

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKÁŘSKÝCH VĚD



RIGORÓZNÍ PRÁCE

**Expresse proteinů TGF- β signalizace v aortě transgenních
myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu**

**Expression of TGF- β signaling proteins in aorta of transgenic
mice expressing high levels of soluble endoglin**

Konzultantka rigorózní práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Kristýna Tysoňová

„Na tomto místě bych moc ráda poděkovala PharmDr. Janě Rathouské, Ph.D. za odborné vedení této práce, poskytnuté rady a čas, který mi věnovala. Dále bych velice ráda poděkovala svým nejbližším a hlavně rodičům za toleranci a zázemí, které mi poskytli během mého studia a zpracování práce.“

„Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem vypracované samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne:

Podpis:

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Expres proteinů TGF- β signalizace v aortě transgenních myší s vysokými hladinami solubilního endoglinu

Rigorózní práce

Mgr. Kristýna Tysoňová

Konzultantka rigorózní práce: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Cíl práce: Záměrem této rigorózní práce bylo detekovat a zhodnotit expresi vybraných proteinů TGF- β signalizace v aortě dvou skupin transgenních myší lišících se hladinami lidského solubilního endoglinu, které byly krmeny speciální cholesterolovou dietou.

Metody: Pro studii byly použity 6 měsíců staré transgenní myší samice kmene CBAXC57BL/6J s vloženým genem pro lidský solubilní endoglin (sENG). Na základě ELISA analýzy hladin sENG v plazmě byly myši rozděleny do dvou porovnávaných skupin. Sledovaná transgenní skupina Sol-Eng⁺ (vykazující vysoké hladiny sENG) a transgenní skupina kontrolní (hladiny sENG pod hranicí detekce). Po dobu 3 měsíců byla oběma skupinám podávána dieta s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Dále byla provedena biochemická analýza pro zjištění hladin celkového cholesterolu a Western blot analýza pro detekci a kvantifikaci exprese molekul proteinů eNOS/peNOS, endoglinu (TGF- β receptoru III) a TGF- β receptoru II v aortách obou skupin myší.

Výsledky: Biochemická analýza celkového cholesterolu v krvi neprokázala významné rozdíly v naměřených hodnotách mezi skupinou Sol-Eng⁺ a skupinou kontrolní. Western blot analýza prokázala signifikantně zvýšenou expresi u molekuly endoglinu o 60 % a receptoru TGF- β RII o 54 % u skupiny Sol-Eng⁺ ve srovnání se skupinou kontrolní. Neprokázala však statisticky významný rozdíl u molekul eNOS a peNOS mezi oběma skupinami.

Závěr: Získané výsledky této studie poukazují na možný podíl zvýšených hladin sENG v kombinaci s cholesterolovou dietou na změny v expresi molekul ovlivňující TGF- β signalizaci v aortách transgenních myší. Lze usuzovat, že zvýšené hladiny sENG nemají vliv na expresi molekul pro vazodilataci a cévní homeostázu. Výše uvedená data týkající se cévní morfologie však bude potřeba rozšířit o výsledky testování funkčních parametrů těchto cév.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Expression of TGF- β signaling proteins in aorta of transgenic mice expressing high levels of soluble endoglin

Rigorous thesis

Mgr. Kristýna Tysoňová

Consultant of rigorous thesis: PharmDr. Jana Rathouská, Ph.D.

Background: The aim of this rigorous thesis was to detect and evaluate the selected proteins expression of TGF- β signaling in the aorta of the two groups of transgenic mice differing in the levels of human soluble endoglin, which were fed a special cholesterol diet.

Methods: For the study have been used 6 months old female mice transgenic strain CBAxC57BL/6J with inserted the gene for human soluble endoglin (sENG). On the basis of ELISA analysis of levels of sENG in the plasma mice were divided into two groups. The screened transgenic group Sol-Eng⁺ (showing high levels of sENG) and the control transgenic group (levels of sENG below detection). For a period of 3 months a high fat and cholesterol diet has been served to both groups. Further biochemical analysis was carried out to determine the levels of total cholesterol and Western blot analysis for the detection and quantification of expression of eNOS/peNOS protein molecules, endoglin (TGF- β receptor III) and TGF- β receptor II in the aortas of the two groups of mice.

Results: The biochemical analysis of total cholesterol in the blood did not show significant differences in the measured values between the group of Sol-Eng⁺ and the control group. Western blot analysis demonstrated a significantly increased the expression of the molecule endoglin by 60% and the receptor of the TGF- β RII 54% for group Sol-Eng⁺ in comparison with the control group. However, it did not demonstrate

a statistically significant difference for eNOS and peNOS molecules between the two groups.

Conclusions: The results of this study point to a possible share of the increased levels of sENG, in combination with the cholesterol diet on changes in molecules that affect the expression of TGF- β signaling in aortas of the transgenic mice. It can be said – increased levels of sENG have no effect on the expression of molecules for vasodilation and vascular homeostasis. The above data for vascular morphology, however, will need to expand on the results of the testing of the functional parameters of the blood vessels.

OBSAH

1. ÚVOD.....	10
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Stavba cévní stěny.....	11
2.1.1 Vnitřní vrstva - <i>tunica intima</i>	11
2.1.2 Střední vrstva - <i>tunica media</i>	11
2.1.3 Vnější vrstva - <i>tunica adventitia</i>	12
2.2 Transformující růstový faktor - TGF- β	13
2.2.1 Charakteristika a význam.....	13
2.2.2 TGF- β signální transdukce a Smad proteiny.....	14
2.2.3 TGF- β a kardiovaskulární systém.....	17
2.3 Endoglin.....	19
2.3.1 Struktura a izoformy endoglinu.....	20
2.3.2 Exprese endoglinu a jeho funkce.....	22
2.3.3 Endoglin a NO syntáza.....	23
2.3.4 Endoglin a eNOS.....	24
2.4 Solubilní endoglin.....	25
2.5 Transgenní myší model.....	26
3. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE.....	27
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	28
4.1 Použitá zvířata.....	28
4.2 Pracovní postup pro analýzu Western blot.....	29
4.2.1 Homogenizace a izolace proteinů.....	29
4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů.....	29
4.2.3 Western blot analýza.....	30

4.2.3.1	Gelová elektroforéza	31
4.2.3.2	Blotování polosuchou cestou	33
4.2.3.3	Imunodetekce	35
4.2.3.4	Chemiluminiscenční detekce	36
4.2.4	Statistická analýza	37
5.	VÝSLEDKY	38
5.1	ELISA analýza	38
5.2	Biochemická analýza	39
5.3	Western blot analýza	40
6.	DISKUZE	45
7.	ZÁVĚR	49
8.	SEZNAM ZKRATEK	50
9.	SEZNAM TABULEK	52
10.	SEZNAM GRAFŮ	52
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	52
12.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

1. ÚVOD

V mnoha vyspělých zemích světa, i přes veškerou prevenci a opatření, roste v současné době počet úmrtí a komplikací související s kardiovaskulárním systémem. Ten je tvořený srdcem a cévami zásobujícími tkáň živinami, kyslíkem a zajišťujícími odvod odpadních látek (Trojan et al., 2003). Příčina a progresse vaskulárních onemocnění má spojitost se stavem cévní stěny, její normální funkcí, funkcí endotelu a krevní homeostázou. Narušením tohoto systému dochází k aktivaci endotelu a jeho dysfunkci, zvýšené proliferaci buněk hladkého svalstva, prozánětlivému stavu, nedokrvení srdce. Tento stav potom může lehce vyústit v závažný akutní ischemický syndrom (Llorca et al., 2007).

Dle mnoha studií a výzkumů se zjistilo, že kardiovaskulární onemocnění a jiná další onemocnění souvisejí s transmembránovým glykoproteinem, tzv. endoglinem. Tento glykoprotein se účastní, jako přídatný receptor, signalizační kaskády transformujícího růstového faktoru TGF- β a ovlivňuje tak homeostázu kardiovaskulárního systému, dále se podílí na regulaci činnosti buněk a funkce cév. Mnohými autory je endoglin považován za potencionální marker s ateroprotektivním charakterem, jeho role v tomto ohledu však dosud není plně vyjasněna (Conley et al., 2000; Nachtigal et al., 2012). Zkoumá se i tzv. solubilní forma endoglinu (sENG), která se vyskytuje v krevním oběhu, kam je odštěpována. Může vyvolávat poškození endotelu prostřednictvím narušení signalizace TGF- β a hrát důležitou roli v patogenezi aterosklerózy (Blann et al., 1996; Strasky et al., 2011). Solubilní endoglin se účastní řady dalších patologických procesů a jeho změněné hladiny byly prokázány u kardiovaskulárních onemocnění, jako je například hemoragická teleangiektázie (Barbara et al., 1999), hypertenze (Blazquez-Medela et al., 2010) nebo se prokázal vliv na fibrózu srdce po infarktu myokardu (Kapur et al., 2012).

Řada vědců se snaží zjistit konkrétní význam proteinu endoglinu (případně jeho solubilní formy), jeho vliv na progresi kardiovaskulárních onemocnění, popřípadě monitorování hladin u pacientů a následnou terapii. Tématu endoglinu, jakožto receptoru III TGF- β signalizace, a jedné z jeho signalizačních kaskád byla rovněž věnována tato práce.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Stavba cévní stěny

Stěna zdravých cév se obvykle skládá ze tří základních soustředných vrstev (viz níže Obr. 1), které jsou známé jako *tunica intima - interna* (vnitřní vrstva), *tunica media* (střední vrstva) a *tunica adventitia - externa* (vnější vrstva). Cévy jsou součástí lymfatického a kardiovaskulárního systému, stavba a poměr jednotlivých vrstev cévní stěny potom odpovídá funkčním nárokům orgánů a tkání celého organismu (Konrádová et al., 2000; Trojan et al., 2003). Oproti žilním stěnám má artérie mnohem silnější střední vrstvu cévní stěny, je velmi pevná a pružná, odolávající pulsním nárazům krve a tlakovým změnám (Lullmann-Rauch, 2012).

2.1.1 Vnitřní vrstva - *tunica intima*

Tunica intima je výstelkou cévy, která je tvořena jednou vrstvou polygonálních buněk z plochého epitelu, tzv. endotelem. Endotelové buňky zajišťují hladký povrch cévy a tvoří nesmáčivé a netrombogenní rozhraní mezi cirkulující krví a tkáněmi (Karetová, 2002; Merkunová and Orel, 2008). Nasedají na vrstvu subendotelovou, která je tvořena řídkým kolagenním vazivem, popřípadě i buňkami hladkého svalstva (Konrádová et al., 2000).

2.1.2 Střední vrstva - *tunica media*

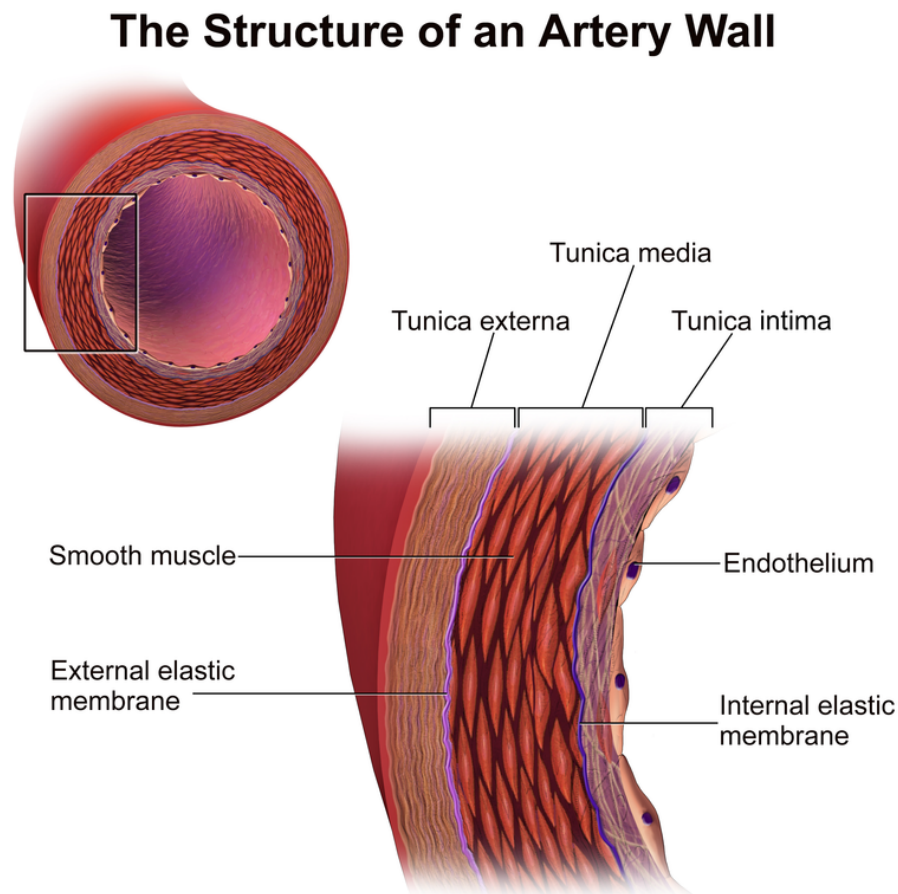
Tunica media je střední a nejsilnější vrstva stěny artérie, v závislosti na tlaku umožňuje změnu průsvitu cév. Složena je z buněk hladké svaloviny produkující mezibuněčnou hmotu bohatou na chondroitin sulfát a proteoglykany. Skládá se i z vláken elastických a retikulárních. Na hranicích této střední vrstvy mohou elastická vlákna kondenzovat a vytvářet vnitřní (*membrana elastica interna*) a vnější (*membrana elastica externa*) elastickou membránu, která odděluje jednotlivé vrstvy cévy, tedy *tunica media* od *tunica intima* a *tunica media* od *tunica adventitia* (Konrádová et al., 2000; Lullmann-Rauch, 2012).

2.1.3 Vnější vrstva - *tunica adventitia*

Tunica adventitia je vnější vazivovou vrstvou tvořenou převážně sítí kolagenních a elastických vláken. U větších cév mohou být přítomny i malé krevní cévy, tzv. *vasa vasorum*, které tuto vrstvu vyživují nebo rozvětvené pleteně sympatických nervových vláken inervující buňky hladké svaloviny (Trojan et al., 2003).

Obrázek 1: Stavba stěny artérie

Základní vrstvy cévní stěny: *Tunica intima* – vnitřní vrstva; *Tunica media* – střední vrstva; *Tunica externa* – vnější vrstva. *Smooth muscle* – hladké svalstvo cév; *External elastic membrane* – vnější elastická membrána; *Internal elastic membrane* – vnitřní elastická membrána; *Endothelium* – endotel.



