména obsahuje kinázovou doménu a sekvence zodpovědné za následnou signalizaci. Po navázání ligandu (VEGF-A) na imunoglobulinové vazebné místo extracelulární domény dochází k dimerizaci VEGFR-2 (podle Sarabipour et al., 2016, je VEGFR-2 přítomen již ve formě dimerů, které se pouze vazbou s VEGF-A aktivují). Dimerizací dojde k aktivaci kinázové aktivity, a tak k autofosforylaci tyrosinových zbytků. Fosforylace vede k aktivaci signálních molekul – fosfolipázy C- γ (PLC γ), PI3K, Akt, Ras, Src a MAPK. Fosforylace PLC γ stimuluje uvolnění vápenatých iontů (Ca²⁺) z endoplazmatického retikula a k aktivaci protein kinázy C (PKC). Aktivací PKC se zaktivuje signalizace Raf/MEK/ERK, které indukuje proliferaci a za přítomnosti

uvolněných Ca^{2+} iontů PKC podporuje syntézu eNOS, která zvyšuje cévní permeabilitu (viz obr. 6). VEGFR-2 indukuje aktivaci PI3K pomocí hydrolýzy PIP_2 za vzniku DAG a IP_3 , což vede k nahromadění IP_3 a aktivaci Akt/PKB a k inhibici proapoptických proteinů (BAD, caspase-9) (Hamada et al., 2000; Koch and Claesson-Welsh, 2012; Nilsson and Heymach, 2006; Sarabipour et al., 2016). Další funkcí VEGF je regulace funkce VE-kadherinu prostřednictvím Src kinázy, která fosforyluje VE-kadherin, čímž naruší spojení endotelových buněk mezi sebou (Weis et al., 2004) (viz obr.6).

4.1.3 NOTCH

Notch signalizace řídí diferenciaci, apoptózu a proliferaci u řady živočišných tkání, a to pomocí vzájemné komunikace mezi přilehlými buňkami. Umožňuje tak komunikovat příbuzným buňkám, ale i negativně ovlivňovat jiné buňky pomocí laterální inhibice. To má za následek aktivaci Notch dráhy v jedné buňce a supresi v buňce vedlejší. Poruchy v této dráze jsou u člověka spojovány s velkým množstvím geneticky podmíněných onemocnění (Guruharsha et al., 2012; Mumm and Kopan, 2000). Notch signalizační dráha byla poprvé objevena u *Drosophila melanogaster*, odkud dostala své jméno – ztráta funkce genu způsobuje zářezy (z angličtiny notches) na okrajích křídel (Mohr, 1919).

Dráha je založená na interakci čtyř receptorů (Notch 1-4) a na pěti ligandech – Jagged (Jag1, Jag2) a Delta like ligands (Dll1, Dll3 a Dll4). U *D. melanogaster* se ligandy nazývají Serrate a Delta (Zeng et al., 1998) a u *C. elegans* LAG-2 a APX-1 (Greenwald, 1998). Nejvýznamnějšími savčími Notch efektorovými molekulami jsou bezesporu Hes a Hey bHLH geny. Jedná se o analogy k *Drosophila hairy* a enhancer-of-split genům. Stejně jako u *D. melanogaster*, fungují jako transkripční represory k transdukcii Notch signální dráhy. Zatímco Hes geny hrají zásadní roli při formaci neurální lišty a endokrinního systému, Hey geny mají vliv především na kardiovaskulární systém (Wiese et al., 2010).

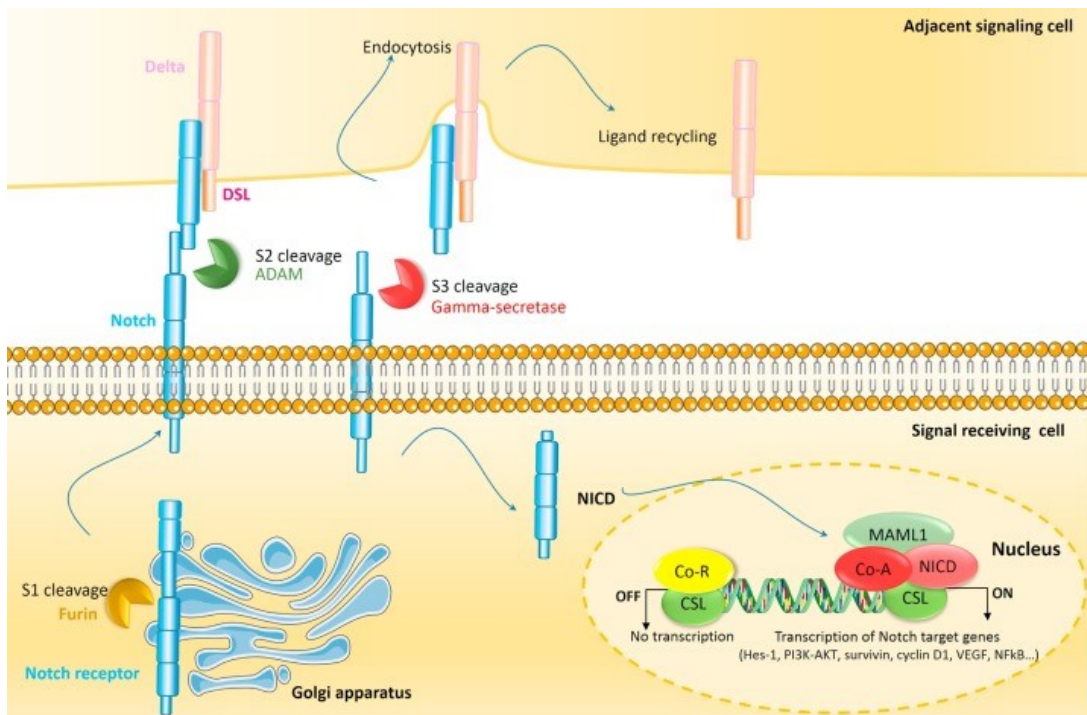
Ve vyvíjejícím se srdci Notch reguluje proliferaci myocytů, trabekularizaci či formaci chlopní. Mutace v této signalizaci může způsobit vrozená srdeční onemocnění, jako jsou defekty výtokového traktu (Jagg1, Notch 2), postižení aortální chlopně (Notch 1), kardiomyopatii (presenilin 1 a 2) (Li et al., 2006), a cerebrální arteriopathii (notch 3) (Joutel et al., 1996).

Notch hraje i nezbytnou roli v komunikaci mezi endokardem a myokardem. Od ED9,5 je Notch1 aktivita detekována ve ventrikulárním endokardu a napomáhá tvorbě trabekul, Jag1 je v tomto období exprimován v kardiomyocytech, Dll4 v endokardiu (D'Amato et al., 2016; MacGrogan et al., 2018). Studie MacGrogan a spol. přichází s tím, že Jag1 a Dll4 se svoji antagonistickou funkcí, regulují v endokardiu *sinus venosus* kapilární sprouting a definují i velikost a organizaci koronárního plexu. V pozdějších stádiích podporují arteriovenózní remodelace a zraní primárního plexu (MacGrogan et al., 2018).

Studie s cílenými mutacemi genů kódujících Notch ligandu ukázala, že jak Jag1 (Xue et al., 1999), tak i Dll1 (de Angelis et al., 1997) homozygotní mutanty umírají okolo gestačního dne ED10,5 na vaskulární defekty samotného embrya i žloutkového váčku. Mutanty Notch4 se vyvíjejí normálně bez závažného fenotypu, zatímco dvojitě mutanty Notch1/Notch4 také vykazují vaskulární defekty a krvácení (Krebs et al., 2000). Mutace v Jag1 způsobuje u lidí Alagille syndrom. Jedná se o autozomálně dominantní onemocnění, které je charakterizováno vývojovými abnormalitami srdce a jiných orgánů (Loomes et al., 1999). Exprese Notch je detekována i postnatálně u potkanů postižených infarktem a to od 4. dne po poškození (Gude et al., 2008). Dle Kratsios et al., 2010 Notch napomáhá neovaskularizaci ischemických tkání, minimalizuje tvorbu fibrózy a zvyšuje tak možnost přežití (Kratsios et al., 2010).

4.1.3.1 Signalizace

Pro zahájení signalizace je potřeba navázání ligandu jedné buňky k receptoru buňky přilehlé. Notch proteiny jsou nejdříve syntetizovány jako prekurzory a následně zpracovány v Golgiho aparátu pomocí furinu a exportovány na povrch buněk, kde tvoří heterodimery (Blamueller et al., 1997; Bush et al., 2001). Ligandy Delta a Jagged, jsou transmembránové proteiny, s velkou extracelulární doménou tvořenou především EGF-like repeats, která slouží k navázání ligandu. Delta a Jagged jsou si navzájem antagoničtí. Vazba ligandu je následována dvěma proteolytickými štěpeními (viz obr. 8). První je katalyzované metaloproteázou z rodiny ADAM (též nazývaná TACE nebo TNF-alpha converting enzyme), zatímco druhé je zprostředkováno γ -sekretázou, enzymovým komplexem presenilinu, nicastrinu, PEN2 a APO1. Druhé štěpení uvolňuje Notch intracelulární doménu (NICD), která se translokuje do jádra a kooperuje s DNA vázajícím proteinem CSL (RBPJ) a proteinem Mastermind (Man) pro zahájení transkripce genů (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Bray, 2006; Kidd et al., 1986). Nejdůležitějšími, nebo alespoň nejlépe prostudovanými efektorovými molekulami jsou Hes a Hey bHLH geny (viz obr. 8). V srdečním vývoji savců se uplatňují tři typy Hey (Hey1, Hey2 a HeyL). Hey a Hes geny jsou transkribovány v řadě buněk (i progenitorových endotelových buněk) jako odpověď na hypoxii (Wiese et al., 2010).



Obr. 8 Schéma Notch signalizace

Notch signalizace je velice konzervovaný proces, proto je tento model platný pro celou řadu buněk. Po prvním štěpení (S1) pomocí furin-like convertase dochází k uvolnění receptoru na povrch buňky, která čeká na příjem signálu. Následně dochází k navázání ligandu (zde Delta) přes DSL doménu. Aktivací Notch dochází k dalším dvěma štěpení (S2, S3). Pomocí ADAM dojde k odpojení od ligandu a gamma-secretase umožní odštěpení NICD. NICD se translokuje do jádra a společně s CSL komplexem odváží ko-represor (Co-R) a naváže ko-aktivátor (Co-A), mastermind-like 1 (MAML1) a dochází k transkripci cílených genů. Převzato z (Majidinia et al., 2018).