Převzato:

<https://en.wikipedia.org/wiki/Artery#/media/File:Blausen_0055_ArteryWallStructure.png> [2016-07-08]

2.2 Transformující růstový faktor - TGF- β

2.2.1 Charakteristika a význam

Transformující růstový faktor β (TGF- β) je složen z mnoha strukturně příbuzných cytokinů, které se podílejí na široké škále procesů a vykazují regulační všestrannost (Grainger, 2004). Podporují růst tkání, diferenciaci a migraci buněk různého původu, morfogenezi během embryonálního vývoje a v dospělosti se podílejí na imunitních funkcích organismu a udržování homeostázy (Shull et al., 1992). Jsou účinnými regulátory cévního systému, ovlivňují základní buněčné funkce a mohou hrát roli v řadě vaskulárních poruch či vývojových vadách (Lebrin et al., 2005; Massagué and Gomis, 2006).

U savců byly v současné době identifikovány tři TGF- β izoformy, nazývané TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3, které mezi sebou sdílejí vysoký stupeň strukturní i funkční podobnosti (Wang et al., 1997). Nejlépe prozkoumaným členem TGF- β a převládající izoformou je však TGF- β 1. Zatímco jiné izoformy jsou vyjádřeny v omezenějším spektru buněk a tkání, TGF- β 1 se nachází téměř ve všech tkáních (Annes et al., 2003). TGF- β jako neaktivní komplex dimerních latentních prekurzorů je vylučován zejména buňkami endotelu, hladkými svalovými buňkami, makrofágy a různými typy lymfocytů (Bobik, 2006). Pro aktivitu cytokinu a následné uvolnění ligandů je potřeba vazby na specifické transmembránové receptory typu I (TGF- β RI/T β RI) a typu II (TGF- β RII/T β RII) serin/treonin kinázy v extracelulárním prostředí. Tento proces může být iniciován prostřednictvím změny tepla, pH, aktivitou reakční formy kyslíku či proteolytickými enzymy (Wang et al., 1997; Jenkins, 2008). Jakmile dojde k navázání ligandu a k aktivaci receptoru TGF- β RI, signály mohou být transdukovány z membrány do jádra přes intracelulární efekторы, tzv. Smad proteiny (Ten Dijke and Hill, 2004).

Přestože všechny tři izoformy TGF- β mají podobné *in vitro* vlastnosti, jejich *in vivo* účinky mohou být ve velké míře odlišné (Annes et al., 2003). Veškeré účinky cytokinu TGF- β jsou totiž závislé na typu buňky, buněčném prostředí a stavu diferenciaci. Mohou tak mít stimulační nebo inhibiční účinky na stejné buňky (Gorelik and Favell, 2000; Lebrin et al., 2005). Tato duální role byla nejvíce prostudována u zmíněného TGF- β 1 cytokinu, a to z hlediska proliferace a migrace buněk hladkého svalstva cév, remodelace extracelulární matrix, angiogeneze či v průběhu reparace cév

(Goumans et al., 2002). TGF- β 1 je hlavním členem TGF- β rodiny konstitutivně přítomným v séru a ve vysokých hladinách ho nalezneme ve zdravé cévní stěně (Graigner, 2004). Je účinným regulátorem imunitního systému, může aktivovat i deaktivovat buňky makrofágů, ovlivňovat adhezi monocytů. Při narušení cévní homeostázy či signalizace TGF- β tak může dojít ke vzniku či rozvoji kardiovaskulárních chorob a autoimunitních onemocnění (Gorelik and Favell, 2000; Bobik, 2006).

2.2.2 TGF- β signální transdukce a Smad proteiny

TGF- β signalizace a její regulační účinek probíhá prostřednictvím heteromerního komplexu specifických receptorů transmembránové serin/treonin kinázy a jejich následných efektorů – shrnuto níže na Obr. 2 (Piek et al., 1999). Celý komplex je obvykle složený z jednoho receptoru TGF- β RII, dvou rozdílných typů TGF- β RI a uvolněného ligandu. Receptory I a II jsou strukturně podobné. Oba to jsou glykoproteiny bohaté na glykosylovanou extracelulární část, transmembránovou krátkou doménu a intracelulární serin/treonin kinázovou doménu. TGF- β RI obsahuje i glycin/serin (GS) doménu regulující aktivaci receptoru a přenos signálu (Dore et al., 1998; Lebrin et al., 2005).

TGF- β ligandy mají vysokou afinitu k receptorům typu TGF- β RII na buněčném povrchu. TGF- β cytokin vázaný na tento receptor je potom schopen aktivovat dva odlišné typy receptoru I (tzv. activin-like kinázy) a jejich kombinací regulovat účinky přenášejícího signálu. Konkrétně tedy receptor ALK-5 (activin-like kináza-5), který je široce rozšířený a exprimovaný v mnoha typech buněk a ALK-1 (activin-like kináza-1), který je exprimován pouze endotelovými buňkami a vyvíjí opačné účinky na chování těchto buněk oproti ALK-5. Teprve po vazbě ligandu na receptor II je přijat i TGF- β RI a společně tak vytvářejí aktivní komplex TGF- β cytokinu (Wrana et al., 1994; Goumans et al., 2002). Následně proběhne fosforylace domény GS TGF- β RI receptorem typu II, změní se konformace molekuly TGF- β RI, což vede k aktivaci kinázy TGF- β RI a šíření signálu do jádra prostřednictvím fosforylujících Smad proteinů (Wieser et al., 1995).

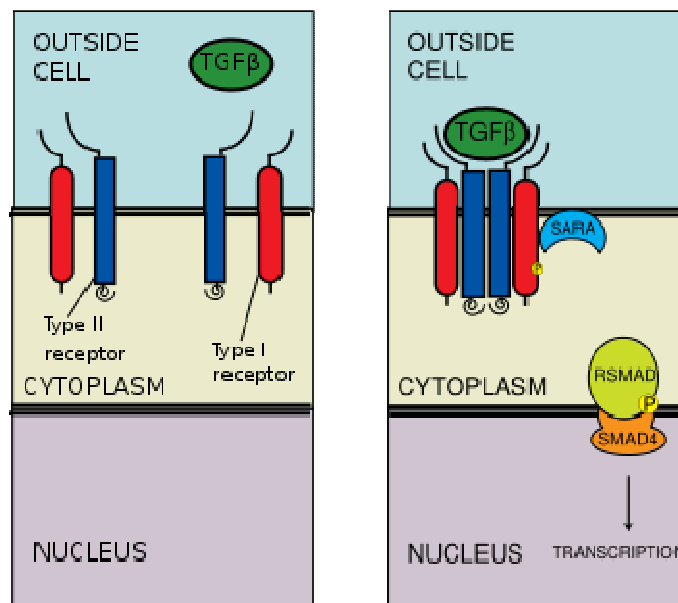
Smad proteiny jsou jaderné efekторы pro TGF- β receptory, které se podílejí na genové expresi (Lebrin et al., 2005). Neustále se pohybují mezi jádrem a cytoplazmou. Aktivují se fosforylací a v případě nepřítomnosti jsou transkripčně inertní (Miyazawa et al., 2002; Massagué and Gomis, 2006). Existují tři druhy Smad proteinů – receptory regulační (R-), společné (Co-) a inhibiční (I-).

Regulačních Smad proteinů, které slouží jako substrát pro TGF- β receptory, je v lidském i myším genomu kódováno pět (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 a Smad8) z celkových osmi Smad proteinů. Fosforylovány jsou receptorem TGF- β R1 a po navázání ligandu a následné interakci s Co-Smad (Smad4) proteinem vytvoří komplex, který je translokován do jádra. Zatímco aktivace ALK-1 podporuje fosforylaci Smad1, Smad5 a Smad8, ALK-5 indukuje fosforylaci Smad2 a Smad3. Podílí se tak na transkripci cílových genů (Massague, 1998; Miyazawa et al., 2002). Inhibiční Smad proteiny (Smad6 a Smad7) naopak různými mechanismy zabraňují aktivaci R-Smad proteinů a translokaci do jádra blokují. Celkově tak konkurují aktivovaným Smad proteinům, které jsou rozpoznány proteinovou fosfatázou nebo ubiquitin ligázou ukončující TGF- β signalizaci (Lebrin et al., 2005; Bobik, 2006).

Tyto Smad jaderné efekторы však nemusí být jediným regulátorem funkce a aktivity receptorů, účinky TGF- β R1 i TGF- β R2 se mohou uplatňovat i mimo jejich působení. Jak už bylo zmíněno, nacházejí se v membránách různých typů buněk a transdukce signálu TGF- β cytokinu pak může probíhat dle jejich ovlivnění. Jestli ve smyslu pozitivním či negativním, to už záleží i na okolnostech a prostředí, ve kterém se celý proces uskutečňuje a jak je ve finále interpretován (Bobik et al., 1999; Grainger, 2007).

Obrázek 2: TGF- β signální dráha

TGF- β signalizace se podílí na mnoha buněčných procesech a následné regulaci. Existuje celá řada mechanismů, kde je dráha modulována pozitivně či negativně. Navzdory široké škále uplatnění je proces regulace relativně jednoduchý. TGF- β ligandy se váží k receptoru typu II, dojde k fosforylaci receptoru I a ten následně fosforyluje i regulační proteiny R-Smad, které mohou vázat Co-Smad (Smad4) a po interakci s nimi vytvoří komplex. R-Smad a Co-Smad komplexy se hromadí v jádře, kde působí jako transkripční faktory a podílejí se na regulaci exprese cílového genu.



Převzato:

<https://en.wikipedia.org/wiki/TGF_beta_signaling_pathway#/media/File:TGFbeta_Pathway_1.svg> [2016-07-10]

<https://en.wikipedia.org/wiki/TGF_beta_signaling_pathway#/media/File:Pathwaystep_5.svg> [2016-07-10]

2.2.3 TGF- β a kardiovaskulární systém

TGF- β může být klíčový mediátor při regulaci mnoha procesů v souvislosti s kardiovaskulárním onemocněním. Může hrát důležitou roli při léčení infarktu myokardu a tvorbě granulační tkáně (Lefer et al., 1990; Birdsall et al., 1997), srdeční remodelaci (Cohn et al., 2000), při rozvoji tkáně fibrózy (Lijnen et al., 2000) a celkově se podílí na vývoji cévního systému modulací funkce endotelových buněk a pericytů (Pepper, 1997).

TGF- β se výrazně zvyšuje v experimentálních modelech infarktu myokardu (Deten et al., 2001). Infarkt myokardu spouští zánětlivou reakci, která v konečném důsledku vede k hojení a tvorbě jizvy. Dochází k indukci syntézy chemokinů, cytokinů a vede ke zvýšené expresi adhezních molekul a leukocytů v endotelu, což má za následek infiltraci monocytů, lymfocytů a polymorfonukleárních buněk do postižené oblasti (Fava et al., 1991). Účinky TGF- β mohou být stimulační nebo inhibiční, záleží na prostředí, stavu diferenciaci a původu buněk. U zralých makrofágů má TGF- β převážně účinek deaktivující, potlačuje prozánětlivou syntézu cytokinů, chemokinů a snižuje produkci kyslíkových radikálů. Bylo zjištěno, že inhibice TGF- β signalizace prostřednictvím genové transfekce má za následek zvýšenou infiltraci neutrofilů, prozánětlivých cytokinů a zvýšenou mortalitu po koronární okluzi. Toto zjištění tedy naznačuje významnou roli pro TGF- β signalizaci s rozlišením zánětu a potlačení genové syntézy cytokinů a chemokinů (Ikeuchi et al., 2004). Kromě toho myši s narušenou signalizací TGF- β vykazovaly zvýšenou a prodlouženou zánětlivou reakci po infarktu myokardu v souvislosti s poruchou fosforylace Smad2, což vedlo k rozšiřování zánětlivého infiltrátu a nepříznivé remodelaci (Frangogiannis et al., 2005). TGF- β účinek má rozhodující úlohu v potlačení takové zánětlivé odpovědi a v regulaci tkáňové homeostázy. Účinky na endotelových buňkách jsou však složité a závislé na kontextu, význam v regulaci angiogeneze infarktu tedy ještě není plně prozkoumán.

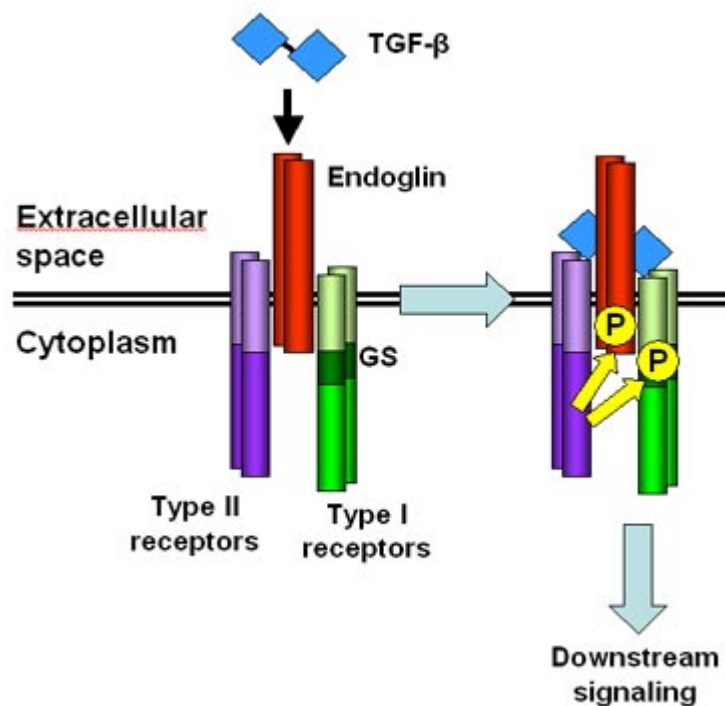
Buněčné i molekulární účinky zprostředkované TGF- β na fibrotizaci a srdeční hypertrofii mohou mít důležitý vliv i na patogenezi remodelace levé komory a celkově tak ovlivňovat prognózu takového onemocnění (Celada and Maki, 1992; Werner et al., 2000). Remodelace je dynamický a komplexní proces v důsledku aktivace buněčných a molekulárních drah zahrnujících kardiomyocyty, fibroblasty a extracelulární matrix. Může být fyziologická nebo patologická, popisuje změny ve velikosti, tvaru a funkci

levé komory v reakci na změny zatížení v hemodynamických podmínkách. TGF- β může být klíčovým regulátorem srdeční remodelace prostřednictvím svých přímých a účinných opatření v metabolismu extracelulární matrix a hypertrofie (Cohn et al., 2000; Opie et al., 2006).

TGF- β receptory a mnoho z jejich následných signálních proteinů naznačují základní roli pro TGF- β signalizaci v cévním vývoji a vliv na angiogenní potenciál endotelových buněk. V závislosti na použitém testu byl účinek TGF- β *in vivo* popsán jako angiogenní nebo angiostatický. Kromě toho *in vitro* účinky TGF- β na endotelovou buněčnou proliferaci, migraci a expresi proteáz jsou závislé na zdroji endotelu a dávce TGF- β signálu použitých k jejich stimulaci. Nedávné výzkumy ukázaly, že TGF- β reguluje stav aktivace endotelu přes jemné rovnováhy mezi odlišnými kombinacemi signalizačních drah zahrnující dva receptory TGF- β RI – ALK-1 a ALK-5. ALK-1 aktivace stimuluje endotelovou proliferaci a migraci buněk přes Smad1/Smad5 transkripční faktory, zatímco ALK-5 inhibuje proliferaci a migraci buněk přes interakci Smad2/Smad3 (Pepper, 1997; Goumans et al., 2003). TGF- β , konkrétně jeho přídatný transmembránový receptor typu III (tzv. endoglin, Obr. 3), pak hraje klíčovou roli v modulaci rovnováhy mezi ALK-1 a ALK-5 signalizací a v regulaci proliferace endotelových buněk (Lebrin et al., 2004).

Obrázek 3: Účast endoglinu na TGF- β signální transdukci

TGF- β cytokin vázaný na receptor TGF- β RII, je schopný aktivovat receptor I, což má za následek fosforylaci glycin/serin domény (GS). TGF- β RII a aktivovaný TGF- β RI fosforylují serin/treonin kinázy cytosolové domény endoglinu. Fosforylovaný TGF- β RI indukuje aktivaci navazujících drah a endoglin tuto aktivaci a přenos signálu moduluje.



Převzato: <<https://www.roswellpark.edu/sites/default/files/seonfig1.jpg>> [2016-07-09]

2.3 Endoglin

Endoglin (ENG, CD 105 nebo TGF- β RIII) je homodimerní membránový glykoprotein lokalizovaný na povrchu buněk (Gougos and Letarte, 1990). Je součástí TGF- β signalizace jako tzv. přídatný receptor TGF- β RIII a v signálních drahách cytokinu hraje důležitou regulační roli (Albert et al., 2001). Řada studií poukazuje na významnost tohoto markeru, jeho role byla prokázána v mnoha patologických procesech, včetně metabolických dysfunkcí a kardiovaskulárních onemocnění (Barbara et al., 1999; Llorca et al., 2007).

2.3.1 Struktura a izoformy endoglinu

Lidský endoglin je dimer, který je tvořený z 95 kDa disulfidických podjednotek (Cheifetz et al., 1992). Skládá se z velké extracelulární domény, hydrofobní transmembránové domény a jedné krátké intracelulární cytosolové domény – viz Obr.4 (Gougos and Letarte, 1990). Primární struktura endoglinu naznačuje, že patří do tzv. zona pellucida (ZP), rodiny extracelulárních proteinů, které v blízkosti transmembránové oblasti sdílejí ZP domény z 260 aminokyselin s 8 cysteinovými zbytky (Llorca et al., 2007). Sám endoglin vnitřní kinázovou aktivitu nemá, ale v reakci na TGF- β může být jeho intracelulární cytosolová doména konstitutivně fosforylována a být tak cílem serinových a treoninových kináz, včetně receptorů TGF- β RI a TGF- β RII (Lastres et al., 1994; Koleva et al., 2006).

V lidských a myších tkáních byla popsána exprese dvou izoform endoglinu, L-izoforma (long) a S-izoforma (short). Liší se mezi sebou v počtu aminokyselin a délce jejich cytosolové domény. Není-li uvedeno jinak, funkční studie v této práci odkazují na převládající L-izoformu, která je tvořena sekvencí 633 aminokyselin, z nichž 47 tvoří cytosolový konec. S-izoforma se skládá z 60 aminokyselin a cytosolovou doménu tvoří pouze 14 aminokyselin (Bellon et al., 1993; Gougos and Letarte, 1990). Sekvence aminokyselin však není jediným rozdílem mezi izoformou S a L. Jde například i o interakci s receptory TGF- β RII a ALK-1 a ALK-5, kdy se liší afinitou k danému receptoru (Blanco et al., 2005), účinky na angiogenezi nebo rozdíl v aktivaci dráhy ALK-5/Smad2 ovlivňující expresi endotelové NO syntázy (eNOS). Zatímco L-endoglin tyto procesy a funkce zpravidla podporuje, S-endoglin má efekt opačný. O S-endoglinu a jeho funkci na endotel se ví všeobecně méně. Vědci Blanco et al. však zjistili, že zvýšená exprese i tohoto typu endoglinu může hrát roli u kardiovaskulárních chorob spojených se stárnutím (Blanco et al., 2008).

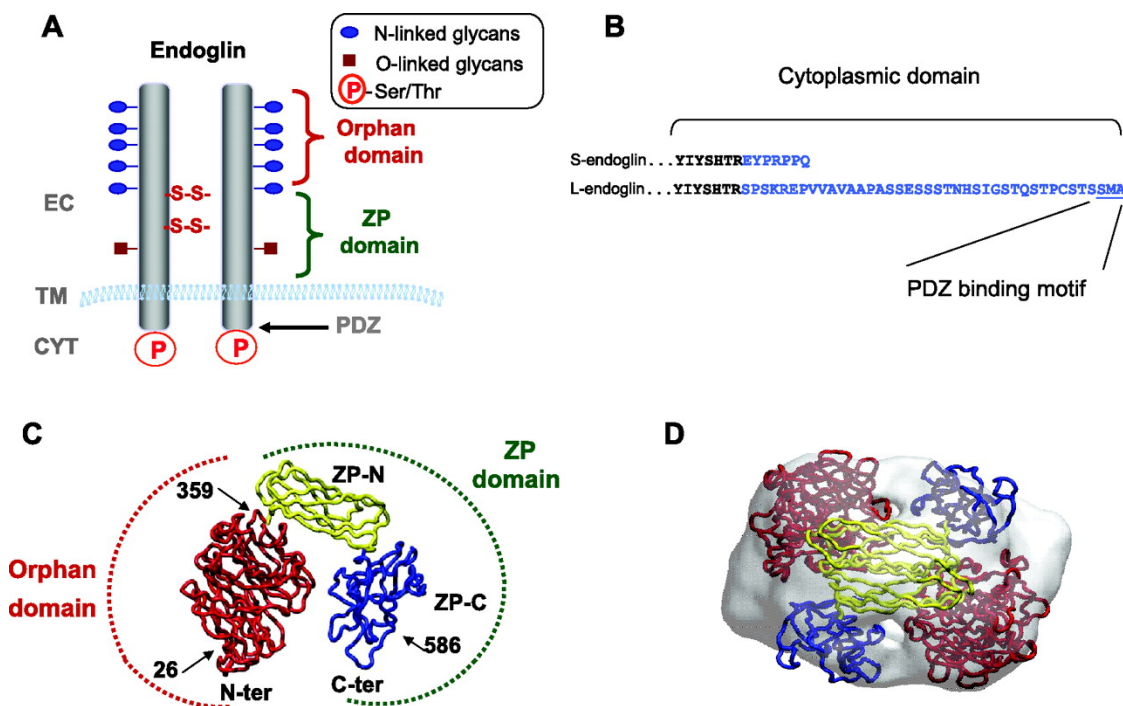
Obrázek 4: Struktura endoglinu

A: Endoglin je membránový protein s velkou extracelulární doménou (EC), transmembránovou doménou (TM) a cytosolovou doménou (CYT). EC obsahuje ZP doménu (ZP domain) typickou pro proteiny rodiny zona pellucida a orfan doménu (Orphan domain). Identifikovány byly i N-vazebná (N-linked glycans) a O-vazebná (O-linked glycans) glykosilační místa extracelulární domény. U intracelulární domény byla nalezena PDZ oblast, kde dochází k interakci endoglinu s proteiny a místa P, které podléhají fosforylaci. Endoglin tvoří dimery a odpovídající monomery jsou spojeny disulfidovou vazbou (S-S).

B: Cytoplazmatická doména (Cytoplasmic domain) a sekvence aminokyselin izoformy L- a S- endoglinu, včetně PDZ vazebné oblasti

C: Trojrozměrný model endoglinu. Orfan doména (Orphan domain) - označena červenou barvou, zahrnuje aminokyselinové zbytky Glu26-Ile359 a ZP doména (ZP domain) obsahuje aminokyselinové fragmenty Gln360-Gly586. ZP-N a ZP-C subdomény označené žlutě a modře.

D: Trojrozměrný model endoglinu. Mapa elektronové hustoty solubilního endoglinu naznačené šedou barvou - model dimerní struktury endoglinu.



Převzato: (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010)

2.3.2 Exprese endoglinu a jeho funkce

Hlavním zdrojem molekul endoglinu jsou především buňky cévní stěny, zejména aktivované endotelové buňky (Li et al., 2000), buňky hladké svaloviny (Adam et al., 1998), stromální buňky (Diez-Marquez et al., 2002) a další buňky kardiovaskulárního systému, jako srdeční fibroblasty (Chen et al., 2004). Exprese endoglinu byla zpozorována i u buněk trofoblastu (Conley et al., 2000), monocytů a makrofágů (Lastres et al., 1992) nebo v prekurzorech erytroblastů a leukemických buněk (Cheifetz et al., 1992).

Buněčná a tkáňová distribuce je obecně ovlivněna cévní homeostázou, vývojem cév a celého kardiovaskulárního systému (Lopez-Novoa et al., 2010). Za normálních okolností je exprese ve zdravých buňkách endotelu cév a hladkých svalových buňkách artérií velice nízká. Hladina endoglinu je zvýšena až během různých patologických stavů, jako je například hypoxie (Sanchez-Elsner et al., 2002), poranění cév (Botella et al., 2002), aktivní angiogeneze (Burrows et al., 1995) či při srdeční ischemii (Docherty et al., 2006), kde se podílí na regulaci a udržování cévní integrity v případě poranění a nestability (Conley et al., 2000). Jak už bylo dříve zmíněno, endoglinová exprese je stimulována i TGF- β signalizací přes transkripční signální přenašeče Smad proteiny. Endoglin je součástí heteromerního komplexu TGF- β cytokinu a značně tak ovlivňuje jeho aktivitu při buněčné diferenciaci a proliferaci (Lastres et al., 1996), má podíl na buněčné migraci a je významný pro vývoj cév a kardiovaskulární systém (Duff et al., 2003). Vystupuje jako koreceptor TGF- β a pravděpodobně funguje jako modulátor rovnováhy mezi TGF- β /ALK-1 a TGF- β /ALK-5 signální dráhy. Aktivační dráhou endoglin/ALK-1/Smad1/Smad5 podporuje proliferaci a migraci endotelových buněk, které jsou zodpovědné za angiogenezi (Ten Dijke et al., 2008). Naproti tomu endoglin/ALK-5/Smad2/Smad3 signalizační kaskáda, vede spíše k inhibici a udržuje endotel v klidovém stavu (Lebrin et al., 2005; Bernabeu et al., 2007). Přesná úloha endoglinu v drahách cytokinu TGF- β však v současné době ještě není plně prozkoumána.

2.3.3 Endoglin a NO syntáza

NO syntáza (NOS) je enzym prostřednictvím kterého dochází k produkci oxidu dusnatého (NO), jehož prekurzorem je aminokyselina L-arginin (Furchgott and Zawadzki, 1980). NO je důležitou ochrannou molekulou v cévách zajišťující mnoho fyziologických funkcí. Má významný vazodilatační účinek a protizánětlivé působení, udržuje klidový stav cévy a inhibuje expresi adhezních molekul (Rapoport et al., 1983; Forstermann et al., 1986). V případě narušení aktivity NO, může docházet k projevům endotelové dysfunkce i ke kardiovaskulárnímu onemocnění (Karásek et al., 2004; Vanhoute et al., 2009).

U savců mohou být generovány tři různé izoformy enzymu NOS. Označovány jsou jako eNOS (endotelová NO syntáza), iNOS (inducibilní) a nNOS (neuronální). Neuronální NOS je konstitučně exprimována převážně v centrálních a periferních neuronech (Forstermann and Sessa, 2012), zajišťuje buněčnou komunikaci (Khan et al., 1996), centrální regulaci krevního tlaku, relaxaci hladkého svalstva a vazodilataci prostřednictvím periferních nervů (Southan and Szabo, 1996; Forstermann and Sessa, 2012). Inducibilní NO syntáza může být exprimována v mnoho buněčných typech. Exprese je zpravidla indukována v reakci na lipopolysacharidy, cytokiny, makrofágy a jiné látky. NO produkované iNOS ve velkém množství vyvolává v řadě případů různé příznaky zánětu, cytostaticky působí na parazitní cílové buňky nebo je charakterizováno sníženou perfuzí tkání a selháváním orgánů (Wong and Billiar, 1994; Forstermann and Sessa, 2012). iNOS tak přispívá k patofyziologii zánětlivých onemocnění (Nathan and Hibbs, 1991), systémové hypotenzi (Wong and Billiar, 1994), septickému šoku nebo je dávana do spojení s cévním onemocněním a aterosklerózou (Wever et al., 1998; Colman et al., 2006).

Izoforma eNOS je převládající izoformou enzymu v cévách. Exprimována je především v endotelových buňkách, může být však detekována i v krevních destičkách, srdečních myocytech a v některých neuronech mozku (Forstermann et al., 1994). K aktivaci molekuly enzymu eNOS vede jeho fosforylovaná forma enzymu (tzv. peNOS) na molekule serinu (Ser 11770), peNOS je tedy jeho aktivní formou. eNOS může být považována za regulátora homeostázy řady základních kardiovaskulárních funkcí. Oxid dusnatý produkovaný endotelovou NO syntázou roztahuje všechny typy krevních cév. V buňkách hladkého svalstva stimuluje rozpustnou guanylátcyklázu a

zvyšuje cyklický guanosinmonofosfát (cGMP), ten snižuje koncentraci intracelulárního Ca^{2+} a dochází k hyperpolarizaci a vazodilataci cév (Rapoport et al., 1983; Corson et al., 1996). Krevní stěnu cév NO chrání před agregací a adhezí krevních destiček (Alheid et al., 1987), stejně tak může inhibovat adhezi leukocytů (Arndt et al., 1993). Dále bylo prokázáno, že eNOS je schopna inhibovat syntézu DNA, mitogenezi a proliferaci buněk hladkého svalstva cév (Nakaki et al., 1990; Forstermann et al., 1994). Endotelová NO syntáza tedy udržuje rozšířené cévy, reguluje krevní tlak, brání trombóze a je rozhodující pro adaptivní vaskulární remodelaci (Rudic et al., 1998). Zajišťuje také řadu dalších vazoprotektivních a antiaterogenních účinků (Li and Forstermann, 2000).