4.1.4 Endotelin

Jedná se o skupinu z endotelu odvozených vazokonstrikčních peptidů (ET-1, ET-2). Každá forma endotelinu má svůj vlastní gen, nejedná se tedy o vznik alternativním sestřihem. Nejdůležitější isoformou v kardiovaskulárního systému je ET-1, který byl poprvé izolován z prasečích aortálních endotelových buněk. Tento peptid produkují převážně endotelové buňky a jeho funkce je primárně vazokonstrikční a mitogenní. Můžou ho však produkovat i kardiomyocyty či hladká svalovina. ET-1 stimuluje produkci VEGF a PDGF (Rich and McLaughlin, 2003; Yanagisawa et al., 1988).

ET-1 je produkován v neaktivní formě jakožto prepro-ET-1 mRNA a je konvertován do aktivní formy pomocí endothelin-converting enzyme (ECE-1 a ECE-2). Přestože ECE-2 (null) -/- mutanty neprojevují žádný výrazný fenotyp, ECE-1 null mutanty vykazují defekty výtokového traktu. Dvojitě null mutanty ECE-1 a ECE-2 mají poruchy atrioventrikulárních chlopní (Davenport et al., 2016; Yanagisawa et al., 2000).

Rozdílnou lokalizaci ET-1 a receptoru ET-1 (ET_A) v myších embryích zmapovala skupina Clouthier et al., 1998. Během ED8,5 a ED9,5 wild-type embrya exprimovala ET_A v myokardu komor, atrií i výtokovém traktu. ET-1 však bylo detekováno v endokardiu srdečních komor a v endotelu aortálních oblouků. U ET_A -/- myších embryí bylo časté přerušení aorty, což vedlo k dominantnímu *ductus arteriosus*, který se napojoval na dorsální aortu. Dále u některých jedinců chyběla pravá *arteria subclavia* či trpěli na tubulární hypoplázií aorty. Většina z nich trpěla ventrikulárním septálním defektem (92%) (Clouthier et al., 1998).

Halcox et al. dospěli k závěru, že působení antagonisty ET_B receptoru způsobuje zúžení drobných koronárních cév, aniž by byla ovlivněna funkce endotelu a epikardiální tonus. A to prostřednictvím sníženého odbourávání ET a dostupnosti NO (Halcox et al., 2007).

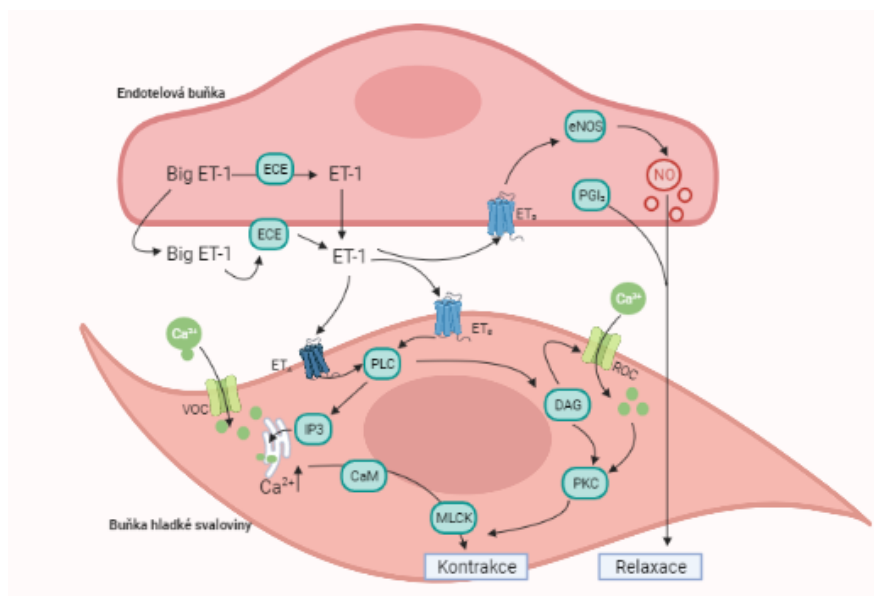
Ve studiích u pacientů s chronickým selháním byla zjištěna zvýšená hodnota ET-1 v plazmě, která se odrážela od závažnosti onemocnění. Antagonisté ET a konvertujícího enzymu ECE by tak mohly být použity v terapii (Love and McMurray, 1996). Sakai et al. popsala pozitivní účinky dlouhodobého podávání antagonisty ET_A potkanům s infarktem myokardu (Sakai et al., 1996). Kiowski et al. potvrdil výhody podání neselektivních antagonistů ET_A /ET_B u lidských pacientů, u kterých se zvýšil srdeční index (srdeční výdej přepočten na 1 m² povrchu těla) (Kiowski et al., 1995).

4.1.4.1 Signalizace

Endotelin působí jak parakrinně, tak autokrinně (Shubeita et al., 1990). Jeho efekt je zajištěn interakcí s jedním ze dvou G-protein spřažených receptorů, procházejících 7x membránou (ET_A a ET_B). Po navázání ET-1 na receptor se oba endocytují do buňky a aktivují signalizační dráhy (Love and McMurray, 1996). Schéma signalizace viz obr. 9.

Stimulace ET_B receptorů usnadňuje uvolnění prostaglandinů I₂ (PGI₂) a NO, což vede k vasodilataci. NO vzniká z L-argininu pomocí NADPH-dependentní dioxigenázy, označované jako NO syntáza (viz kapitola oxid dusnatý). NO syntéza je indukována i MAPK prostřednictvím aktivace PKC. Zatímco po navázání na druhý typ receptoru ET_A dochází ke kontrakci kardiomyocytů či hladké svaloviny a k migraci a k proliferaci buněk v důsledku zvýšené intracelulární hodnoty Ca²⁺ iontů. Ca²⁺ ionty prochází do buněk napětově řízenými kanály (VOC = voltage gated calcium channels) (Podle Houde et al., 2016 je přechod Ca²⁺ napětově nezávislý). Ca²⁺ ionty se uvolňují i ze sarkoplasmatického či endoplazmatického retikula aktivací PLC (fosfolipázy C). PLC přeměňuje PIP₂ na IP₃ a DAG. IP₃ se naváže na receptory sarkoplasmatického retikula a uvolní vápenaté ionty. Koncentrace iontů může být zvýšena i aktivací ryanoidních receptorů, které se otevírají v závislosti na hodnotě přítomných iontů. Cytosolický Ca²⁺ se navazuje na kalmodulin, který aktivuje kalmodulin dependentní kinázu CaMK, která fosforyluje eNOS a tím aktivuje syntézu NO. Ta může být aktivována i fosforylací Akt. To je zprostředkované

přes ET_B/PI3K signalizaci. Ve svalovině je kontrakce zprostředkována MLCK, k jejíž aktivaci vede dráha CaMK, MAPK a PI3K. Inhibici MLCK způsobuje Rho-kináza. ET_A produkce je zvýšena v přítomnosti cytokinů, růstových faktorů, hypoxie a stresu (Guan et al., 2015; Hirata et al., 1993; Houde et al., 2016; Liou et al., 2015; Rich and McLaughlin, 2003).



Obr. 9 Schéma signalizace Endotelinu mezi endotelovou buňkou a buňkou hladké svaloviny. Schéma vytvořené pro revue (Neffeová et al., 2021, accepted) v programu BioRender. Přeloženo do českého jazyka.

4.1.5 Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO), se syntetizuje z aminokyseliny L-argininu třemi izoenzymy syntázy oxidu dusnatého (NOS). Oxid dusnatý je zodpovědný za kardiovaskulární homeostázu, způsobuje relaxaci hladké svaloviny, vazodilatace cév či ventrikulární relaxaci. Dle Brady et al., 1992 jsou i izolované myocyty schopné relaxace pomocí vlastní syntézy NO (Brady et al., 1992).

Endotelová forma syntázy (eNOS) je převážně exprimovaná v endotelových buňkách, kde je její syntéza ovlivněna změnou koncentrace vápenatých iontů, kyslíku či kalmodulinu. Produkce neuronální NOS (nNOS) je rozšířena do více typů buněk, jméno získala podle místa prvního nálezu v cerebellu a je také ovlivněna hodnotami Ca²⁺. Obě formy produkují NO i v kardiomyocytech. Poslední NOS je indukibilní/indukovatelná syntáza, která je produkována buňkami imunitního systému (High and Epstein, 2008; Star, 1993). Někdy se uvádí i čtvrtá forma, jaterní NOS (Geller et al., 1993). Ve studii Barouch et al. představili antagonistickou funkci nNOS a eNOS na kontraktilitu kardiomyocytů. eNOS je lokalizována v buněčných kaveolách a kompartmentalizuje s beta-adrenergními receptory a inhibuje L-type Ca²⁺ kanály, vedoucí k negativní β-adrenergně-indukované ionotropii, zatímco nNOS je cílený na sarkoplasmatické retikulum a usnadňuje uvolnění iontů (pozitivní ionotropní účinek). Myši deficientní na nNOS

měli potlačený ionotropní efekt, deficientní na eNOS naopak zvýšenou kontraktilitu (Barouch et al., 2002).

Syntézu NO mohou stimulovat acetylcholin, bradykinin, angiotensin II, adeninové nukleotidy či trombin. Acetylcholin a bradykinin podporují influx Ca^{2+} iontů. Uvnitř buňky může NO inhibovat agregaci krevních destiček a uvolňování insulinu (Furchgott and Zawadzki, 1980). Studie Sellke et al., zabývající se vlivem nitroglycerinu a NO na prasečí mikrocirkulaci, porovnávala rozdílnou účinnost těchto látek na cévy tří velikostních typů. Na velké cévy (191-300 μm) ošetřené acetylcholinem, působil NO 10x účinněji než na cévy malé (60-100 μm). Jako vysvětlení uvedli nižší obsah enzymů, potřebných k zahájení relaxace (Sellke et al., 1990).