2.3.4 Endoglin a eNOS

Jak již bylo zmíněno, endoglin má důležitou roli v regulaci exprese endotelové NO syntázy, která je zodpovědná za produkci NO a jeho protektivní vliv na endotel. Existuje řada studií, které dokazují, že exprese eNOS a endoglinu spolu úzce souvisejí (Nachtigal et al., 2012).

Například ve studii *in vivo* u endoglin haploinsuficientních myší (*Eng*^{+/-}) se ukázalo, že pokles hladiny enzymu eNOS způsobil nižší produkci NO a následně i poruchu endotel-dependentní vazodilatace (Jerkic et al., 2004). V další studii se poukazuje na zásadní úlohu endoglinu ve funkci endotelových buněk a regulaci cévního tonu. Endoglin, jako součást aktivovaného komplexu eNOS, stabilizuje eNOS protein a usnadňuje spojení s Hsp90 (heat shock protein), následně dojde k poklesu uvolňování NO a zvýšené produkci O_2 , čímž autoři vysvětlují sníženou vazodilatační odezvu u *Eng*^{+/-} myší (Toporsian et al., 2005). Jiná *in vitro* studie zase prokázala, že endoglin zvyšuje expresi a funkci eNOS, a to na transkripční úrovni (Santibanez et al., 2007).

Dohromady tyto údaje poskytují důkaz o spojitosti endoglinu a jeho související signalizaci, ochranné roli a složitosti při regulaci cévního tonu pomocí NO. Reakce a mechanismy lokalizované v endotelu *Eng*^{+/-} myší však závisejí na konkrétním experimentálním přístupu.

2.4 Solubilní endoglin

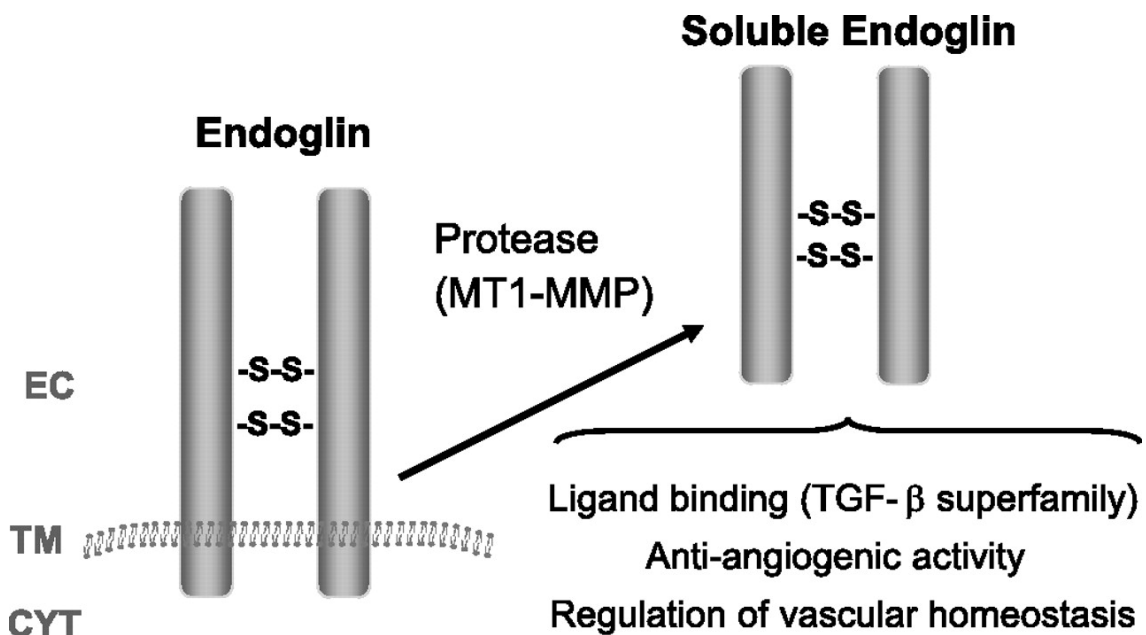
Kromě formy vázané na membrány se vyskytuje endoglin i ve formě netkáňové, tzv. solubilní (sENG či sCD 105). Jde o extracelulární doménu tkáňové formy ENG, která je pomocí membránové matrix metaloproteinázy (MMP-14) štěpena a uvolňována do krevního oběhu – lze pozorovat níže na Obr. 5 (Venkatesha et al., 2006; Hawinkels et al., 2010). Western blot analýzou nebo metodou ELISA lze sENG detekovat v séru nebo v plazmě lidí i experimentálních zvířat. Změněné hladiny a exprese sENG potom souvisejí s regulací endotelových funkcí, patologickým stavem cév a řadou dalších onemocnění. Účinky sENG oproti jeho tkáňové formě jsou však často opačné (Walshe et al., 2009; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Demonstrovány byly například antiangiogenní účinky sENG prostřednictvím inhibice na TGF- β 1 a narušené vazby na receptor. Díky zvýšené expresi sENG dochází k poškození TGF- β signalizace v cévách a k indukci endotelové dysfunkce. Zvýšené uvolňování sENG souvisí i s aktivací eNOS, vazodilatací cév, jejich zvýšenou propustností a je důležitým faktorem při lokálním vazospasmu a poškození koronárních cév (Venkatesha et al., 2006; Hawinkels et al., 2010). Zvýšená hladina solubilního endoglinu byla prokázána u pacientů s hypertenzí, cukrovkou (Blazquez-Medela et al., 2010), má souvislost s patogenezí kardiovaskulárního systému ve vztahu k akutnímu infarktu myokardu, remodelaci srdce (Cui et al., 2008) a srdečnímu selhání (Yanavitski and Givertz, 2011). Solubilní endoglin podporuje endotelovou dysfunkci, tlumí TGF- β 1 signalizaci a aktivuje prozánětlivý stav cévy, tím pádem představuje i důležitý marker v rozvoji aterosklerózy a ischemické choroby srdeční (Blann et al., 1996; Strasky et al., 2011).

V současné době je na solubilní endoglin poukazováno jako na formu určitého markeru endotelové dysfunkce, poškození cév a kardiovaskulárních příhod. Není však ještě plně prozkoumáno, zdali jeho vysoká hladina v séru může sama od sebe vyvolat funkční změnu cévy nebo je jen pouhým ukazatelem dysfunkce (Ikemoto et al., 2012; Nemeckova et al., 2015).

Obrázek 5: Vznik solubilního endoglinu z tkáňové formy

Tkáňová forma endoglinu je složena z transmembránové domény (TM), extracelulární domény (EC) a domény cytoplazmatické (CYT). Solubilní endoglin (Soluble endoglin) je z tkáňové formy proteolyticky štěpen prostřednictvím membránové matrix metaloproteinázy MMP-14 (neboli MT1-MMP). Jedná se o jeho extracelulární doménu (EC). Solubilní endoglin se účastní vazby s TGF- β , má antiangiogenní účinek a je schopen ovlivnit cévní homeostázu.



Převzato: (Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010)

2.5 Transgenní myší model

Pro studium solubilního endoglinu, jeho funkcí, významu a patogenního vlivu byl vytvořen transgenní kmen myši CBAxC57BL/6J na Univerzitě Salamanca ve Španělsku. Jedná se o geneticky modifikovaný model myši, do jejichž organismu byl inkorporován gen pro expresi lidského solubilního endoglinu. Takto upravená skupina myši uvolňuje lidský solubilní endoglin ve vysokých hladinách a vědeckým pracovníkům (včetně experimentální části této práce) tak umožňuje lepší zkoumání funkcí a významu molekuly sENG, interakcí a biologických dějů, a to v relativně krátkém časovém horizontu (Nemeckova et al., 2015).

3. CÍL A ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této práce bylo zhodnotit a kvantifikovat expresi proteinů TGF- β signalizace, konkrétně receptoru TGF- β RII, endoglinu (TGF- β RIII) a molekul eNOS a peNOS, v aortě transgenních myší s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu Sol-Eng⁺ po podávání speciální diety s vysokým obsahem tuku a cholesterolu. Expze těchto proteinů byla současně porovnávána u skupiny sourozenských transgenních myší s hladinami solubilního endoglinu pod hranicí detekce, která byla krmena stejnou dietou. Hladina lidského solubilního endoglinu byla stanovena pomocí ELISA analýzy a pro zhodnocení vlivu diety na hladinu celkového cholesterolu v krvi u obou skupin myší byla využita biochemická analýza. Pro účely hodnocení a porovnání expze daných proteinů jsme zvolili analýzu Western blot.

Souhrnným cílem práce pak bylo zhodnotit podíl vlivu vysokých hladin solubilního endoglinu v kombinaci s vysokotukovou dietou, jakožto rizikového faktoru řady kardiovaskulárních chorob, na změnu expze vybraných členů TGF- β signalizace.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použitá zvířata

K experimentu byl použit kmen geneticky modifikovaných myších samic získaných z laboratoře (Genetically Modified Organisms Generation Unit) Univerzity v Salamance (Španělsko). Jednalo se o 6 měsíců starý transgenní myší kmen CBAXC57BL/6J s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu.

Skupina samic tohoto kmene obsahovala celkově 12 transgenních jedinců. Po odběru krevní plazmy ze špičky ocasu a kvantitativním stanovení hladiny lidského solubilního endoglinu pomocí ELISA analýzy, konkrétně Human Endoglin/CD105 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA), byla podle hladin lidského solubilního endoglinu rozdělena do dvou skupin. Sledovaná skupina (Sol-Eng⁺) 5 myší obsahovala samice s vysokými hladinami lidského solubilního endoglinu (průměrně 3480 ng/ml) a byla porovnávána se skupinou 7 samic s velice nízkými (nedetekovatelnými) hladinami tohoto endoglinu, která sloužila jako skupina kontrolní.

Obě skupiny myší byly krmeny po dobu 3 měsíců speciální dietou s vysokým obsahem tuku 40 % a cholesterolu 1,25 % (Research Diets, Inc, USA). Po celou dobu experimentu byly chovány v klecích při konstantní teplotě a vlhkosti, měly volný přístup k vodě a byl u nich dodržován 12-ti hodinový světelný cyklus.

Pro biochemické stanovení hladin celkového cholesterolu z krevní plazmy, provedené laboratoří ÚKBD Fakultní nemocnice Hradec Králové, byla samicím odebrána krev do heparinových zkumavek. Hodnoty cholesterolu byly naměřeny za pomoci spektrofotometrické analýzy (ULTROSPECT III, Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden) a porovnávány mezi oběma skupinami. Vzorčky tkáně hrudní části aorty potřebné pro analýzu Western blot byly odebrány po usmrcení myší, zmrazeny v tekutém dusíku a do provedení experimentu byly uskladněny při - 80 °C.

Veškeré experimenty byly provedeny v souladu se směrnicí Evropské unie (86/609/EEC) o ochraně zvířat využívaných pro vědecké účely, rovněž používání laboratorních zvířat bylo schváleno Etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Praze a Výborem pro bioetiku Univerzity v Salamance.

4.2 Pracovní postup pro analýzu Western blot

Western blot je důležitá imunoanalytická metoda používaná v buněčné i molekulární biologii, díky níž jsme schopni identifikovat specifické proteiny ve vzorku homogenátu tkáně.

4.2.1 Homogenizace a izolace proteinů

Vzorky myších aort byly zváženy a přidány do mikrozkmavek s lyzačním RIPA puftrem (Radio Immuno Precipitation Assay buffer; Sigma-Aldrich, USA), který zajistil efektivní lýzu buněk a rozpouštění proteinů. Součástí byly i inhibitory proteáz (SERVA Electrophoresis, Německo) a fosfatáz (Thermo Fisher Scientific, USA) zabraňující štěpení vzorku vlastními enzymy. Degradaci a denaturaci bílkovin se zabránilo zpracováním vzorků stále při nízkých teplotách.

Takto připravené tkáně byly nejprve mechanicky nastříhány na menší části a poté zpracovány rotor-statorem do vzniku homogenní tekutiny.

K oddělení částic ze suspenze se použila centrifugace. Odstředivou silou, při otáčkách 10 000 RPM (Revolution per minute) a 4 °C, došlo k urychlení sedimentace a vzniklý supernatant sloužil jako výsledný vzorek pro další zpracování.

4.2.2 Stanovení koncentrace proteinů

Pro zkoumání proteinu ve vzorku je velmi důležité zjistit jeho přesnou koncentraci. Ta se stanovovala bicinchoniovou metodou (BCA), založenou na spektrofotometrickém stanovení. Pomocí níž se zjistila absorbance vzorku a následně byla vypočtena koncentrace daného proteinu.

Nejprve však bylo nutné stanovit kalibrační křivku standardního roztoku o známé koncentraci, jako je bovinní sérový albumin (BSA). Dle stoupající koncentrace standardního roztoku (0 -1500 µg/ml) se připravila řada roztoků naředěného albuminu, změřila se absorbance a z hodnot se sestavila kalibrační křivka.

Aby vzniklo požadované ředění vzorků, vybral se z každé skupiny myší, tedy sledované Sol-Eng⁺ i skupiny kontrolní, jeden vzorek referenční.

Poté se do jamek mikrotitrační destičky aplikovalo stejné množství vzorku i albuminu. Vše bylo pipetováno v duplikátu. Pro zahájení barevné enzymatické reakce, v našem případě fialové, bylo potřeba přidat ještě směs reakčních činidel. Vzorky se řádně promíchaly a v termostatu se při 37 °C nechaly 30 minut inkubovat.

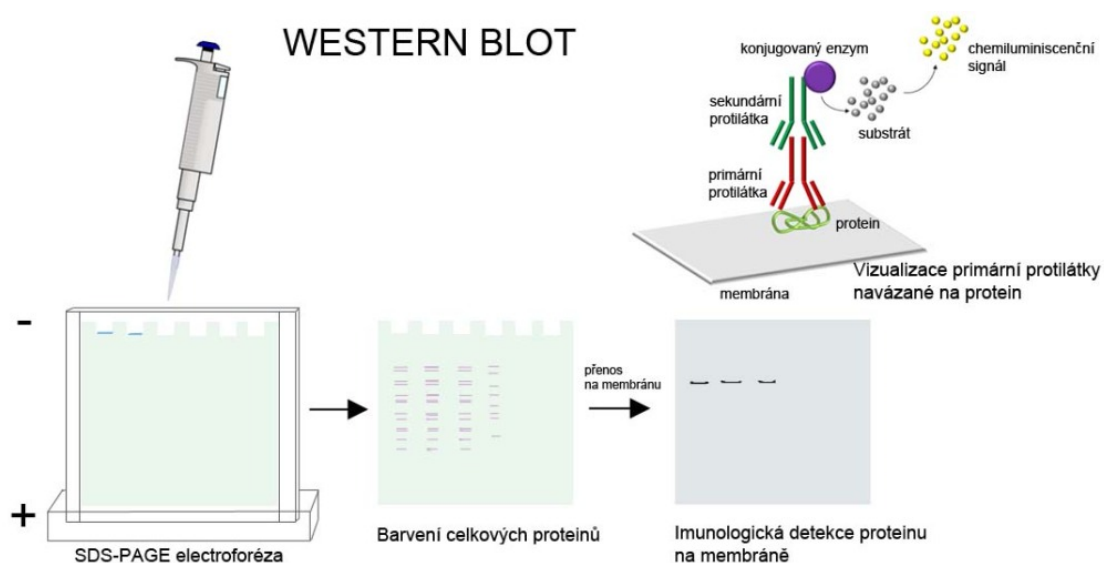
Pomocí spektrofotometru se naměřila absorbance a dle intenzity zbarvení středu kalibrační křivky byla nalezena barevná reakce vzorku, která je úměrná množství proteinu a detekovatelná při 562 nm. V našem případě hodnota odpovídala vzorku ředěného 10x.

Stejným způsobem se následně připravila a proměřila absorbance vzorků druhé mikrotitrační destičky. Ze získaných hodnot pomocí aplikace Microsoft Excel počítač přepočítal ředění a hodnotu koncentrace proteinu potřebnou pro přípravu vzorků ke gelové elektroforéze.

4.2.3 Western blot analýza

Imunoanalytická metoda zahrnující kombinaci tří kroků: 1) Polyakrylamidová gelová elektroforéza; 2) Přenos (blotování) proteinů z gelu na pevný nosič - membránu a následná inkubace s protilátkami specifickými k danému proteinu; 3) Navázání protilátek a imunodetekce cílového proteinu (Mahmood and Yang, 2012)

Obrázek 6: Základní kroky analýzy Western blot



Převzato: <<http://labguide.cz/metody/western-blot/>> [2016-06-20]

4.2.3.1 Gelová elektroforéza

Je prvním krokem analýzy, kde dochází k separaci proteinů v elektrickém poli na základě svých molekulových hmotností.

Příprava gelů:

Pro přípravu separačního a zaostřovacího gelu bylo v první řadě nutné sestavit aparaturu. Ta se skládala ze stojánku a držáku skel. Skla byla dvojího typu, kratší a delší. Do držáku se vkládala čistá a osušená, kratším sklem směrem dopředu. Aby se zamezilo případnému pozdějšímu vytékání gelu, ověřilo se těsnění aparatury vstříkem destilované vody.

Separací gel se připravil smísením všech potřebných složek (viz níže Tabulka 1). Akrylamid-bis roztok se smíchal se separačním pufrům, redestilovanou vodou a SDS (dodecylsírán sodný). Nakonec se vmíchal TEMED (tetramethyldiamin) s APS (peroxodisírán amonný), po jejichž přidání začala polymerace gelu. Takto nachystaný separační gel se mohl pipetovat do prostoru mezi skly aparatury, a to zhruba do výšky 1,5 cm pod hranou kratšího skla. Gel se následně převrstvil asi centimetrovou vrstvou isobutanolu, který vyhnal případně vzniklé vzduchové bubliny a vyrovnal hladinu gelu. Polymerace trvala přibližně 40-60 minut. Kontrolou nám bylo ztuhnutí zbytku gelu v kádince. Poté se isobutanol vytil a vzniklý gel propláchl destilovanou vodou.

Pro gelovou elektroforézu lze připravit separační gel o různé koncentraci. Vybírá se na základě molekulové hmotnosti (kDa) sledované protilátky. Čím je velikost proteinu menší, tím rychleji a snadněji projde gelem. Pro zachycení separace sledovaného proteinu byl v našem případě potřeba gel o koncentraci 8 %, 10 %, 12 % a 14%.

- TGF- β RII (70 kDa) 8 %
- peNOS (140 kDa) 10 %
- eNOS (140 kDa) 12 %
- Endoglin (100 kDa) 14 %

Dalším krokem bylo vrstvení zaostřovacího gelu na již zatuhlý separační gel. Postup přípravy byl obdobný. Jeho koncentrace (5 %) je však pro všechny separační gely stejná (viz níže Tabulka 1). Po napipetování gelu po horní okraj skel se vložil teflonový hřebínek pro vytvoření jamek na nanášení vzorků. Bylo nutné doplňovat gel po okrajích hřebínku i v průběhu polymerace, aby se zamezilo vzniku bublin a případnému poškození jamek. Tuhnutí probíhalo opět 45-60 minut.

Tabulka 1: Složení gelů

Milli-Q= redestilovaná voda; *SDS*= dodecylsírán sodný; *APS*= persíran amonný; *TEMED*= *N, N, N', N'* - tetramethylethyldiamin.

Komponenty	Separační gel				Zaostřovací gel
	8 % (ml)	10 % (ml)	12 % (ml)	14 % (ml)	5 % (ml)
Milli-Q	10,800	9,800	8,800	7,800	6,150
Pufř pro separační gel	5,000	5,000	5,000	5,000	/
Pufř pro zaostřovací gel	/	/	/	/	2,500
Akrylamid	4,000	5,000	6,000	7,000	1,250
10 % SDS	0,200	0,200	0,200	0,200	0,100
10 % APS	0,060	0,060	0,060	0,060	0,030
TEMED	0,030	0,030	0,030	0,030	0,015

Příprava vzorků:

Předchystané vzorky se nechaly rozmrazit a podle tabulky s koncentracemi se naředily do mikrozkušavek. V poměru 1:1 se promísily s nanášecím pufřem (Sample buffer). Směs se poté stočila na centrifuze a nechala se v termostatu 5 minut povařit při teplotě 95 °C. Takto připravené vzorky, ochlazené na laboratorní teplotu, byly připravené k aplikaci do gelu.

Aplikace vzorku a elektroforéza:

Ze ztuhlého gelu se opatrně vytáhl hřeben. Vytvořené jamky pro nanášení vzorků se zkontrolovaly a vypláchly se připraveným SDS - elektroforetickým pufrům. Skla s vytvořenými gely se vytáhla ze stojanu a přenesla do držáku elektroforetické vany. Zasadila se tak, aby kratší skla směřovala směrem dovnitř k těsnění vany. Vytvořená komora se poté naplnila SDS - elektroforetickým pufrům tak, aby jamky na vzorky byly pod hladinou.

Do první jamky gelu se obvykle nanášel hmotnostní marker (Precision Plus Protein Standards, Bio-Rad), standard o známé molekulové hmotnosti, o objemu 5 μ l. Do zbylých jamek se následně pipetovaly naředěné vzorky po 10 μ l. Po aplikaci vzorků se vana doplnila elektroforetickým pufrům po rysku, uzavřela víkem s elektrodami a zapojila do zdroje. K zajištění nízké teploty během elektroforézy se stěny aparatury chladily destičkami z hlubokomrazícího boxu.

Bylo nutné nastavit podmínky elektroforézy:

- Konstantní napětí: 200 V
- Maximální proud: 15 mA / gel
- Čas separace: 1,15 hod

Po uplynutí doby elektroforézy a vyjetí čela, značené bromfenolovou modří v nanášecím pufru, se zdroj vypnul a SDS pufr vylil. Skla se vydělala z elektroforetické aparatury a opatrně se od sebe oddělila tak, aby nedošlo k porušení gelu. Zaostřovací gel se odřízl, separační gel očistil a pro lepší přenos do transferového pufru se jeho okraje nařízly.

4.2.3.2 Blotování polosuchou cestou

Dalším krokem je docíleno přenosu neboli blotování proteinů z gelu na membránu. V našem případě jsme zvolili tzv. polosuchou cestu („semi-dry“) za pomoci přístroje Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), a to z hlediska uniformity přenosu proteinů z více použitých gelů na membránu, nižší spotřebě transferového pufru a homogenity elektrického pole.

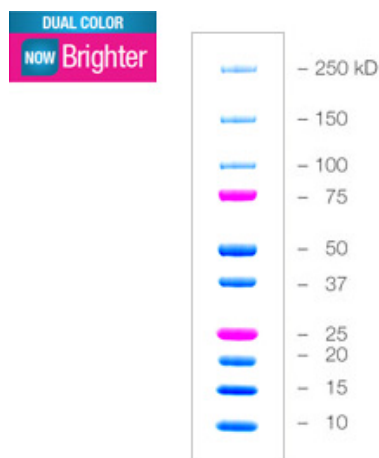
Pro přenos proteinů byla použita PVDF (polyvinylidenfluoridová) membrána (Millipore, USA), která se musela nejprve nastříhat podle velikosti gelu a pro transfer proteinů zaktivovat smočením po dobu 15 sekund v methanolu a poté 2 minuty v destilované vodě. Muselo se s ní pracovat velmi opatrně.

Podstatou přenosu bylo sestavení tzv. „sendviče“. Dle počtu gelů se nastříhaly extra silné filtrační papíry, namočily se do transferového pufru a položily na anodu (spodní díl) blotovacího přístroje. Na tyto filtrační papíry se položily zaktivované membrány, s nimiž se už nesmělo hýbat. Na membrány se za pomoci plastové destičky přenesly gely, které byly překryty dalším filtračním papírem namočeným v transferovém pufru. Celá sestava se lehce přejela válečkem pro vytlačení vzduchových bublin, přiklopila se katoda, zavřelo víko a přístroj zapojili ke zdroji. Nastavily se podmínky přenosu:

- 2 gely/4 gely: konstantní proud 170 mA/200mA, maximální napětí 25 V, po dobu 30 minut/75 minut

Po uplynutí doby přenosu byl přístroj odpojen, otevřelo se víko s katodou a přilepený gel na filtračním papíru se opatrně odstranil. Membrána se zachycenými proteiny se vložila do destilované vody, aby se zabránilo vysušení. Díky hmotnostnímu standardu a rozjeté barevné škále proteinů (viz Obr. 7) se mohly membrány nastříhat dle sledovaných kDa. Následně tak byly připraveny k imunodetekci.

Obrázek 7: Hmotnostní standard znázorňující škálu proteinových bandů



Převzato: <<http://www.bio-rad.com/en-cn/sku/1610374-precision-plus-protein-dual-color-standards-500-mul>> [2016-06-21]

4.2.3.3 Imunodetekce

Posledním krokem analýzy dochází k navázání příslušných protilátek a imunodetekci cílového proteinu.

Před tím je však nutné nejprve zablokovat nescifická vazebná místa na membráně. Membrány se blokovaly při pokojové teplotě v roztoku TBS-T-5% mléka na třepačce po dobu 1 hodiny. Tím se vyvázala nescifická místa na membráně a zabránilo se případnému pozdějšímu navázání proteinů na nesprávná místa.

Během blokace vazebných míst se v roztoku TBS-T-5% mléka naředily v příslušné koncentraci primární protilátky cílené na myší tkáň. Nastavení primárních protilátek bylo následující:

- Rabbit polyclonal anti-TGF- β R2 (Santa-Cruz Biotechnology, USA) v ředění 1:200
- Rabbit polyclonal anti-eNOS (Santa-Cruz Biotechnology, USA) v ředění 1:2000
- Rabbit polyclonal anti-peNOS (Santa-Cruz Biotechnology, USA) v ředění 1:500
- Goat polyclonal anti-Endoglin (Santa-Cruz Biotechnology, USA) v ředění 1:200
- Mouse monoclonal anti-GAPDH (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:1000 pro potvrzení jednotné nanášky proteinů

Poté se membrány umístily na kývačku do parafilmových vaniček a nechaly se při 4°C s primárními protilátkami přes noc inkubovat.

Druhý den se membrány vložily do nádob s TBS-T roztokem. Mělo se zajistit vymytí nenavázané primární protilátky. Promývání a výměna roztoku probíhala na třepačce za pokojové teploty, a to nejprve 3x po sobě a následně 5x po 10 minutách.

Mezi promýváním se v roztoku TBS-T-5% mléka naředily sekundární protilátky, značené křenovou peroxidázou způsobující požadovanou chemiluminiscenci. Nastavení sekundárních protilátek bylo následující:

- TGF- β R2: HRP (Horseradish peroxidase) conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, UK) v ředění 1:2000

- eNOS: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, UK) v ředění 1:2000
- peNOS: HRP conjugated goat anti-rabbit IgG (Abcam, UK) v ředění 1:2000
- Endoglin: HRP conjugated anti-goat IgG (Abcam, UK) v ředění 1:5000
- GAPDH: HRP conjugated goat anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, USA) v ředění 1:20000

Po promytí se na kývačce při pokojové teplotě nechaly membrány 1 hodinu inkubovat se sekundárními protilátkami.

Po inkubaci se membrány vložily do nádob s roztokem TBS-T a promývaly se obdobným způsobem jako v předešlém případě.

4.2.3.4 Chemiluminiscenční detekce

Pro detekci chemiluminiscenční reakce a vzniku světla v místě výskytu proteínu bylo zapotřebí fotografického filmu (Foma, ČR) a složek detekčního kitu (Thermo Fisher Scientific, USA), které se smíchaly v poměru 1:1 v dostatečném množství na zalití celé membrány.

Detekční roztok se nanášel na promyté a okapané membrány v inkubačním čase daným volbou chemiluminiscenčního substrátu (Pico/Femto). V našem případě tedy:

- TGF- β RII: Pico (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate)
v inkubačním čase 2 minuty
- eNOS: Femto (SuperSignal West Femto Chemiluminiscent Substrate)
v inkubačním čase 20 sekund
- peNOS: Pico (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate)
v inkubačním čase 2 minuty
- Endoglin: Pico (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate)
v inkubačním čase 1 minuta
- GAPDH: Pico (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate)
v inkubačním čase 1 minuta

Po celou dobu se muselo pracovat přesně a rychle, aby nedošlo ke spálení membrány. Přebytečné množství reagens se vždy odsálo gázou, membrány se zabalily do průhledných folií a vložily do uzavíratelné kazety. Další kroky detekce probíhaly v temné komoře.

V komoře jsme si připravili vany s roztokem vývojky, ustalovače a čistou vodou na oplachování vyvolaných RTG filmů. Na membrány se přikládaly fotografické filmy a nechaly se exponovat po příslušnou dobu dle sledovaného proteinu.

Díky reakci mezi detekčním činidlem a křenovou peroxidázou (HRP), enzymem, jímž jsou značené sekundární protilátky vázané na primárních protilátkách sledovaného proteinu, bylo možné detekovat jejich místa a oblasti jednotlivých kDa. Pro vyhodnocení vyvolaných filmů byla použita denzitometrická metoda. Intenzita vzniklých bandů byla naskenována pomocí programu Epson Perfection V5000 Photo (EPSON Inc., USA) a kvantifikace byla provedena pomocí programu pro analýzu obrazu NIS-Elements software 4.0 (Laboratory Imaging, ČR).