Neonatální eNOS $-/-$ myši trpí na řadu abnormalit koronárních artérií a mikrocirkulace, jejich denzita byla nižší u embryí během ED15,5 v porovnání s WT kontrolami. Zároveň u ranějších embryí byla snižená exprese Wt1 (Wilm's tumor-1 transkripční faktor), který je nezbytný pro EMT, a tedy i formaci koronárních artérií. Syntéza eNOS je prvně exprimovaná u myších a potkaních embryí od ED9,5 (Fukumura et al., 2006; Liu and Feng, 2012).

Protože overexpresse NO ve vyvíjejícím se srdci není podrobně zmapována, tým Siamwala et al, 1990 provedl pokus se zavedením NO do vajíčka s kuřecím embryem (stadium 7-8 dle Hamburger-Hamilton (HH)). Výsledkem bylo *situs inversus* u 28 ze 100 testovaných v HH stádium 24. Důvodem byla zvýšená exprese BMP4 v levé části embrya a snížená migrační schopnost srdečních progenitorových buněk (Siamwala et al., 2019).

Defekty v kaskádě NO byly nalezeny u pacientů s hypertenzí a chorobami koronárních artérií, mezi které patří ateroskleróza či remodelace mikrovaskularity. Homozygotní eNOS mutantní myši kromě hypertenze netrpí na další problémy, díky kompenzaci eNOS jinými mechanismy (Huang et al., 1995; Numaguchi et al., 1995; Star, 1993). Vysoká koncentrace NO je cytotoxická, ošetření kuřecích embryí vysokými koncentracemi NO bylo letální (Siamwala et al., 2019).

K výzkumu NO lze využít i analogy argininu, např. L-nitroarginine či L-N-arginine methyl ester. Analogy blokují relaxaci cév a myokardu (Huang et al., 1995; Sakuma et al., 1988).

4.1.5.1 Signalizace

Z prekursoru L-argininu vzniká kromě NO i L-citrulin, který se této kaskádě neúčastní, ale může se znovu recyklovat do L-argininu. NO difunduje buňkou či k buňce přilehlé a stimuluje zde guanylát cyklázu (GC), čímž dojde k zvýšení koncentrace cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) navázáním GC na jeho hemovou skupinu. cGMP zde funguje jako druhý posel. Následně dochází ke snížení intracelulární hodnoty Ca^{2+} iontů, což vede k relaxaci buněk a k vasodilataci. To se uplatňuje především v komunikaci mezi cévou a hladkou svalovinou (Katusic and Austin, 2014; Moncada and Higgs, 1993; Star, 1993) (viz obr. 6.).

4.1.6 Angiopoietin

Angiopoietiny se váží na tyrosin kinázové receptory Tie1 a Tie2. Ang/Tie signalizační dráha je zodpovědná za vývoj cév během středního gestačního období a zároveň se účastní kontroly cévní permeability a neovaskularizaci v odpovědi na patologické stavy. Ang1 je produkován pericyty a mesenchymálními buňkami. Ang2 je produkován endotelovými buňkami a jeho hodnoty jsou zvýšené stimulací VEGF a v odpovědi na hypoxii. Ang2, který je kompetitivním antagonistou Ang1. Na rozdíl od Ang1 způsobuje destabilizaci endotelové stěny formací aktinových stresových vláken (Dallabrida et al., 2005; Saharinen et al., 2017).

Pro Tie receptor se používá i zkratka TEK, vycházející ze struktury receptoru, tedy tyrosin kináza s imunoglobuliny a EGF homologní doménou. Angiogeneze se účastní především Ang1 a Ang2 ligandy, u člověka existuje však i třetí typ Ang4, jehož ortologem je u myši Ang3 (Fagiani and Christofori, 2013; Nishimura et al., 1999).

Ang1 a Tie2 knock-outy způsobují poruchy cévního dozrávání a formaci endokardu a trabekul. Obdobný fenotyp je vidět i u transgenních myšič s overexpresí Ang2 (Saharinen et al., 2017). Myši s nadprodukcí Ang1 během vývoje neměly vyvinuté koronární cévy (Ward and Dumont, 2002) a umírají na vykrvácení (ED12,5-15,5). Tie1 null embrya angiogenezi narušenou nemají, avšak umírají v rozmezí od ED13,5 a narozením kvůli krvácení způsobeném ztrátou integrity cév (Puri et al., 1995). Tie2 null embryos umírají do ED12,5 bez vyvinuté cévní sítě (Suri et al., 1996).

Ang/Tie2 signalizace se účastní i remodelace myokardu při patologiích. Exprese Ang2 je zvýšena po infarktu myokardu a zvýšená hodnota v plazmě se vyskytuje i u pacientů se srdečním selháním. Zatímco Ang1 exprese je v hypoxickém myokardu snížena (K. W. Lee et al., 2004).

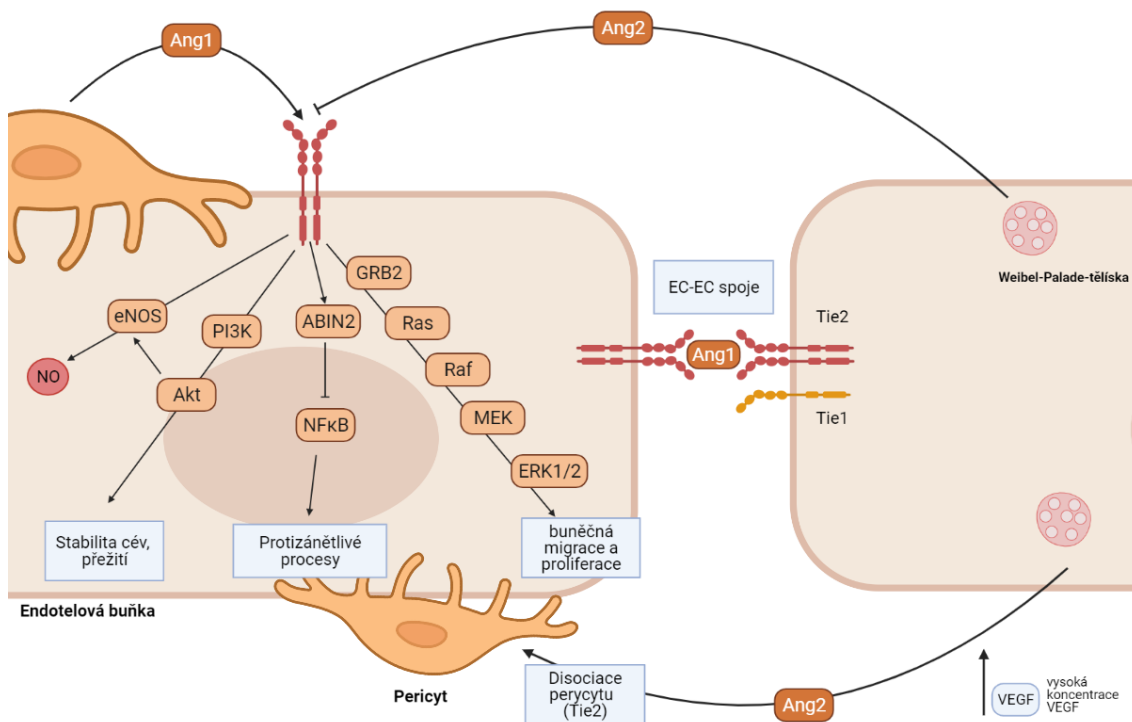
4.1.6.1 Signalizace

Angiopoietiny se váží na druhý imunoglobulinový motiv receptoru Tie2, čímž dojde k jeho aktivaci autofosforylací. Nepřímo může být aktivován i Tie1 heterodimerizací s Tie2 aktivovaným receptorem (viz obr. 10). Autofosforylace aktivuje řadu signalizačních kaskád včetně PI3K/Akt dráhy, která podporuje přežívání endotelových buněk. Aktivací PKB/Akt stimuluje tvorbu NO (Saharinen et al., 2017), dále stimuluje GRB2 (growth factor receptor-bound protein2), účastníci se dráhy Ras/Raf/MEK/ERK1/ERK2, která aktivuje proliferaci a migraci (Fukuhara et al., 2008). Podporuje i tvorbu ABIN-20 (A20-binding inhibitor of NFκB-2) (Tadros et al., 2003), čímž potlačuje aktivitu NFκB-2 a ochraňuje tak endotelové buňky před apoptózou.

Ang1 podporuje i vaskulární stabilitu pomocí spojů (junctions) mezi sousedními endotelovými buňkami formací komplexu Tie1/Tie2/Ang1. Zároveň Ang1 stabilizuje vaskulární kadherin (VE-cadherin) (Saharinen et al., 2017). V přítomnosti VEGF dochází k uvolňování pericytů obklopujících endotel aktivací Ang2 a jeho receptoru Tie2. Ang2 je uvolňován

z Weibel-Palade tělísek v reakci na hypoxii, PDGF nebo VEGF a zvyšuje tak permeabilitu membrány. To umožňuje snadnější průchod faktorů, které zaktivují angiogenesi.

Ang1 podobně jako VEGF indukuje tip cell expresi Dll4, která aktivuje Notch na sousedních stalk cells a předchází tak přeměně na tip cells (Geudens and Gerhardt, 2011; Saharinen et al., 2017; Thurston and Kitajewski, 2008).



Obr. 10 Schéma signalizace Angiopoietinu (Ang1 a Ang2) v buňkách endotelu.

Tmavě oranžově jsou znázorněny pericyty, světle oranžově endotelové buňky. Schéma vytvořené pro revue (Neffeová et al., 2021, accepted) v programu BioRender. Přeloženo do českého jazyka.