4.2.4 Statistická analýza

Statistická významnost rozdílů ve sledovaných skupinách myší se hodnotila nepárovým tzv. T-testem (Mann-Whitney test) v programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc., CA), který stanovil hodnotu hladiny statistické významnosti (p -hladina). Rozdíly mezi skupinami jsou tedy statisticky významné tehdy, pokud je p hodnota 0,05 nebo nižší. V grafu je hodnota p znázorněna symbolem „*“, platí tedy: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. Všechny výsledky v grafech jsou vyjádřeny jako průměr \pm SEM (střední chyba v průměru) procentuálních hodnot exprese proteinu pro každou sledovanou skupinu (Sol-Eng⁺) v porovnání se skupinou kontrolní.

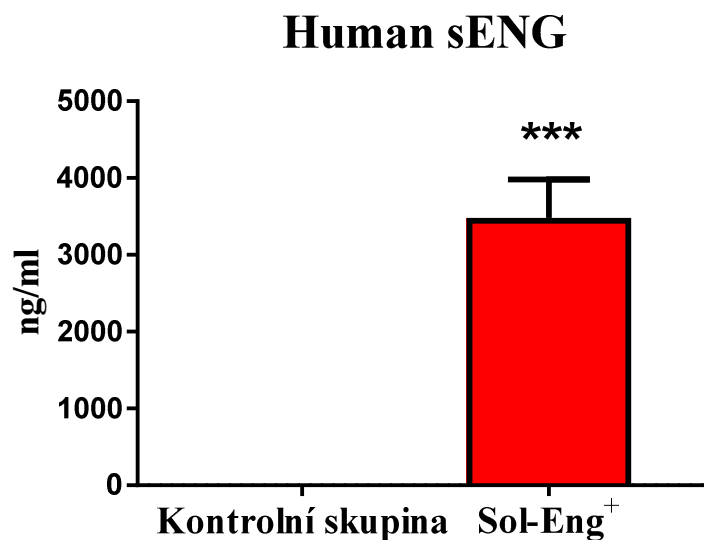
5. VÝSLEDKY

5.1 ELISA analýza

Kvantitativní stanovení hladiny lidského solubilního endoglinu (sENG) u samic transgenního modelu myši bylo provedeno ELISA analýzou. Analýza nám poskytla informaci o plazmatických hladinách sENG a na základě výsledků došlo k rozdělení samic do dvou porovnávaných skupin myši. Hodnoty u skupiny myši Sol-Eng⁺ byly signifikantně vyšší (3480 ± 501 ng/ml) než u porovnávané skupiny kontrolní. U skupiny kontrolních myši se ukázaly hodnoty sENG v plazmě pod hranicí detekce. Výsledky analýzy jsou zobrazeny v Grafu 1.

Graf 1: Hladiny lidského solubilního endoglinu

Sloupec 1 znázorňuje expresi sENG u skupiny myši kontrolních a sloupec 2 expresi sENG u skupiny myši Sol-Eng⁺. Ve srovnání s kontrolní skupinou, kde hodnoty sENG dosahovaly pod hranici detekce, u skupiny Sol-Eng⁺ byly hodnoty velice vysoké.

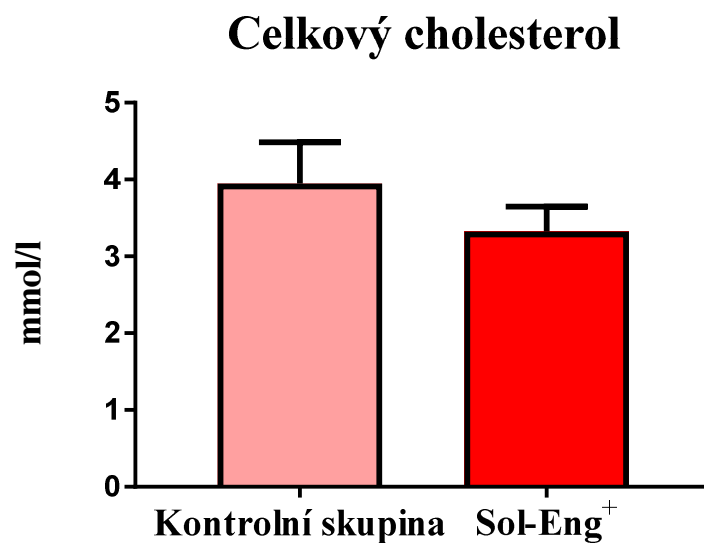


5.2 Biochemická analýza

Biochemickou analýzou byly stanoveny hladiny celkového cholesterolu v plazmě u obou skupin zkoumaných myší. Skupina transgenních myší Sol-Eng⁺, která byla tři měsíce krmená speciální dietou bohatou na tuky a cholesterol, nevykazovala zásadní rozdíl v hladinách celkového cholesterolu oproti skupině kontrolní, která byla krmena odpovídající dietou po stejné časové období. Rozdíly hladin byly statisticky nevýznamné ($3,947 \pm 0,539$ mmol/l vs. $3,322 \pm 0,324$ mmol/l; $p=0,3308$), viz Graf 2.

Graf 2: Hladiny celkového cholesterolu

Tři měsíce podávaná speciální dieta a zvýšené hladiny lidského solubilního endoglinu u myší ve skupině Sol-Eng⁺ statisticky významně neovlivnily hladiny celkového cholesterolu oproti skupině kontrolních myší, bez zvýšených hladin lidského solubilního endoglinu se stejnou dietou.



5.3 Western blot analýza

Výsledky Western blot analýzy znázorňují expresi sledovaných proteinů detekovaných ve vzorcích homogenátu myších aort. Účelem bylo zhodnotit změny exprese těchto proteinů mezi sledovanou skupinou myší se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu Sol-Eng⁺ a skupinou kontrolní.

Naším měřením se prokázal statisticky významný nárůst exprese endoglinu (ENG, TGF-βRIII) u skupiny myší Sol-Eng⁺, v porovnání se skupinou kontrolní dosahoval nárůst více než 60 % (100,00 ± 20,08 % vs. 168,10 ± 4,85 %; $p=0,0303$ – viz Graf 3). Signifikantně zvýšená exprese byla zaznamenána i u transmembránového receptoru cytokinu TGF-β (TGF-βRII), a to o 54 % u sledované skupiny Sol-Eng⁺ v porovnání s kontrolní skupinou (100,00 ± 11,61 % vs. 153,50 ± 21,49 %; $p=0,0480$ – viz Graf 4). V případě enzymu endotelové NO syntázy a její aktivní formy (eNOS/peNOS) však nedošlo k signifikantnímu rozdílu v expresi mezi oběma skupinami myší. Jejich rozdíl exprese nebyl statisticky významný (pro eNOS 100,00 ± 5,46 % vs. 97,47 ± 7,25 %; $p=0,8763$ – viz Graf 5 a pro peNOS 100,00 ± 14,33 % vs. 101,20 ± 14,67 %; $p>0,9999$ – viz Graf 6).

Fotografie RTG snímků s vyobrazenými bandy proteinů z chemiluminiscenční detekce jsou vyobrazeny na Obrázku 9 pro ENG, na Obrázku 10 pro TGF-βRII, na Obrázku 11 pro eNOS a na Obrázku 12 pro detekci peNOS. Pro potvrzení jednotné nanášky sledovaných proteinů jsme provedli i detekci GAPDH, která je zobrazena níže na Obrázku 8.

Obrázek 8: Foto RTG snímku – detekce GAPDH (30-40 kDa)

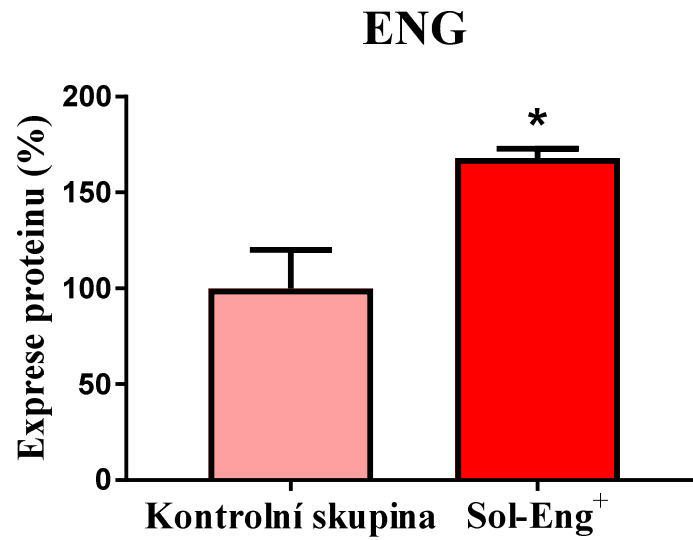
Potvrzení jednotné nanášky proteinů. Kontrolní skupina – vzorky č. 1-7 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky č. 8-12.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

Graf 3: Western blot analýza exprese ENG

Sloupec 1 znázorňuje expresi ENG u skupiny myší kontrolních a sloupec 2 expresi ENG u skupiny myší se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese v cévě..



Obrázek 9: Foto RTG snímku – detekce ENG (100 kDa)

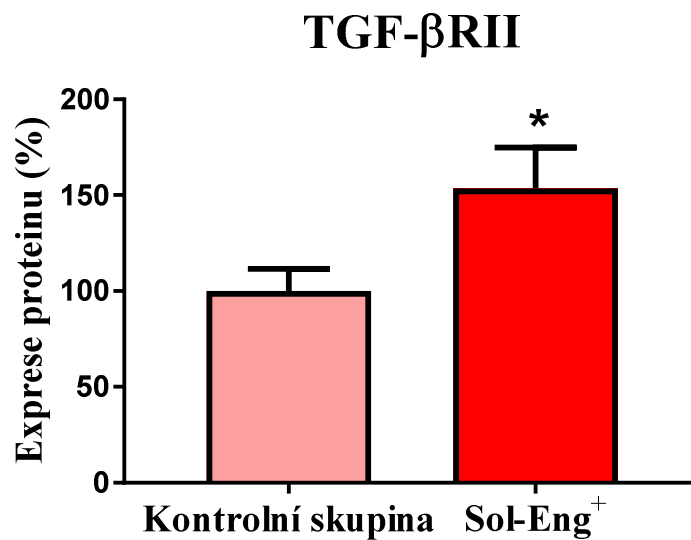
Kontrolní skupina – reprezentativní vzorky č. 1-5 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky č. 6-10.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

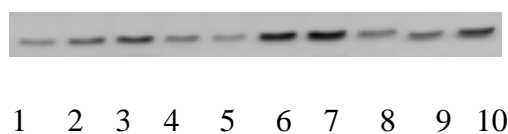
Graf 4: Western blot analýza exprese TGF- β RII

Sloupec 1 znázorňuje expresi TGF- β RII u skupiny myší kontrolních a sloupec 2 expresi TGF- β RII u skupiny myší se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní došlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese v cévě.



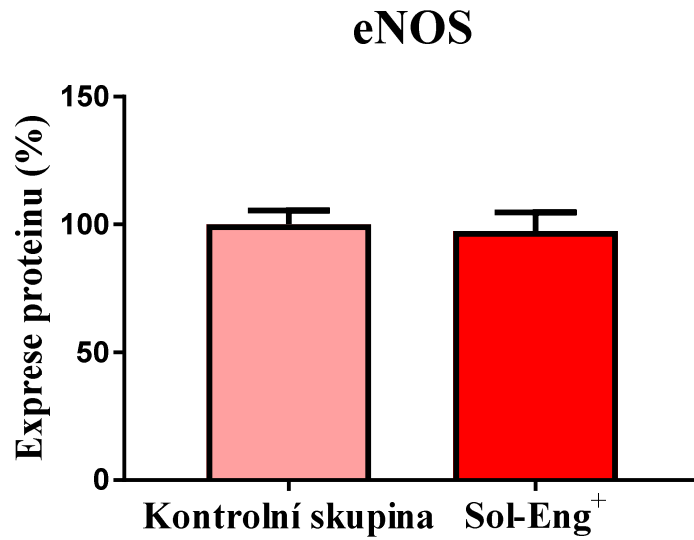
Obrázek 10: Foto RTG snímku – detekce TGF- β RII (70 kDa)

Kontrolní skupina – reprezentativní vzorky č. 1-5 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky č. 6-10.



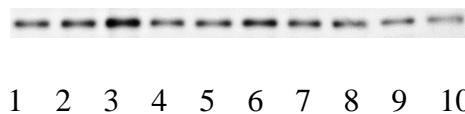
Graf 5: Western blot analýza exprese eNOS

Sloupec 1 znázorňuje expresi eNOS u skupiny myší kontrolních a sloupec 2 expresi eNOS u skupiny myší se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní nedošlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese.



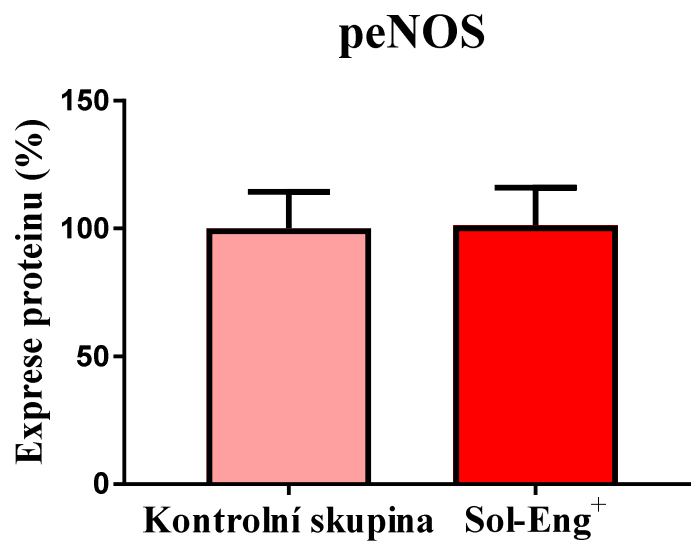
Obrázek 11: Foto RTG snímku – detekce eNOS (140 kDa)

Kontrolní skupina – reprezentativní vzorky č. 1-5 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky č. 6-10.



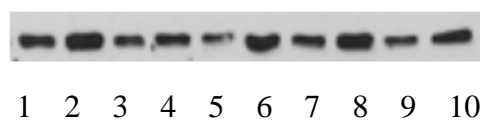
Graf 6: Western blot analýza exprese peNOS

Sloupec 1 znázorňuje expresi peNOS u skupiny myší kontrolních a sloupec 2 expresi peNOS u skupiny myší se zvýšenou hladinou lidského solubilního endoglinu. Ve srovnání se skupinou kontrolní nedošlo u skupiny Sol-Eng⁺ k signifikantnímu zvýšení exprese.



Obrázek 12: Foto RTG snímku – detekce peNOS (140 kDa)

Kontrolní skupina – reprezentativní vzorky č. 1-5 a Sol-Eng⁺ skupina – vzorky č. 6-10.