4.1.7 Neuregulin

Neureguliny (Nrg) jsou strukturně podobné proteiny patřící do rodiny EGF. Tyto signální molekuly se účastní buněčné diferenciace, proliferace, přežívání, ale i apoptózy. Jedná se o ligandy receptorů tyrosin kinázové rodiny ErbB. U savců nalzáme čtyři typy Nrg genů, které vznikají rozdílným post-transkripčním sestřihem (NRG-1, NRG-2, NRG-3, and NRG-4). Nejdůležitějším signální drahou v rámci vývoje srdce je Nrg1/ErbB2/4. Všechny isoformy Nrg-1 obsahují EGF-like signaling doménu, které zprostředkovává navázání na receptor. Během rané kardiogeneze je Nrg1 syntetizován endotelem malých koronárních cév do extracelulárního prostoru, kde je navázán na receptor ErbB4, který se nachází na kardiomyocytech (Oghenerukevwe et al., 2012; Wu et al., 2018).

V případě delece ErbB4, ErbB3 nebo ErbB2 dochází k významné deficienci ventrikulární trabekularizace a formace AV polštářků, z kterých následně vznikají AV chlopně (Garratt, 2006;

Gassmann et al., 1995; Xu et al., 2010). Poškození končí úmrtím embryí během stádií střední embryogeneze, což se potvrdilo i u rybího modelu *Dario rerio* (Rupert and Coulombe, 2015). Naopak Nrg2 deficientní myši na srdeční defekty netrpěly (Britto et al., 2004).

Neuregulinová aktivita je nejen důležitá pro vývoj srdce, ale i pro kontrolu jeho funkce u dospělých. Potvrdila se i účinnost Nrg-1 při léčbě srdečního selhání jak u zvířecích modelů s chronickým selháním, tak i u lidských pacientů. Výsledkem je zlepšení kontraktility myokardu pro pumpování krve (pumping function), zabránění komorové dilatace a podpora reparace kardiomyocytů. Léčba rakoviny prsu, při které byla použita monoklonální anti-ErbB2 protilátka v léku Trastuzumab byla provázena nežádoucími účinky spojených se srdečním selháním a dysfunkcí systolické funkce levé komory (Slamon et al., 2001; Telli et al., 2007; Xu et al., 2010).

4.1.7.1 Signalizace

Navázáním ligandu Nrg1 na ErbB4 (nebo ErbB3) dochází ke konformační změně receptoru a k dimerizaci s ErbB2, která vede k fosforylaci C-terminální domény. ErbBs se skládají z extracelulární domény, kde je vazebné místo pro ligand, transmembránové domény a intracelulární s tyrosin kinázovou aktivitou. Fosforylace způsobí aktivaci řady signalizačních drah, mezi které patří aktivace protein kinázy B (Akt)/PI3K, Ras/MEK/ERK1/2, Src/focal adhesion kinase (FAK) a NOS. Ras/MEK/ERK1/2 signalizace řídí organizaci sarkomer a myofibrilogenezi. Src/FAK signalizace podporuje aktinovou polymerizaci, organizaci myofilament a expresi β -myosinových těžkých řetězců, buněčné přežití a interakci kardiomyocytů (Garratt, 2006; Mendes-Ferreira et al., 2013; Rupert and Coulombe, 2015; Xu et al., 2010, 2010). Neureguliny produkované endotelem zároveň chrání kardiomyocyty před peroxidy, antracykliny a beta-adrenergními receptory.

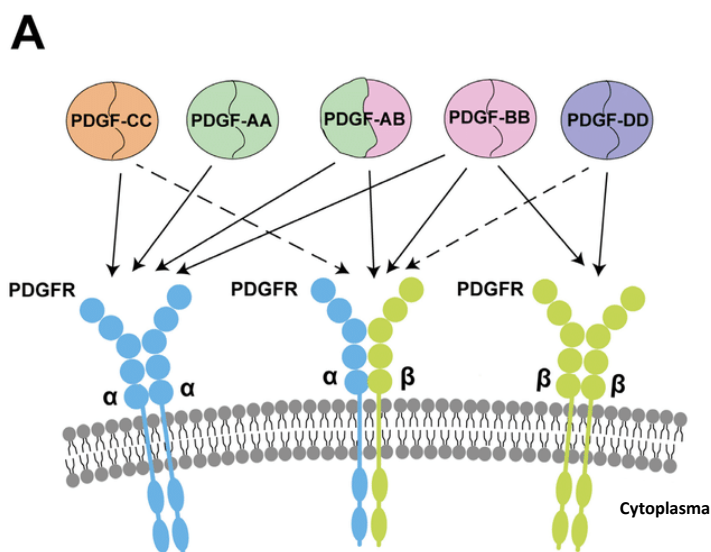
Nrg-1 může také indukovat angiogenesi v rakovinových buňkách prsu prostřednictvím zvýšené exprese VEGF a Ang1 a indukovat tvorbu buněk hladké svaloviny cév (Bagheri-Yarmand et al., 2000; Iivanainen et al., 2007; Zeng et al., 2013)

4.1.8 PDGF

Platelet-derived growth factor je skupina růstových hormonů tvořena třemi dimerními ligandy PDGF AA, PDGF BB a PDGF-AB (viz obr. 11), které se váží na patřičné receptory (PDGFR). PDGFR- α interaguje s A nebo B řetězcem PDGF, zatímco PDGFR- β pouze s B řetězcem (Levéen et al., 1994).

Dle *in vitro* studie Edelberg et al., 1998 endotel malých koronárních cév exprimuje PDGF-A formu, (výsledkem homodimer -AA) ale nikoliv PDGF-B. Pokud jsou ke kultuře přidány buňky kardiomyocytů, endotelové buňky začnou exprimovat i PDGF-B variantu, což vede ke vzniku heterodimeru PDGF-AB. PDGF-AB se váže na receptor PDGFR- α na přilehlé buňky endotelu, který projde dimerizací. Tento heterodimer indukuje endotelovou transkripci von Willebrand

faktoru (vWF), Flk-1 a VEGF. PDGF se tak účastní kontroly angiogeneze (Edelberg et al., 1998). Dále existují i formy PDGF-C a PDGF-D (Fredriksson et al., 2004).



Obr. 11 Schéma PDGF-PDGFR interakcí.

Upraveno podle (Evrova and Buschmann, 2017).

Homozygotní delece jednoho z účastníků kaskády vede k letalitě embryí se značnými vaskulárními abnormalitami. PDGF-B a PDGFR- β deficientní myši umírají perinatálně s mikrovaskulární dysfunkcí, s dilatací srdce a velkých artérií (Bjarnegård et al., 2004; Levéen et al., 1994). PDGF-A a PDGFR- α myši ošetřené neutralizujícími protilátkami se vyznačovaly kromě mikrovaskulárními poruchami i myokardiální hypertrofií a epikardiálními a endokardiálními abnormality (Schatteman et al., 1996).

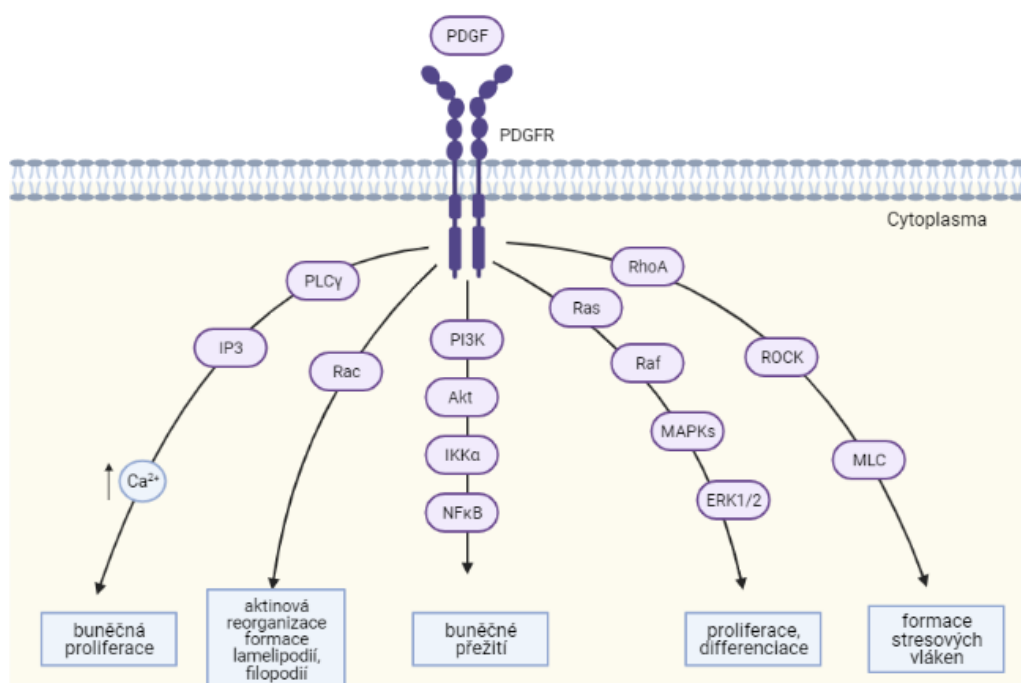
U neonatálních potkanů byla prokázána pozitivní účinnost PDGF-BB na kontraktilitu a antiapoptický účinek kardiomyocytů. PDGF-BB indukuje Akt fosforylaci a předchází apoptóze signalizací PI3K/Akt zprostředkovanou PDGF-BB/PDGFR- β . Je prokázáno, že PDGF podporuje neovaskularizaci v postinfarktní tkáni (Edelberg et al., 1998; Hsieh et al., 2006). Regeneraci, systolickou funkci a postinfarktovou proliferaci potvrdila i studie (Yue et al., 2019). Zvýšená hodnota PDGF byla naměřena v odpovědi na infarkt myokardu (Ogawa et al., 1992). Lze tedy uvažovat o možném terapeutickém významu PDGF.

4.1.8.1 Signalizace

PDGF receptory patří do rodiny tyrosin kináz a jejich aktivací následuje autofosforylace tyrosinových zbytků intracelulární domény (Kelly et al., 1991). Pro alfa, beta i heterodimerovou variantu receptoru je typická řada signalizačních drah, které byly zmíněné i u předchozích faktorů. Signalizační dráhy jsou zakresleny na obr. 12.