6. DISKUZE

Endoglin, homodimerní transmembránový glykoprotein, se jako přídatný receptor TGF- β RIII podílí na signální transdukcí transformujícího růstového faktoru TGF- β (Lebrin et al., 2005). Bylo prokázáno, že ve spojení s TGF- β RI nebo TGF- β RII receptory usnadňuje vazbu TGF- β 1 nebo TGF- β 3 cytokinu a vytváří funkční komplex. Vazbou s danými receptory reguluje jejich fosforylaci a ovlivňuje aktivitu jaderných efektorů TGF- β signalizace (Llorca et al., 2007). Endoglin je důležitý pro modulaci buněčné odpovědi TGF- β u endotelových buněk (Bobik, 2006) a několik důkazů svědčí o jeho významné roli a úloze při angiogenezi, cévní remodelaci, tonu cév nebo při celkovém vývoji kardiovaskulárního systému (Blann et al., 1996; Lopez-Novoa and Bernabeu, 2010).

Rovněž studium solubilního endoglinu, tedy – extracelulární části membránového proteinu odštěpeného do cirkulace, zaznamenalo vliv této molekuly na kardiovaskulární systém, a to zejména z hlediska vaskulárního poškození. Jeho zvýšené hladiny byly detekovány u řady patologických stavů, včetně aterosklerózy a hypercholesterolémie (Blann et al., 1996; Nachtigal et al., 2012). Zjistilo se, že působí inhibičním účinkem na TGF- β signalizaci v cévách a může hrát roli v cévní dysfunkci. Narušuje totiž vazbu TGF- β 1 na receptory a ovlivňuje tak samotnou signalizaci cytokinu. Tím, že soutěží o vazbu na receptory, může solubilní endoglin narušit vazodilataci cévy, interferuje s její vaskulární funkcí a snižuje schopnost aktivace eNOS v endotelových buňkách. S endotelovou dysfunkcí a projevy hypoxie cévy potom souvisí nadměrná exprese sENG, vede k deregulaci TGF- β signalizace a může vyvolat hypertenzi nebo přispívat k syndromu preeklampsie (Venkatesha et al., 2006; Vlabuena-Diez et al., 2012).

Zvýšené uvolňování solubilního endoglinu bylo zjištěno i u modelu srdečního selhání. Byla naznačena možnost využití solubilního endoglinu jako specifického markeru srdečního přetížení a zvýšení plicních tlaků komory srdce, jeho hladiny totiž korelovaly s plicním tlakem levé komory (Kapur, et al., 2010). V souvislosti se srdečním selháním byl potvrzen i fakt, že sENG narušuje TGF- β 1 signalizaci a snižuje syntézu kolagenu v srdečních fibroblastech. Na rozdíl od endoglinu vázaného v membráně, který proces fibrózy zprostředkovává, má přítomnost solubilního endoglinu antifibrotické působení. Jak u srdečního selhávání, tak u modelu chronického

infarktu myokardu *in vivo* sENG tlumí srdeční fibrózu a zvyšuje tak možnost přežití a zlepšení kvality života (Kapur et al., 2012; Nachtigal et al., 2012).

Studie, které se zabývaly souvislostí endoglinu a endotelové dysfunkce, prokázala zvýšené hladiny solubilního endoglinu u hypercholesterolemických pacientů. Hladiny sENG korelovaly se zvýšenou hladinou cholesterolu, což bylo dáno do souvislosti s rozvojem dysfunkce endotelu a aterosklerotickou aktivitou (Blann et al., 1996; Blaha et al., 2008). Významné zvýšení solubilního endoglinu se projevilo i po podání 1% cholesterolové diety u myší (Strasky et al., 2011), u kterých hladiny sENG začaly zřetelně klesat až po podání statinové léčby (Rathouská et al., 2011). Další studie přišla s hypotézou, že zvýšené uvolňování solubilního endoglinu souvisí se zvýšenou propustností stěny cév, které vzniklo poškozením endotelových buněk (Venkatesha et al., 2006).

Z výše uvedených prací je patrné, že o solubilním endoglinu lze uvažovat minimálně jako o markeru endotelové dysfunkce a patogeneze kardiovaskulárních onemocnění. Zkoumá se však také jeho potenciální přímý podíl na indukci dysfunkce endotelu a vaskulární poškození v souvislosti s jeho zvýšeným uvolňováním (Rathouska et al., 2015).

S ohledem na tyto skutečnosti byla provedena nedávná studie, která se zabývala poškozením endotelu a cév vlivem solubilního endoglinu. Byla provedena na cévách transgenních myší vykazujících vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu, kde probíhala analýza exprese vybraných molekul a markerů souvisejících s endotelovou dysfunkcí v aortách tohoto transgenního kmene. Byla určena sledovaná skupina myší, kterou tvořily samice vykazující vysoké hladiny lidského solubilního endoglinu a dále pak skupina kontrolní, exprimující nízké hladiny tohoto markeru, se kterou byla sledovaná skupina porovnávána. Obě skupiny myší byly krmeny standardní dietou pro hlodavce. Závěr studie zaznamenal rozvoj mírné hypertenze a proteinurie u sledované skupiny myší, nicméně ve srovnání se skupinou kontrolní se neprokázal zásadní rozdíl v expresi membránového endoglinu, adhezních molekul, ani molekuly eNOS v endotelu aort sledované skupiny. Nebyla tak ani potvrzena hypotéza o tom, že by vysoká koncentrace lidského solubilního endoglinu v plazmě sama o sobě vyvolala indukci endotelové dysfunkce. Byla jen naznačena možnost vlivu zvýšeného solubilního endoglinu na endotel až v kombinaci s hypercholesterolemií, zánětem nebo jiným

rizikovým faktorem souvisejícím s kardiovaskulárním onemocněním (Nemeckova et al., 2015).

Na podkladě závěrů předchozí studie jsme v naší studii u stejného kmene transgenních myší sledovali a hodnotili exprese molekul eNOS/peNOS, membránového endoglinu a receptoru TGF- β RII v aortě a jejich změny v přítomnosti vysokých plazmatických hladin lidského solubilního endoglinu, avšak s tím rozdílem, že byla u myší použita vysokocholesterolová dieta. Po dobu tří měsíců byly obě skupiny myší krmeny speciální dietou bohatou na tuky (40 %) a cholesterol (1,25 %) a předpokládalo se, že díky této dietě bude posíleno rizikové působení sENG na funkci cévního endotelu a patogenezi kardiovaskulárních onemocnění. Zkoumány byly tedy dvě skupiny myší na téže dietě, sledovaná skupina (Sol-Eng⁺) a skupina kontrolní (hodnoty solubilního endoglinu pod hranicí detekce).

Z výsledků biochemické analýzy naší studie bylo zjištěno, že dieta bohatá na tuky a cholesterol v kombinaci se zvýšenými hladinami lidského solubilního endoglinu nijak významně neovlivnila hladinu celkového cholesterolu v plazmě u Sol-Eng⁺ skupiny oproti skupině kontrolní. Obě skupiny myší se tak skutečně lišily výhradně v hladinách solubilního endoglinu, nikoli v hladinách krevních lipidů.

Výsledky naměřené Western blot analýzou jsme však zjistili poměrně významný rozdíl v expresi některých sledovaných markerů.

Molekula membránového endoglinu (ENG) prokazovala oproti skupině kontrolní významný nárůst exprese u skupiny myší Sol-Eng⁺ a signifikantně zvýšená exprese byla zaznamenána i u TGF- β receptoru II. ENG, jako přídatný receptor TGF- β RIII je důležitý pro regulaci komplexu cytokinu TGF- β , pro modulaci jeho buněčné odpovědi a pro vazbu s dalšími signálními receptory, jako je TGF- β RII, kdy společně ovlivňují aktivitu jaderných Smad efektorů TGF- β signalizace a jejich regulační všestrannost (Lebrin et al., 2004). S ohledem na předchozí studii by mohla kombinace zvýšené hladiny solubilního endoglinu a cholesterolové diety, jako rizikového faktoru, znamenat pravděpodobný podíl na změnách TGF- β signalizace, které by se mohly částečně odrazit ve funkčním poškození cévy a vlivu na kardiovaskulární systém. Tento předpoklad však bude nutné ověřit dalšími studiemi.

V případě hodnocení exprese molekul eNOS/peNOS (proteinů potenciálně ovlivněných endoglinem a TGF- β signalizací) však nebyl prokázán významný rozdíl v expresi mezi oběma skupinami myší.

Molekuly eNOS a její aktivní formy peNOS jsou zodpovědné mimo jiné za vazodilataci cév, inhibici adheze a agregace trombocytů a vyznačují se vazoprotektivními a antiaterogenními účinky. eNOS je důležitá pro mnoho biologických funkcí, včetně cévní homeostázy a regulace základních kardiovaskulárních funkcí (Rapapoert et al., 1983; Corson et al., 1996). Membránový endoglin zase hraje důležitou roli v regulaci exprese tohoto enzymu. Naopak potenciálně inhibiční účinek solubilního endoglinu na TGF- β 1, včetně narušení TGF- β signalizace v cévách a tím narušení exprese eNOS, vede k poškození cév a jeho nadměrné působení může vyvolat až lokální vasospasmus či hypertenzi (Venkatesha et al., 2006). V naší studii však dopad vysokých hladin solubilního endoglinu na expresi enzymu eNOS a aktivní formy peNOS prokázán nebyl.

Souhrn výsledků této studie tedy naznačuje potenciální vliv solubilního endoglinu společně s dalším rizikovým faktorem (vysokotuková dieta) na expresi některých členů TGF- β signalizace (TGF- β RII, TGF- β RIII) v aortě transgenních myší, bez ovlivnění enzymu eNOS a jeho aktivní fosforylované formy (peNOS). K vytvoření komplexnějšího závěru však bude nutné provést řadu dalších, zejména funkčních studií, které objasní případný dopad na konstričně-dilatační schopnosti cévy.

7. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zhodnotit a porovnat expresi vybraných proteinů TGF- β signalizace endoglinu, TGF- β receptoru II a molekuly eNOS/peNOS v aortě transgenního kmene myši s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu (Sol-Eng⁺) a u transgenní skupiny myši s hladinou lidského solubilního endoglinu pod hranicí detekce, sloužící jako skupina kontrolní. Obě skupiny myši byly krmeny speciální dietou s vysokým obsahem tuku a cholesterolu, která (kromě hladin solubilního endoglinu) tvořila další rizikový faktor.

Výsledky biochemické analýzy ukázaly, že podání cholesterolové diety nevedlo k významným rozdílům v hladinách celkového cholesterolu mezi oběma skupinami myši. Skupiny se tedy lišily výhradně hladinou lidského solubilního endoglinu, která byla stanovena ELISA analýzou.

Pomocí analýzy Western blot byly získány informace o expresi vybraných proteinů. Měření prokázalo statisticky významný nárůst exprese molekuly endoglinu a receptoru TGF- β RII u sledované skupiny myši Sol-Eng⁺ oproti skupině kontrolní. Tento výsledek může naznačovat narušení TGF- β signalizace pod vlivem solubilního endoglinu v kombinaci s cholesterolovou dietou. Při srovnání obou skupin myši však výsledky statistického vyhodnocení eNOS a peNOS neukázaly významný rozdíl v expresi těchto molekul, výsledný vliv solubilního endoglinu na funkci endotelu tedy zatím nebyl potvrzen.

Z daných výsledků lze usuzovat, že zvýšená hladina lidského solubilního endoglinu výrazně neovlivňuje proteiny podílející se na regulaci vazodilatace a cévní homeostázy. Lze však poukázat na změny exprese molekul hrající roli při správném rozvoji cév, cévní remodelaci a kardiovaskulárním vývoji a jejich vlivu na TGF- β signální transdukcii. K objasnění skutečného dopadu na kontraktilitu aorty bude zapotřebí rozšířit tyto úvodní výsledky morfologie o studie funkčních parametrů cévy.

8. SEZNAM ZKRATEK

ALK-1	activin-like kináza-1
ALK-5	activin-like kináza-5
APS	peroxodisíran amonný (ammonium persulfate)
BCA	bicinchoniová metoda
BSA	bovinní sérový albumin
CD 105	endoglin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Co-Smad	společné Smad proteiny
CYT	cytoplazmatická doména
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	extracelulární doména
ELISA	enzymová metoda detekce antigenu
ENG	endoglin
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
GAPDH	glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenáza
GS	glycin/serin doména
HRP	křenová peroxidáza (horseradish peroxidase)
Hsp90	heat - shock proteiny
IgG	imunoglobulin G (protilátka)
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
I-Smad	inhibiční Smad proteiny

kDa	kilodalton
Milli-Q	redestilovaná voda
MMP-14	membránová matrix metaloproteináza
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
R-Smad	regulační Smad proteiny
RTG	rentgenové
sCD 105	solubilní endoglin
SDS	dodecylsírán sodný (sodiumdodecylsulfate)
SEM	střední chyba v průměru
sENG	solubilní endoglin
Smad	intracelulární signální protein
TBS	Tris-buffered saline
TEMED	N, N, N', N' – tetramethylethylendiamin
TGF- β RI (T β RI)	receptor typu I pro transformující růstový faktor beta
TGF- β RII (T β RII)	receptor typu II pro transformující růstový faktor beta
TGF- β RIII (T β RIII)	receptor typu III pro transformující růstový faktor beta (endoglin)
TGF- β	transformující růstový faktor
TM	transmembránová doména
ÚKBD	Ústav klinické biochemie a diagnostiky
ZP	zona pellucida

9. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Složení gelů

10. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Hladiny lidského solubilního endoglinu

Graf 2: Hladiny celkového cholesterolu

Graf 3: Western blot analýza exprese ENG

Graf 4: Western blot analýza exprese TGF- β RII

Graf 5: Western blot analýza exprese eNOS

Graf 6: Western blot analýza exprese peNOS

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Stavba stěny artérie

Obrázek 2: TGF- β signální dráha

Obrázek 3: Účast endoglinu na TGF- β signální transdukci

Obrázek 4: Struktura endoglinu

Obrázek 5: Vznik solubilního endoglinu z tkáňové formy

Obrázek 6: Základní kroky analýzy Western blot

Obrázek 7: Hmotnostní standard znázorňující škálu proteinových bandů

Obrázek 8: Foto RTG snímku – detekce GAPDH (30-40 kDa)

Obrázek 9: Foto RTG snímku – detekce ENG (100 kDa)

Obrázek 10: Foto RTG snímku – detekce TGF-BRII (70 kDa)

Obrázek 11: Foto RTG snímku – detekce eNOS (140 kDa)

Obrázek 12: Foto RTG snímku – detekce peNOS (140 kDa)

12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adam, P. J., Clesham, G. J. and Weissberg, P. L., 1998. Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 247 (1): 33-37.