Fosforylace receptoru vede k začlenění PLC γ do plazmatické membrány a k fosforylaci samotné PLC γ . To vede k mobilizaci vápenatých iontů a k aktivaci PKC. Výsledkem je buněčná

proliferaci a zvýšená motilita (Kundra et al., 1994). Podobně jako u fosfolipázy dochází k aktivaci PI3K. PI3K má řadu efektorových molekul, mezi které v PDGF signalizaci patří např. Rac (člen Rho rodiny malých GTPáz) důležitý pro reorganizaci aktinu, chemotaxi a k formaci lamelipodií. PI3K aktivuje i serin/threoninovou kinázu Akt/PKB pro antiapoptický efekt. Akt aktivuje IκB kinázu (IKKα), způsobující degradaci NF-κB, což napomáhá buněčnému přežívání. Dále aktivuje Ras systém, který zprostředkovává dráhu Raf (proto-oncogene serine/threonine protein kinase)/MEK/ERK. Tato dráha podněcuje fosforylaci transkripčních faktorů a podněcuje expresi řady genů. Další účastníkem z Rho rodiny je RhoA (Ras homolog family member A), která prostřednictvím ROCK (Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase) fosforyluje MLC a ovlivňuje tak formaci stresových vláken (stress fibres) (Du and Montminy, 1998; Gutjahr et al., 2005; Heldin and Westermark, 1999; Tallquist and Kazlauskas, 2004; Ying et al., 2017).



Obr. 12 Schéma základních signálních kaskád PDGF.

Schéma vytvořené pro revue (Neffeová et al., 2021, accepted) v programu BioRender. Přeloženo do českého jazyka.

5 Závěr

Původ endotelu koronárních cév je i v dnešní době předmětem diskusí. Mimo klasického modelu migrace endotelových cév z proepikardiálního orgánu se v posledních deseti letech ukazuje, že část koronárních cév pochází i ze *sinus venosus* a také z endokardu srdečních komor. Nejen původ, ale i molekulární mechanismy vývoje koronárních cév patří mezi důležité otázky základního výzkumu srdce. Informace získané z normálního embryonálního vývoje, jakými mechanismy komunikují buňky cév s okolním myokardem, prohloubí naše znalosti a umožní porozumět i postnatální reaktivaci těchto mechanismů při patologických situacích a tím i napomohou léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

V této práci jsou shrnuty nejen molekulární mechanismy jednotlivých faktorů, ale i jejich vzájemná komunikace. Dále je shrnuta i jejich celková úloha v komunikaci kardiomyocytů a endotelových buněk a tím i ve vývoji srdce.

Výsledky této rešeršní práce jsou reprezentovány v pěti schématech, které jsem vytvořila v grafickém programu BioRender. Rešerše a schémata signalizačních mechanismů jsou jednak podkladem této bakalářské práce a také budou publikovány jako review: Development and pathologies of coronary microvasculature and its crosstalk with cardiomyocytes, WIREs Mechanisms of Disease, IF 4,28.

V diplomové práci bych ráda navázala na problematiku embryonálního vývoje a embryonální regeneraci myokardu se zaměřením na neovaskularizaci myokardu pomocí koronárních cév. V Laboratoři molekulární embryologie prof. Sedmery na Anatomickém ústavu 1. LF UK na modelu japonské křepelky (*Coturnix japonica*) testujeme metodu „Cryo-injury“, kdy lokálním zmrazením tkáně tekutým dusíkem u raných embryonálních stádiích vytvoříme nekrózu myokardu. Následně budeme studovat mechanismy, které se při embryonální regeneraci myokardu aktivovaly, a které napomohou pochopení mechanismů reparace myokardu po infarktu v dospělosti. Znalosti těchto signalizačních mechanismů získané v průběhu přípravy této bakalářské práce budou základem dalšího výzkumu v mojí diplomové práci.

6 Seznam použité literatury

Neffeová, K., Olejníčková, V., Nařka, O., Kolesová, H., 2021. Development and pathologies of coronary microvasculature and its crosstalk with cardiomyocytes. WIREs Mechanisms of Disease, IF-4,28, accepted.

(Publikace přijatá do časopisu WIREs Mechanism of Disease, do které jsem přispěla hlavní kapitolou, a to o molekulárních mechanismech komunikace mezi endotelovými buňkami a myokardem. Výsledkem bakalářské práce jsou schémata, která jednotlivé interakce názorně popisují).

Adelman, D.M., Gertsenstein, M., Nagy, A., Simon, M.C., Maltepe, E., 2000. Placental cell fates are regulated in vivo by HIF-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 14, 3191–3203.

Aitola, M.H., Pelto-Huikko, M.T., 2003. Expression of Arnt and Arnt2 mRNA in developing murine tissues. *J Histochem Cytochem* 51, 41–54.
<https://doi.org/10.1177/002215540305100106>

Alberts, B. (Ed.), 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th ed. ed. Garland Science, New York.

Almeida, P.E. de, Mak, J., Hernandez, G., Jesudason, R., Herault, A., Javinal, V., Borneo, J., Kim, J.M., Walsh, K.B., 2020. Anti-VEGF Treatment Enhances CD8+ T-cell Antitumor Activity by Amplifying Hypoxia. *Cancer Immunol Res* 8, 806–818. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0360>

Ando, K., Nakajima, Y., Yamagishi, T., Yamamoto, S., Nakamura, H., 2004. Development of proximal coronary arteries in quail embryonic heart: multiple capillaries penetrating the aortic sinus fuse to form main coronary trunk. *Circ Res* 94, 346–352.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000112963.79064.09>

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J., 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
<https://doi.org/10.1126/science.284.5415.770>

Bagheri-Yarmand, R., Vadlamudi, R.K., Wang, R.-A., Mendelsohn, J., Kumar, R., 2000. Vascular Endothelial Growth Factor Up-regulation via p21-activated Kinase-1 Signaling Regulates Heregulin- β 1-mediated Angiogenesis *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 39451–39457.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M006150200>

Barouch, L.A., Harrison, R.W., Skaf, M.W., Rosas, G.O., Cappola, T.P., Kobeissi, Z.A., Hobai, I.A., Lemmon, C.A., Burnett, A.L., O'Rourke, B., Rodriguez, E.R., Huang, P.L., Lima, J.A.C., Berkowitz, D.E., Hare, J.M., 2002. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337–339. <https://doi.org/10.1038/416337a>

Bennett, H.S., 1936. The development of the blood supply to the heart in the embryo pig. *American Journal of Anatomy* 60, 27–53. <https://doi.org/10.1002/aja.1000600103>

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B., 1997. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr. Rev.* 18, 26–45. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0292>

Bjarnegård, M., Enge, M., Norlin, J., Gustafsdottir, S., Fredriksson, S., Abramsson, A., Takemoto, M., Gustafsson, E., Fässler, R., Betsholtz, C., 2004. Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities. *Development* 131, 1847–1857. <https://doi.org/10.1242/dev.01080>

- Blaumueller, C.M., Qi, H., Zagouras, P., Artavanis-Tsakonas, S., 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. *Cell* 90, 281–291. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80336-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80336-0)
- Bogers, A.J.J.C., Gittenberger-de Groot, A.C., Poelmann, R.E., Péault, B.M., Huysmans, H.A., 1989. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol* 180, 437–441. <https://doi.org/10.1007/BF00305118>
- Brady, A.J., Poole-Wilson, P.A., Harding, S.E., Warren, J.B., 1992. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol* 263, H1963-1966. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1963>
- Bray, S.J., 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm2009>
- Britto, J.M., Lukehurst, S., Weller, R., Fraser, C., Qiu, Y., Hertzog, P., Busfield, S.J., 2004. Generation and characterization of neuregulin-2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 24, 8221–8226. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.18.8221-8226.2004>
- Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J.B., Leduc, R., Weinmaster, G., 2001. Ligand-induced signaling in the absence of furin processing of Notch1. *Dev Biol* 229, 494–502. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9992>
- Chang, C.-P., Neilson, J.R., Bayle, J.H., Gestwicki, J.E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I.A., Crabtree, G.R., 2004. A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell* 118, 649–663. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.010>
- Chen, H.I., Sharma, B., Akerberg, B.N., Numi, H.J., Kivelä, R., Saharinen, P., Aghajanian, H., McKay, A.S., Bogard, P.E., Chang, A.H., Jacobs, A.H., Epstein, J.A., Stankunas, K., Alitalo, K., Red-Horse, K., 2014. The sinus venosus contributes to coronary vasculature through VEGFC-stimulated angiogenesis. *Development* 141, 4500–4512. <https://doi.org/10.1242/dev.113639>
- Chintalgattu, V., Nair, D.M., Katwa, L.C., 2003. Cardiac myofibroblasts: a novel source of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors Flt-1 and KDR. *J Mol Cell Cardiol* 35, 277–286. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00006-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00006-3)
- Čihák, R., 2016. *Anatomie 3, Třetí, upravené a doplněné vydání.* ed. Grada Publishing a.s., Praha.
- Clouthier, D.E., Hosoda, K., Richardson, J.A., Williams, S.C., Yanagisawa, H., Kuwaki, T., Kumada, M., Hammer, R.E., Yanagisawa, M., 1998. Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* 125, 813–824.
- Colliva, A., Braga, L., Giacca, M., Zacchigna, S., 2020. Endothelial cell–cardiomyocyte crosstalk in heart development and disease. *The Journal of Physiology* 598, 2923–2939. <https://doi.org/10.1113/JP276758>
- Coultas, L., Chawengsaksophak, K., Rossant, J., 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature* 438, 937–945. <https://doi.org/10.1038/nature04479>
- Dallabrida, S.M., Ismail, N., Oberle, J.R., Himes, B.E., Rupnick, M.A., 2005. Angiopoietin-1 promotes cardiac and skeletal myocyte survival through integrins. *Circ Res* 96, e8-24. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000158285.57191.60>

D'Amato, G., Luxán, G., del Monte-Nieto, G., Martínez-Poveda, B., Torroja, C., Walter, W., Bochter, M.S., Benedito, R., Cole, S., Martinez, F., Hadjantonakis, A.-K., Uemura, A., Jiménez-Borreguero, L.J., de la Pompa, J.L., 2016. Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nat Cell Biol* 18, 7–20. <https://doi.org/10.1038/ncb3280>

Davenport, A.P., Hyndman, K.A., Dhaun, N., Southan, C., Kohan, D.E., Pollock, J.S., Pollock, D.M., Webb, D.J., Maguire, J.J., 2016. Endothelin. *Pharmacol Rev* 68, 357–418. <https://doi.org/10.1124/pr.115.011833>

de Angelis, M., McIntyre, J., Gossler, A., 1997. Maintenance of somite borders in mice requires the Delta homologue Dll1. *Nature* 386, 717–721. <https://doi.org/10.1038/386717a0>

Dieterich, L.C., Detmar, M., 2016. Tumor lymphangiogenesis and new drug development. *Adv Drug Deliv Rev* 99, 148–160. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.011>

Diez, H., Fischer, A., Winkler, A., Hu, C.-J., Hatzopoulos, A.K., Breier, G., Gessler, M., 2007. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Experimental Cell Research* 313, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.09.009>

Du, K., Montminy, M., 1998. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem* 273, 32377–32379. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32377>

Dunwoodie, S.L., 2009. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. *Developmental Cell* 17, 755–773. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.11.008>

Edelberg, J.M., Aird, W.C., Wu, W., Rayburn, H., Mamuya, W.S., Mercola, M., Rosenberg, R.D., 1998. PDGF mediates cardiac microvascular communication. *J Clin Invest* 102, 837–843.

Evrova, O., Buschmann, J., 2017. In vitro and in vivo effects of PDGF-BB delivery strategies on tendon healing: a review. *Eur Cell Mater* 34, 15–39. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a02>

Fagian, E., Christofori, G., 2013. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Letters* 328, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.08.018>

Ferrara, N., Adamis, A.P., 2016. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nat Rev Drug Discov* 15, 385–403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>

Fredriksson, L., Li, H., Eriksson, U., 2004. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.007>

Friesel, R., Burgess, W.H., Mehlman, T., Maciag, T., 1986. The characterization of the receptor for endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. *J Biol Chem* 261, 7581–7584.

Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H.Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G.Y., Mochizuki, N., 2008. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* 10, 513–526. <https://doi.org/10.1038/ncb1714>

Fukumura, D., Kashiwagi, S., Jain, R.K., 2006. The role of nitric oxide in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 6, 521–534. <https://doi.org/10.1038/nrc1910>

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376. <https://doi.org/10.1038/288373a0>

- Garratt, A.N., 2006. "To erb-B or not to erb-B..." Neuregulin-1/ErbB signaling in heart development and function. *J Mol Cell Cardiol* 41, 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.05.020>
- Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., Lemke, G., 1995. Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor. *Nature* 378, 390–394. <https://doi.org/10.1038/378390a0>
- Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Wang, S.C., Nakayama, D.K., Simmons, R.L., Snyder, S.H., Billiar, T.R., 1993. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3491–3495. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3491>
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., Betsholtz, C., 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 161, 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>
- Geudens, I., Gerhardt, H., 2011. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 138, 4569–4583. <https://doi.org/10.1242/dev.062323>
- Giordano, F.J., Gerber, H.P., Williams, S.P., VanBruggen, N., Bunting, S., Ruiz-Lozano, P., Gu, Y., Nath, A.K., Huang, Y., Hickey, R., Dalton, N., Peterson, K.L., Ross, J., Chien, K.R., Ferrara, N., 2001. A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5780–5785. <https://doi.org/10.1073/pnas.091415198>
- Grant, R.T., 1926. Development of the cardiac coronary vessels in the rabbit. *Heart* 13, 261–271.
- Greenwald, I., 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. *Genes Dev.* 12, 1751–1762. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1751>
- Groot, A.G., Eralp, I., Lie-Venema, H., Bartelings, M.M., Poelmann, R.E., 2004. Development of the coronary vasculature and its implications for coronary abnormalities in general and specifically in pulmonary atresia without ventricular septal defect. *Acta Paediatrica* 93, 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2004.tb00234.x>
- Guan, Z., VanBeusecum, J.P., Inscho, E.W., 2015. Endothelin and the Renal Microcirculation. *Seminars in Nephrology* 35, 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2015.02.004>
- Gude, N.A., Emmanuel, G., Wu, W., Cottage, C.T., Fischer, K., Quijada, P., Muraski, J.A., Alvarez, R., Rubio, M., Schaefer, E., Sussman, M.A., 2008. Activation of Notch-mediated protective signaling in the myocardium. *Circ Res* 102, 1025–1035. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.164749>
- Guruharsha, K.G., Kankel, M.W., Artavanis-Tsakonas, S., 2012. The Notch signalling system: recent insights into the complexity of a conserved pathway. *Nat Rev Genet* 13, 654–666. <https://doi.org/10.1038/nrg3272>
- Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., Bondesson, M., 2005. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9, 617–628. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.09.010>

- Gutjahr, M.C., Rossy, J., Niggli, V., 2005. Role of Rho, Rac, and Rho-kinase in phosphorylation of myosin light chain, development of polarity, and spontaneous migration of Walker 256 carcinosarcoma cells. *Experimental Cell Research* 308, 422–438. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.05.001>
- Halcox, J., Nour Khaled R.A., Zalos Gloria, Quyyumi Arshed A., 2007. Endogenous Endothelin in Human Coronary Vascular Function. *Hypertension* 49, 1134–1141. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.083303>
- Hamada, K., Oike, Y., Takakura, N., Ito, Y., Jussila, L., Dumont, D.J., Alitalo, K., Suda, T., 2000. VEGF-C signaling pathways through VEGFR-2 and VEGFR-3 in vasculoangiogenesis and hematopoiesis. *Blood* 96, 3793–3800.
- Heldin, C.H., Westermark, B., 1999. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 79, 1283–1316. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1283>
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M.L., Kalén, M., Gerhardt, H., Betsholtz, C., 2007. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 445, 776–780. <https://doi.org/10.1038/nature05571>
- High, F.A., Epstein, J.A., 2008. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat. Rev. Genet.* 9, 49–61. <https://doi.org/10.1038/nrg2279>
- Hirata, Y., Emori, T., Eguchi, S., Kanno, K., Imai, T., Ohta, K., Marumo, F., 1993. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 91, 1367–1373. <https://doi.org/10.1172/JCI116338>
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., Shibuya, M., 1998. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *PNAS* 95, 9349–9354. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9349>
- Ho, V.C., Fong, G.-H., 2015. Vasculogenesis and Angiogenesis in VEGF Receptor-1 Deficient Mice, in: Fiedler, L. (Ed.), *VEGF Signaling: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology. Springer, New York, NY, pp. 161–176. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2917-7_12
- Houde, M., Desbiens, L., D'Orléans-Juste, P., 2016. Endothelin-1: Biosynthesis, Signaling and Vasoreactivity. *Adv Pharmacol* 77, 143–175. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.05.002>
- Hsieh, P.C.H., Davis, M.E., Lisowski, L.K., Lee, R.T., 2006. Endothelial-cardiomyocyte interactions in cardiac development and repair. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 51–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040104.124629>
- Huang, P.L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K.D., Moskowitz, M.A., Bevan, J.A., Fishman, M.C., 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377, 239–242. <https://doi.org/10.1038/377239a0>
- Huang, Y., Hickey, R.P., Yeh, J.L., Liu, D., Dadak, A., Young, L.H., Johnson, R.S., Giordano, F.J., 2004. Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* 18, 1138–1140. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1510fje>
- Hutchins, G.M., Kessler-Hanna, A., Moore, G.W., 1988. Development of the coronary arteries in the embryonic human heart. *Circulation* 77, 1250–1257. <https://doi.org/10.1161/01.cir.77.6.1250>

- Iivanainen, E., Paatero, I., Heikkinen, S.-M., Junttila, T.T., Cao, R., Klint, P., Jaakkola, P.M., Cao, Y., Elenius, K., 2007. Intra- and extracellular signaling by endothelial neuregulin-1. *Exp Cell Res* 313, 2896–2909. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.042>
- Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., Maciazek, J., Vayssiere, C., Cruaud, C., Cabanis, E.A., Ruchoux, M.M., Weissenbach, J., Bach, J.F., Bousser, M.G., Tournier-Lasserre, E., 1996. Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710. <https://doi.org/10.1038/383707a0>
- Karaman, S., Leppänen, V.-M., Alitalo, K., 2018. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. *Development* 145. <https://doi.org/10.1242/dev.151019>
- Katusic, Z.S., Austin, S.A., 2014. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind. *Eur Heart J* 35, 888–894. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh544>
- Kelly, J.D., Haldeman, B.A., Grant, F.J., Murray, M.J., Seifert, R.A., Bowen-Pope, D.F., Cooper, J.A., Kazlauskas, A., 1991. Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation. *J Biol Chem* 266, 8987–8992.
- Kidd, S., Kelley, M.R., Young, M.W., 1986. Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. *Molecular and Cellular Biology* 6, 3094–3108. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.9.3094>
- Kiowski, W., Kim, J., Oechslin, E., Sütsch, G., Hunziker, P., Müller, P., Bertel, O., Schmitt, R., Jones, R., 1995. Evidence for endothelin-1-mediated vasoconstriction in severe chronic heart failure. *The Lancet* 346, 732–736. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:S0140673695915044>
- Klaourakis, K., Vieira, J.M., Riley, P.R., 2021. The evolving cardiac lymphatic vasculature in development, repair and regeneration. *Nat Rev Cardiol*. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-00489-x>
- Koch, S., Claesson-Welsh, L., 2012. Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006502>
- Konrádová, V., Uhlík, J., Vajner, L., 2000. *Funkční histologie*. H & H, Jinočany.
- Kratsios, P., Catela Catarina, Salimova Ekaterina, Huth Marion, Berno Valeria, Rosenthal Nadia, Mourkioti Foteini, 2010. Distinct Roles for Cell-Autonomous Notch Signaling in Cardiomyocytes of the Embryonic and Adult Heart. *Circulation Research* 106, 559–572. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.203034>
- Krebs, L.T., Xue, Y., Norton, C.R., Shutter, J.R., Maguire, M., Sundberg, J.P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G.H., Stark, K.L., Gridley, T., 2000. Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes Dev* 14, 1343–1352.
- Krishnan, J., Ahuja, P., Bodenmann, S., Knapik, D., Perriard, E., Krek, W., Perriard, J.-C., 2008. Essential Role of Developmentally Activated Hypoxia-Inducible Factor 1 α for Cardiac Morphogenesis and Function. *Circulation Research*.
- Kundra, V., Escobedo, J.A., Kazlauskas, A., Kim, H.K., Rhee, S.G., Williams, L.T., Zetter, B.R., 1994. Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor-beta. *Nature* 367, 474–476. <https://doi.org/10.1038/367474a0>