Albert, M. A., Danielson, E., Rifai, N., Ridker, P. M., et al., 2001. Effect of statin therapy on C-reactive protein levels: the pravastatin inflammation/CRP evaluation (PRINCE): a randomized trial and cohort study. *JAMA.* 286 (1): 64-70.

Alheid, U., Frolich, J. C. and Forstermann, U., 1987. Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res.* 47 (5): 561-571.

Annes, J. P., Munger, J. S. and Rifkin, D. B., 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci.* 116 (2): 217-224.

Arndt, H., Smith, C. W. and Granger, D. N., 1993. Leukocyte-endothelial cell adhesion in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension.* 21 (5): 667-673.

Barbara, N. P., Wrana, J. L. and Letarte, M., 1999. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Biol Chem.* 274 (2): 584-594.

Bellon, T., Corbi, A., Lastres, P., Cales, C., et al., 1993. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor-beta-binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. *Eur J Immunol.* 23 (9): 2340-2345.

Bernabeu, C., Conley, B. A. and Vary, C. P., 2007. Novel biochemical pathways of enoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 102 (6): 1375-1388.

Birdsall, H. H., Green, D. M., Trial, J., Youker, K. A., et al., 1997. Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation.* 95 (3): 684-692.

Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., et al., 2008. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 197 (1): 264-270.

- Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., et al., 2005. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two components of the endothelial transforming growth factor-beta receptor complex. *J Cell Physiol.* 204 (2): 574-584.
- Blanco, F. J., Grande, M. T., Langa, C., Oujo, B., et al., 2008. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 103 (12): 1383-1392.
- Blann, A. D., Wang, J. M., Wilson, P. B. and Kumar, S., 1996. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 120 (1): 221-226.
- Blazquez-Medela, A. M., Garcia-Ortiz, L., Gomez-Marcos, M. A., Recio-Rodriguez, J. I., et al., 2010. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 8 (1): 86.
- Bobik, A., Agrotis, A., Kanellakis, P., Dilley, R., et al., 1999. Distinct patterns of transforming growth factor-beta isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF-beta in fibrofatty lesion development. *Circulation.* 99 (22): 2883-2891.
- Bobik, A., 2006. Transforming growth factor- β s and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26 (8): 1712-1720.
- Botella, L. M., Sanchez-Elsner, T., Sanz-Rodriguez, F., Kojima, S., et al., 2002. Transcriptional activation of endoglin and transforming growth factor-beta signaling components by cooperative interaction between Sp1 and KLF6: their potential role in the response to vascular injury. *Blood.* 100 (12): 4001-4010.
- Burrows, F. J., Derbyshire, E. J., Tazzari, P. L., Amlot, P., et al., 1995. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res.* 1 (12): 1623-1634.
- Celada, A. and Maki, R. A., 1992. Transforming growth factor-beta enhances the M-CSF and GM-CSF-stimulated proliferation of macrophages. *J Immunol.* 148 (4): 1102-1105.

- Cohn, J. N, Ferrari, R. and Sharpe, N., 2000. Cardiac remodeling – concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 35 (3): 569-582.
- Colman, R. W., Marder, V. J., Clowes, A. W., George, J. N., et al., 2006. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice.* 5. vyd. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1822 s. ISBN-13: 978-0-7817-4996-1. Kapitola 42: The vascular biology of nitric oxide and nitric oxide synthases. 653-666.
- Conley, B. A., Smith, J. D., Guerrero-Esteo, M. and Bernabeu, C., 2000. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 153 (2): 323-335.
- Corson, M. A., James, N. L., Latta, S. E., Nerem, R. M., et al., 1996. Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. *Circ Res.* 79 (5): 984-991.
- Cui, S., Lu, S. Z., Chen, Y. D., He, G. X., et al., 2008. Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl).* 121 (2): 128-132.
- Deten, A., Holzl, A., Leicht, M., Barth, W., et al., 2001. Changes in extracellular matrix and in transforming growth factor beta isoforms after coronary artery ligation in rats. *J Moll Cell Cardiol.* 33 (6): 1191-1207.
- Diez-Marques, L., Ortega-Velazquez, R., Langa, C., Rodriguez-Barbero, A., et al., 2002. Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochem Biophys Acta.* 1587 (1): 36-44.
- Docherty, N. G., Lopez-Novoa, J. M., Arevalo, M., Duwel, A., et al., 2006. Endoglin regulates renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 21 (8): 2106-2119.
- Dore, J. J., Edens, M., Garamszegi, N. and Leof, E. B., 1998. Heteromeric and homomeric transforming growth factor-beta receptors show distinct signaling and endocytic responses in epithelial cells. *J Biol Chem.* 273 (48): 31770-31777.

- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M. and Kumar, S., 2003. CD 105 is important for angiogenesis: Evidence and potential applications. *FASEB J.* 17 (9): 984-992.
- Fava, R. A., Olsen, N. J., Postlethwaite, A. E., Broadley, K. N., et al., 1991. Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J Exp Med.* 173 (5): 1121-1132.
- Forstermann, U., Mulsch, A., Bohme, E. and Busse, R., 1986. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res.* 58 (4): 531-538.
- Forstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., et al., 1994. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23 (6): 1121-1131.
- Forstermann, U. and Munzel, T., 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation.* 113 (13): 1708-1714.
- Forstermann, U. and Sessa, W. C., 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33 (7): 829-837.
- Frangiannis, N. G., Ren, G., Dewald, O., Zymek, P., et al., 2005. Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation.* 111 (22): 2935-2942.
- Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288 (5789): 373-376.
- Gorelik, L. and Flavell, R. A., 2000. Abrogation of TGF-beta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity.* 12 (2): 171-181.
- Gougos, A. and Letarte, M., 1990. Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J Biol Chem.* 265 (15): 8361-8364.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., et al., 2002. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 21 (7): 1743-1753.

- Goumans, M. J., Lebrin, F. and Valdimarsdottir, G., 2003. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- β receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* 13 (7): 301-307.
- Grainger, D. J., 2004. Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 (3): 399-404.
- Grainger, D. J., 2007. TGF-beta and atherosclerosis in man. *Cardiovasc Res.* 74 (2): 213-222.
- Hawinkels, L. J., Kuiper, P., Wiercinska, E., Verspaget, H. W., et al., 2010. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP) – mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 70 (10): 4141-4150.
- Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., et al., 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 267 (27): 19027-19030.
- Chen, K., Mehta, J. L., Li, D., Joseph, L., et al., 2004. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circ Res.* 95 (12): 1167–1173.
- Ikemoto, T., Hojo, Y., Kondo, H., Takahashi, N., et al., 2012. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels.* 27 (4): 344-351.
- Ikeuchi, M., Tsutsui, H., Shiomi, T., Metsusaka, H., et al., 2004. Inhibition of TGF-beta signaling exacerbates early cardiac dysfunction but prevents late remodeling after infarction. *Cardiovasc Res.* 64 (3): 526-535.
- Jenkins, G., 2008. The role of proteases in transforming growth factor-beta activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 40 (6-7): 1068-1078.
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carron, R., et al., 2004. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 18 (3): 609-611.
- Kapur, N. K., Heffernan, K. S., Yunis, A. A., Parpos, P., et al., 2010. Usefulness of soluble endoglin as a non-invasive measure of left ventricular filling pressure in heart failure. *Am J Cardiol.* 106 (12): 1770-1776.

- Kapur, N. K., Wilson, S., Yunis, A., Qiao, X., et al., 2012. Reduced endoglin activity limits cardiac fibrosis and improves survival in heart failure. *Circulation*. 125 (22): 2728-2738.
- Kapur, N. K., Morine, K. J. and Letarte, M., 2013. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag*. 9 (1): 195-206.
- Karásek, D., Vaverková, H., Halenka, M., Hutyra, M., et al., 2004. Endoteliální dysfunkce, možnosti její detekce a využití v klinické praxi. *Interní medicína pro praxi*. 6 (9): 450-453. ISSN 1212-7299.
- Karetová, D., 2002. Význam endotelu pro rozvoj kardiovaskulárních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 4 (3): 119-122. ISSN 1212-7299.
- Khan, B. V., Harrison, D. G., Olbrych, M. T., Alexander, R. W., et al., 1996. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93(17): 9114-9119.
- Koleva, R. I., Conley, B. A., Romero, D., Riley, K.S., et al., 2006. Endoglin structure and function: determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem*. 281 (35): 25110–25123.
- Konrádová, V., Uhlík, J. and Vajner, L., 2000. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: Nakladatelství H&H Vyšehradská, s.r.o. 291 s. ISBN 80-86022-80-3. Kapitola: Kardiovaskulární systém. 115-122.
- Lastres, P., Bellon, T., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., et al., 1992. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. *Eur J Immunol*. 22 (2): 393-397.
- Lastres, P., Martin-Perez, J., Langa, C. and Bernabéu, C., 1994. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. *Biochem J*. 301 (3): 765–768.
- Lastres, P., Letamendia, A., Zhang, H., Rius, C., et al., 1996. Endoglin modulates cellular responses to TGF-beta 1. *J Cell Biol*. 133 (5): 1109-1121.

- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., et al., 2004. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 23 (20): 4018-4028.
- Lebrin, F., Deckers, M., Bertolino, P. and Ten Dijke P., 2005. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 65(3): 599 –608.
- Lefler, A. M., Tsao, P., Aoki, N. and Palladino Jr M. A., 1990. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science.* 249 (4964): 61-64.
- Li, H. and Forstermann, U., 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 190 (3): 244-254.
- Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Kumar, P., et al., 2000. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 14 (1): 55-64.
- Lijnen, P. J., Petrov, V. V. and Fagard, R. H., 2000. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab.* 71 (1-2): 418-435.
- Llorca, O., Trujillo, A., Blanco, F. J. and Bernabeu, C., 2007. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 365 (3): 694-705.
- Lopez-Novoa, J. M. and Bernabeu, C., 2010. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 299 (4): 959-974.
- Lullmann-Rauch, R., 2012. *Histologie.* 3. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 576 s. ISBN 978-80-247-3729-4. Kapitola 11: Krevní a lymfatické cévy, srdce. 211-224.
- Mahmood, T. and Yang, P-C., 2012. Western blot: Technique, theory and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 4 (9): 429-434.
- Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67: 753-791.
- Massague, J. and Gomis, R. R., 2006. The logic of TGFβ signaling. *FEBS Lett.* 580 (12): 2811-2820.

- Merkunová, A. and Orel, M., 2008. *Anatomie a fyziologie člověka*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 302 s. ISBN 978-80-247-1521-6. Kapitola 4: Oběhová soustava. 71-114.
- Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T., Furuya, T., et al., 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*. 7(12): 1191-1204.
- Nachtigal, P., Zemankova Vecerova, L., Rathouska, J. and Strasky, Z., 2012. The role of endogline in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 224 (1): 4-11.
- Nakaki, T., Nakayama, M. and Kato, R., 1990. Inhibition by nitric oxide and nitric oxide-producing vasodilators of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 189 (6): 347-353.
- Nathan, C. F. and Hibbs, 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 3 (1): 65-70.
- Nemeckova, I., Serwaczak, A., Oujó, B., Jezkova, K., et al., 2015. High soluble endoglin levels do not induce endothelial dysfunction in mouse aorta. *PLoS One*. 10 (3): e0119665.
- Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J., Pfeffer, M. A., et al., 2006. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet*. 367 (9507): 356-367.
- Pepper, M. S., 1997. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 8 (1): 21-43.
- Piek, E., Heldin, C. H. and Ten Dijke, P., 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB*. 13(15): 2105-2124.
- Rapoport, R. M., Draznin, M. B. and Murad, F., 1983. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. 306 (5939): 174-176 .
- Rathouska, J., Vecerova, L., Strasky, Z., Slanarova, M., et al., 2011. Endoglin as a possible marker of atorvastatin treatment benefit in atherosclerosis. *Pharmacol Res*. 64 (1): 53-59.

- Rathouska, J., Jezkova, K., Nemeckova, I. And Nachtigal, P., 2015. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis*. 243 (2): 383-388.
- Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., et al., 1998. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*. 101 (4): 731-736.
- Sanchez-Elsner, T., Botella, L. M., Velasco, B., Langa, C., et al., 2002. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor-beta pathways. *J Biol Chem*. 277 (46): 43799-43808.
- Santibanez, J. F., Letamendia, A., Perez-Barriocanal, F., Silvestri, C., et al., 2007. Endoglin increase eNOS expression by modulating Smad2 protein levels and Smad2-dependent TGF-beta signaling. *J Cell Physiol*. 210 (2): 456-468.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., et al., 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. 359 (6397): 693-699.
- Southan, G. J. and Szabo, C., 1996. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. *Biochem Pharmacol*. 51 (4): 383-94.
- Strasky, Z., Vecerova, L., Rathouska, J., Slanarova, M., et al., 2011. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J*. 75 (7): 1747-1755.
- Ten Dijke, O. and Hill, C. S., 2004. New insights into TGF- β -Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. 29 (5): 265-273.
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J. and Pardali, E., 2008. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis*. 11 (1): 79-89.
- Toporisian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., et al., 2005. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res*. 96 (6): 684-92.
- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V. and Kittnar, O., 2003. *Lékařská fyziologie*. 4. vyd. Praha: Grada Publishing, a.s. 772 s. ISBN 80-247-0512-5. Kapitola 6: Fyziologie oběhu krve a lymfy. 184-186.

- Valbuena-Diez, A. C., Blanco, F. J., Oujo, B., Gonzalez-Nunez, M. et al., 2012. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 126 (22): 2612-2624.
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Tang, E. and Feletou, M., 2009. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol*. 196 (2): 193-222.
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C. and Hanai, J., et al., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 12 (6): 642-649.
- Walshe, T. E., Saint-Geniez, M., Maharaj, A. S., Sekivama, E., et al., 2009. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS One*. 4 (4): e5149.
- Wang, X. L., Liu, S-X. and Wilcken, D. E. L., 1997. Circulating transforming growth factor β 1 and coronary artery disease. *Cardiovasc Res*. 34 (2): 404-410.
- Werner, F., Jain, M. K., Feinberg, M. W., Sibinga, N. E., et al., 2000. Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3. *J Biol Chem*. 275 (47): 36653-36658.
- Wever, R. M., Luscher, T. K., Consentino, F. and Rabelink, T. J., 1998. Atherosclerosis and two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 97 (1): 108-112.
- Wieser, R., Wrana, J. L. and Massague, J., 1995. GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *EMBO J*. 14 (10): 2199-2208.
- Wong, J. M. and Billiar, T. R., 1994. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharmacol*. 34 (1): 155-170.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., et al., 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*. 370 (6488): 341-347.
- Yanavitski, M. and Givertz, M. M., 2011. Novel biomarkers in acute heart failure. *Curr Heart Fail Rep*. 8 (3): 206-11.