- Lee, J.-W., Bae, S.-H., Jeong, J.-W., Kim, S.-H., Kim, K.-W., 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36, 1–12. <https://doi.org/10.1038/emm.2004.1>
- Lee, K.W., Lip, G.Y.H., Blann, A.D., 2004. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation* 110, 2355–2360. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000138112.90641.7F>
- Leslie, J.D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A.L., McAdow, R., Johnson, S.L., Lewis, J., 2007. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* 134, 839–844. <https://doi.org/10.1242/dev.003244>
- Levéen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., Betsholtz, C., 1994. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 8, 1875–1887. <https://doi.org/10.1101/gad.8.16.1875>
- Lewis Frederic T., 1904. The question of sinusoids. *Anat Anz* 25.
- Li, D., Parks, S.B., Kushner, J.D., Nauman, D., Burgess, D., Ludwigsen, S., Partain, J., Nixon, R.R., Allen, C.N., Irwin, R.P., Jakobs, P.M., Litt, M., Hershberger, R.E., 2006. Mutations of presenilin genes in dilated cardiomyopathy and heart failure. *Am J Hum Genet* 79, 1030–1039. <https://doi.org/10.1086/509900>
- Liou, S.-F., Hsu, J.-H., Chen, Y.-T., Chen, I.-J., Yeh, J.-L., 2015. KMUP-1 Attenuates Endothelin-1-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy through Activation of Heme Oxygenase-1 and Suppression of the Akt/GSK-3 β , Calcineurin/NFATc4 and RhoA/ROCK Pathways. *Molecules* 20, 10435–10449. <https://doi.org/10.3390/molecules200610435>
- Liu, Y., Feng, Q., 2012. NOing the heart: role of nitric oxide synthase-3 in heart development. *Differentiation* 84, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.04.004>
- Loomes, K.M., Underkoffler, L.A., Morabito, J., Gottlieb, S., Piccoli, D.A., Spinner, N.B., Baldwin, H.S., Oakey, R.J., 1999. The expression of Jagged1 in the developing mammalian heart correlates with cardiovascular disease in Alagille syndrome. *Hum Mol Genet* 8, 2443–2449. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.13.2443>
- Love, M.P., McMurray, J.J.V., 1996. Endothelin in congestive heart failure. *Basic Res Cardiol* 91, 21–29. <https://doi.org/10.1007/BF00810520>
- MacGrogan, D., Münch, J., de la Pompa, J.L., 2018. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration. *Nat Rev Cardiol* 15, 685–704. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0100-2>
- Maciag, T., Burgess, W.H., 1986. Endothelial cell growth factor. *Prog Clin Biol Res* 226, 361–369.
- Majidinia, M., Darband, S.G., Kaviani, M., Nabavi, S.M., Jahanban-Esfahlan, R., Yousefi, B., 2018. Cross-regulation between Notch signaling pathway and miRNA machinery in cancer. *DNA Repair* 66–67, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2018.04.002>
- Männer, J., 1999. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. *Anat Rec* 255, 212–226. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(19990601\)255:2<212::aid-ar11>3.3.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(19990601)255:2<212::aid-ar11>3.3.co;2-o)

- Männer, J., 1993. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol* 187, 281–289. <https://doi.org/10.1007/BF00195766>
- Mendes-Ferreira, P., De Keulenaer, G.W., Leite-Moreira, A.F., Brás-Silva, C., 2013. Therapeutic potential of neuregulin-1 in cardiovascular disease. *Drug Discovery Today* 18, 836–842. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.01.010>
- Menendez-Montes, I., Escobar, B., Palacios, B., Gómez, M.J., Izquierdo-Garcia, J.L., Flores, L., Jiménez-Borreguero, L.J., Aragones, J., Ruiz-Cabello, J., Torres, M., Martin-Puig, S., 2016. Myocardial VHL-HIF Signaling Controls an Embryonic Metabolic Switch Essential for Cardiac Maturation. *Developmental Cell* 39, 724–739. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.012>
- Métais, C., Li, Jianyi, Li, Jian, Simons, M., Sellke, F.W., 1998. Effects of coronary artery disease on expression and microvascular response to VEGF. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 275, H1411–H1418. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.4.H1411>
- Mikawa, T., Gourdie, R.G., 1996. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 174, 221–232. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0068>
- Miquerol, L., Langille, B.L., Nagy, A., 2000. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 127, 3941–3946.
- Mohr, O.L., 1919. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 4, 275–282.
- Moncada, S., Higgs, A., 1993. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002–2012. <https://doi.org/10.1056/NEJM199312303292706>
- Mumm, J.S., Kopan, R., 2000. Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228, 151–165. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9960>
- Neffeová, K., Veronika, O., Naňka, O., Kolesová, H., 2021. Development and pathologies of coronary microvasculature and its crosstalk with cardiomyocytes. *Wires Mechanism of disease*.
- Neufeld, G., Tessler, S., Gitay-Goren, H., Cohen, T., Levi, B.Z., 1994. Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.* 5, 89–97. [https://doi.org/10.1016/0955-2235\(94\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0955-2235(94)90019-1)
- Nilsson, M., Heymach, J.V., 2006. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Pathway. *Journal of Thoracic Oncology* 1, 768–770. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)30404-4](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)30404-4)
- Nishimura, M., Miki, T., Yashima, R., Yokoi, N., Yano, H., Sato, Y., Seino, S., 1999. Angiopoietin-3, a novel member of the angiopoietin family. *FEBS Letters* 448, 254–256. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00381-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00381-6)
- Norman, S., Riley, P.R., 2016. Anatomy and development of the cardiac lymphatic vasculature: Its role in injury and disease. *Clin Anat* 29, 305–315. <https://doi.org/10.1002/ca.22638>
- Numaguchi, K., Egashira, K., Takemoto, M., Kadokami, T., Shimokawa, H., Sueishi, K., Takeshita, A., 1995. Chronic Inhibition of Nitric Oxide Synthesis Causes Coronary Microvascular Remodeling in Rats. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.26.6.957>

- Ogawa, H., Yasue, H., Misumi, I., Masuda, T., Okumura, K., Bannai, S., Takanashi, N., Tsukada, Y., 1992. Plasma platelet-derived growth factor levels in coronary circulation in unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 69, 453–456. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(92\)90984-7](https://doi.org/10.1016/0002-9149(92)90984-7)
- Oghenerukevwe, O., Hill Michael F., Sawyer Douglas B., 2012. Neuregulin in Cardiovascular Development and Disease. *Circulation Research* 111, 1376–1385. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.267286>
- Partanen Taina A., Makinen Taija, Arola Johanna, Suda Toshio, Weich Herbert A., Alitalo Kari, 1999. Endothelial Growth Factor Receptors in Human Fetal Heart. *Circulation* 100, 583–586. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.6.583>
- Patan, S., 1998. TIE1 and TIE2 receptor tyrosine kinases inversely regulate embryonic angiogenesis by the mechanism of intussusceptive microvascular growth. *Microvasc Res* 56, 1–21. <https://doi.org/10.1006/mvre.1998.2081>
- Pérez-Pomares, J.-M., Carmona, R., González-Iriarte, M., Atencia, G., Wessels, A., Muñoz-Chápuli, R., 2002. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol* 46, 1005–1013.
- Pérez-Pomares, J.M., de la Pompa, J.L., Franco, D., Henderson, D., Ho, S.Y., Houyel, L., Kelly, R.G., Sedmera, D., Sheppard, M., Sperling, S., Thiene, G., van den Hoff, M., Basso, C., 2016. Congenital coronary artery anomalies: a bridge from embryology to anatomy and pathophysiology—a position statement of the development, anatomy, and pathology ESC Working Group. *Cardiovasc. Res.* 109, 204–216. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv251>
- Pleva, L., Jonszta, T., Kukla, P., 2014. Congenital coronary anomalies. *Cor et Vasa* 56, e27–e36. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2013.10.003>
- Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C., Mentink, M.M., Bökenkamp, R., Hogers, B., 1993. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res* 73, 559–568. <https://doi.org/10.1161/01.res.73.3.559>
- Pollard, T.J., 2000. The acute myocardial infarction. *Prim Care* 27, 631-649;vi. [https://doi.org/10.1016/s0095-4543\(05\)70167-6](https://doi.org/10.1016/s0095-4543(05)70167-6)
- Poole, T.J., Finkelstein, E.B., Cox, C.M., 2001. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev. Dyn.* 220, 1–17. [https://doi.org/10.1002/1097-0177\(2000\)9999:9999::AID-DVDY1087>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1087>3.0.CO;2-2)
- Puri, M.C., Rossant, J., Alitalo, K., Bernstein, A., Partanen, J., 1995. The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells. *EMBO J* 14, 5884–5891.
- Red-Horse, K., Siekmann, A.F., 2019. Veins and Arteries Build Hierarchical Branching Patterns Differently: Bottom-Up versus Top-Down. *Bioessays* 41, e1800198. <https://doi.org/10.1002/bies.201800198>
- Red-Horse, K., Ueno, H., Weissman, I.L., Krasnow, M.A., 2010. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 464, 549–553. <https://doi.org/10.1038/nature08873>
- Reese, D., Mikawa Takashi, Bader David M., 2002. Development of the Coronary Vessel System. *Circulation Research* 91, 761–768. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000038961.53759.3C>

- Rich, S., McLaughlin, V.V., 2003. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation* 108, 2184–2190. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000094397.19932.78>
- Risau, W., 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674. <https://doi.org/10.1038/386671a0>
- Risau, W., Flamme, I., 1995. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73–91. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.000445>
- Ross, M.H., Pawlina, W., 2016. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*, Seventh edition. ed. Wolters Kluwer Health, Philadelphia.
- Ruas, J.L., Poellinger, L., 2005. Hypoxia-dependent activation of HIF into a transcriptional regulator. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Biology of Hypoxia and Myogenesis and Muscle Disease* 16, 514–522. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2005.04.001>
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., Shima, D.T., 2002. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 16, 2684–2698. <https://doi.org/10.1101/gad.242002>
- Rupert, C.E., Coulombe, K.L., 2015. The Roles of Neuregulin-1 in Cardiac Development, Homeostasis, and Disease. *Biomark Insights* 10, 1–9. <https://doi.org/10.4137/BMI.S20061>
- Saharinen, P., Eklund, L., Alitalo, K., 2017. Therapeutic targeting of the angiopoietin–TIE pathway. *Nature Reviews Drug Discovery* 16, 635–661. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.278>
- Sakai, S., Miyauchi, T., Kobayashi, M., Yamaguchi, I., Goto, K., Sugishita, Y., 1996. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 384, 353–355. <https://doi.org/10.1038/384353a0>
- Sakuma, I., Stuehr, D.J., Gross, S.S., Nathan, C., Levi, R., 1988. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *PNAS* 85, 8664–8667. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.22.8664>
- Sarabipour, S., Ballmer-Hofer, K., Hristova, K., 2016. VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *Elife* 5, e13876. <https://doi.org/10.7554/eLife.13876>
- Schatteman, G.C., Loushin, C., Li, T., Hart, C.E., 1996. PDGF-A Is Required for Normal Murine Cardiovascular Development. *Developmental Biology* 176, 133–142. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.9988>
- Seiler, C., Stoller, M., Pitt, B., Meier, P., 2013. The human coronary collateral circulation: development and clinical importance. *European Heart Journal* 34, 2674–2682. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh195>
- Sellke, F.W., Myers, P.R., Bates, J.N., Harrison, D.G., 1990. Influence of vessel size on the sensitivity of porcine coronary microvessels to nitroglycerin. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 258, H515–H520. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.2.H515>
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M.L., Schuh, A.C., 1995. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376, 62–66. <https://doi.org/10.1038/376062a0>

- Sharma, B., Chang, A., Red-Horse, K., 2017. Coronary Artery Development: Progenitor Cells and Differentiation Pathways. *Annu. Rev. Physiol.* 79, 1–19. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-033953>
- Shubeita, H.E., McDonough, P.M., Harris, A.N., Knowlton, K.U., Glembotski, C.C., Brown, J.H., Chien, K.R., 1990. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem* 265, 20555–20562.
- Siamwala, J.H., Kumar, P., Veeriah, V., Muley, A., Rajendran, S., Konikkat, S., Majumder, S., Mani, K.P., Chatterjee, S., 2019. Nitric Oxide Reverses the Position of the Heart during Embryonic Development. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20051157>
- Siekmann, A.F., Lawson, N.D., 2007. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature* 445, 781–784. <https://doi.org/10.1038/nature05577>
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., Baselga, J., Norton, L., 2001. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 344, 783–792. <https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101>
- Star, R.A., 1993. Nitric oxide. *Am J Med Sci* 306, 348–358. <https://doi.org/10.1097/00000441-199311000-00015>
- Suri, C., Jones, P.F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P.C., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171–1180. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81813-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81813-9)
- Tadros, A., Hughes, D.P., Dunmore, B.J., Brindle, N.P.J., 2003. ABIN-2 protects endothelial cells from death and has a role in the antiapoptotic effect of angiopoietin-1. *Blood* 102, 4407–4409. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1602>
- Tallquist, M., Kazlauskas, A., 2004. PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.003>
- Telli, M.L., Hunt, S.A., Carlson, R.W., Guardino, A.E., 2007. Trastuzumab-related cardiotoxicity: calling into question the concept of reversibility. *J Clin Oncol* 25, 3525–3533. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.0106>
- Thurston, G., Kitajewski, J., 2008. VEGF and Delta-Notch: interacting signalling pathways in tumour angiogenesis. *British Journal of Cancer* 99, 1204–1209. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604484>
- Tian, X., Hu, T., He, L., Zhang, H., Huang, X., Poelmann, R.E., Liu, W., Yang, Z., Yan, Y., Pu, W.T., Zhou, B., 2013. Peritruncal coronary endothelial cells contribute to proximal coronary artery stems and their aortic orifices in the mouse heart. *PLoS One* 8, e80857. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080857>
- Tian, X., Hu, T., Zhang, H., He, Lingjuan, Huang, X., Liu, Q., Yu, W., He, Liang, Yang, Z., Yan, Y., Yang, X., Zhong, T.P., Pu, W.T., Zhou, B., 2014. Vessel formation. De novo formation of a distinct coronary vascular population in neonatal heart. *Science* 345, 90–94. <https://doi.org/10.1126/science.1251487>

- Tomanek, R.J., Haung, L., Suvarna, P.R., O'Brien, L.C., Ratajska, A., Sandra, A., 1996. Coronary vascularization during development in the rat and its relationship to basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Res* 31 Spec No, E116-126.
- Tomanek, R.J., Schatteman, G.C., 2000. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 261, 126–135. [https://doi.org/10.1002/1097-0185\(20000615\)261:3<126::AID-AR7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1097-0185(20000615)261:3<126::AID-AR7>3.0.CO;2-4)
- Tsuzuki, Y., Carreira, C.M., Bockhorn, M., Xu, L., Jain, R.K., Fukumura, D., 2001. Pancreas Microenvironment Promotes VEGF Expression and Tumor Growth: Novel Window Models for Pancreatic Tumor Angiogenesis and Microcirculation. *Laboratory Investigation* 81, 1439–1451. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780357>
- Virágh, S., Challice, C.E., 1981. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat. Rec.* 201, 157–168. <https://doi.org/10.1002/ar.1092010117>
- Visconti, R.P., Richardson, C.D., Sato, T.N., 2002. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8219–8224. <https://doi.org/10.1073/pnas.122109599>
- Wada, A., Willet Spencer G., Bader David, 2003. Coronary Vessel Development. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23, 2138–2145. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000098645.38676.CC>
- Waldo, K.L., Willner, W., Kirby, M.L., 1990. Origin of the proximal coronary artery stems and a review of ventricular vascularization in the chick embryo. *Am J Anat* 188, 109–120. <https://doi.org/10.1002/aja.1001880202>
- Wang, H.U., Chen, Z.F., Anderson, D.J., 1998. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741–753. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81436-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81436-1)
- Ward, N.L., Dumont, D.J., 2002. The angiopoietins and Tie2/Tek: adding to the complexity of cardiovascular development. *Semin Cell Dev Biol* 13, 19–27. <https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0288>
- Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y., Himes, N., Burstein, D., Doukas, J., Soll, R., Losordo, D., Cheresch, D., 2004. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* 113, 885–894. <https://doi.org/10.1172/JCI200420702>
- Wiese, C., Heisig, J., Gessler, M., 2010. Hey bHLH Factors in Cardiovascular Development. *Pediatr Cardiol* 31, 363–370. <https://doi.org/10.1007/s00246-009-9609-9>
- Wilkinson-Berka, J.L., Babic, S., de Gooyer, T., Stitt, A.W., Jaworski, K., Ong, L.G.T., Kelly, D.J., Gilbert, R.E., 2004. Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor Promotes Pericyte Loss and Angiogenesis in Ischemic Retinopathy. *Am J Pathol* 164, 1263–1273.
- Wu, C., Gui, C., Li, L., Pang, Y., Tang, Z., Wei, J., 2018. Expression and secretion of neuregulin-1 in cardiac microvascular endothelial cells treated with angiogenic factors. *Exp Ther Med* 15, 3577–3581. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5811>
- Xu, Y., Li, X., Liu, X., Zhou, M., 2010. Neuregulin-1/ErbB Signaling and Chronic Heart Failure, in: Vanhoutte, P.M. (Ed.), *Advances in Pharmacology, Cardiovascular Pharmacology*. Academic Press, pp. 31–51. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(10\)59002-1](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(10)59002-1)

- Xue, Y., Gao, X., Lindsell, C.E., Norton, C.R., Chang, B., Hicks, C., Gendron-Maguire, M., Rand, E.B., Weinmaster, G., Gridley, T., 1999. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Hum Mol Genet* 8, 723–730. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.723>
- Yanagisawa, H., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Emoto, N., Williams, S.C., Takeda, S., Clouthier, D.E., Yanagisawa, M., 2000. Disruption of *ECE-1* and *ECE-2* reveals a role for endothelin-converting enzyme-2 in murine cardiac development. *J Clin Invest* 105, 1373–1382. <https://doi.org/10.1172/JCI7447>
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., Masaki, T., 1988. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411–415. <https://doi.org/10.1038/332411a0>
- Ying, H.-Z., Chen, Q., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-H., Ma, Y., Zhang, S.-Z., Fang, J., Yu, C.-H., 2017. PDGF signaling pathway in hepatic fibrosis pathogenesis and therapeutics (Review). *Molecular Medicine Reports* 16, 7879–7889. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7641>
- Yue, Z., Chen, J., Lian, H., Pei, J., Li, Y., Chen, X., Song, S., Xia, J., Zhou, B., Feng, J., Zhang, X., Hu, S., Nie, Y., 2019. PDGFR- β Signaling Regulates Cardiomyocyte Proliferation and Myocardial Regeneration. *Cell Reports* 28, 966-978.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.065>
- Zeng, C., Younger-Shepherd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N., 1998. Delta and Serrate are redundant Notch ligands required for asymmetric cell divisions within the *Drosophila* sensory organ lineage. *Genes Dev.* 12, 1086–1091.
- Zeng, Z., Gui, C., Nong, Q., Du, F., Zhu, L., 2013. Serum neuregulin-1 β levels are positively correlated with VEGF and angiopoietin-1 levels in patients with diabetes and unstable angina pectoris. *Int J Cardiol* 168, 3077–3079. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.04.088>
- Zhang, H., Wenjuan, P., Guang, L., Xiuzhen, H., Lingjuan, H., Tian Xueying, Liu Qiaozhen, Zhang Libo, Wu Sean M., Sucov Henry M., Zhou Bin, 2016. Endocardium Minimally Contributes to Coronary Endothelium in the Embryonic Ventricular Free Walls. *Circulation Research* 118, 1880–1893. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308749>
- Ziello, J.E., Jovin, I.S., Huang, Y., 2007. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med* 80, 51–60.