

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Vliv dlouhodobého působení solubilního endoglinu na
signalizaci membránového endoglinu v myší aortě**

Petra Doležálková

Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Poděkování

„Touto cestou bych velice ráda poděkovala panu prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a drahocenný čas, který věnoval vedením této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Vitverové za velkou trpělivost, obětovaný čas a ochotnou pomoc s experimentální částí práce. Upřímné slovo „děkuji“ patří mé rodině, která mi byla nesmírnou oporou po celou dobu mého studia.“

Prohlášení

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

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Autor: Petra Doležálková

Vedoucí práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Diplomová práce

Vliv dlouhodobého působení solubilního endoglinu na signalizaci membránového endoglinu v myší aortě.

Cíl práce: Cílem práce bylo sledovat a vyhodnotit vliv dlouhodobého (12měsíčního) působení vysokých hladin solubilního endoglinu na signalizaci membránového endoglinu v myší aortě. Tedy sledovat a porovnat expresi proteinů endoglin, eNOS, pSmad2/3 mezi kontrolní a testovanou Sol-Eng⁺ skupinou myší.

Metody: Pro tuto práci byly použity dvě skupiny myší starých 12 měsíců navzájem se lišící hladinou lidského solubilního endoglinu. Obě skupiny pocházely ze stejné linie transgenního myšičího kmene CBAxC57BL/6J a byly krmeny běžnou laboratorní dietou. Pro stanovení a porovnání exprese jednotlivých proteinů endoglin, eNOS a pSmad2/3 byla použita metoda Western blot. Koncentrace lidského solubilního endoglinu a solubilní formy molekuly VCAM-1 byla vyhodnocena analýzou ELISA. Celkové hladiny cholesterolu a triacylglycerolů v plazmě byly určeny biochemickou analýzou.

Výsledky: Western blot analýza nezaznamenala statisticky významné rozdíly v expresi membránového endoglinu, enzymu eNOS a pSmad2/3 v aortě mezi kontrolní a testovanou Sol-Eng⁺ skupinou. Také ELISA analýza neukázala žádné signifikantní rozdíly v hladině molekuly sVCAM a stejně tak biochemická analýza nezaznamenala statisticky významné rozdíly hladin cholesterolu a TAG mezi kontrolní a testovanou skupinou.

Závěr: Práci jsme ukázali, že vysoká hladina solubilního endoglinu v plazmě nemá za následek narušení funkčnosti endotelu u Sol-Eng⁺ myši starých 12 měsíců. U těchto myši nedošlo ke změně v endoglin/Smad2/3/eNOS signalizaci.

Klíčová slova: krevní cévy, endotel, endotelová dysfunkce, endoglin, solubilní endoglin, Western blot

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Author: Petra Doležálková

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Diploma Thesis

Soluble endoglin effects on membrane endoglin signaling in mouse aorta.

Background: The aim of this study was to observe and evaluate the influence of the long-term (12 months) effect of high levels of soluble endoglin on membrane endoglin signalization in the mouse aorta. Specifically, we observed and compared the expression of proteins endoglin, eNOS, and pSmad2/3 in control and a test Sol-Eng⁺ group of mice.

Methods: Two groups of 12-months-old mice with a difference in the level of soluble endoglin were used in this study. Both groups were originated in the same line of transgenic mouse strain CBAx57BL/6J and fed with ordinary laboratory diet. Western blot technique was used to analyse the expression of individual proteins endoglin, eNOS, and pSmad2/3. The concentration of human soluble endoglin and soluble form of VCAM-1 molecule was evaluated by ELISA analysis. Total cholesterol levels and triglycerides in the plasma were detected by biochemical analysis.

Results: Western Blot analysis showed no statistically significant differences in the expression of the membrane endoglin, eNOS enzyme and pSmad2/3 in the aorta between control and test Sol-Eng⁺ group. ELISA analysis also showed no significant differences in level of sVCAM-1 molecule and biochemical analysis showed no statistically significant differences in cholesterol and TAG levels between control and test group as well.

Conclusions: We showed that a high level of soluble endoglin in the plasma does not negatively affect the function of the endothelium in 12-months-old Sol-Eng⁺ mice. No alteration appeared in the endoglin/Smad2/3/eNOs signalization in these mice.

Keywords: blood vessels, endothelium, endothelial dysfunction, endoglin, soluble endoglin, Western blot

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST

1	Úvod.....	10
2	Histologie cév	11
2.1	Obecná stavba cév	11
2.1.1	Tunica intima	11
2.1.2	Tunica media.....	12
2.1.3	Tunica adventitia.....	12
2.2	Specifická stavba cév.....	12
2.2.1	Tepny	12
2.2.2	Žíly.....	13
2.2.3	Kapiláry	14
3	Endotel a jeho fyziologická funkce.....	15
4	Endotelová dysfunkce	20
4.1	NO a oxidační stres.....	20
4.2	Asymetrický dimethylarginin.....	21
4.3	Angiotenzin II, hypertenze	21
4.4	Hypercholesterolémie, ateroskleróza.....	21
4.5	Hyperglykémie	22
5	Endoglin	23
5.1	Struktura.....	23
5.2	Exprese	24
5.3	Regulační funkce	25
5.4	Endoglin/Smad/eNOS signalizace v cévním systému	28
6	Solubilní endoglin	29
6.1	Tvorba solubilního endoglinu a jeho vztah k dysfunkci endotelu.....	29
7	Myší modely aterosklerózy	31
7.1	Apolipoprotein E deficientní (ApoE -/-) myši	32
7.2	LDL receptor-deficientní (LDLr -/-) myši.....	33
7.3	ApoE/LDL receptor double knockout myši	33

7.4	ApoE-Cys142 a ApoE-Leiden	33
7.5	Myší model s vysokými hladinami solubilního endoglinu.....	34
8	Western blot.....	34
8.1	Gelová elektroforéza	35
8.2	Blotování	35
8.3	Blokace, nanesení protilátek a detekce	36
9	Cíl práce, zadání práce	37
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		
10	Použitá zvířata a metody.....	38
10.1	Zvířata a etické principy	38
10.2	Analýza Western blot	38
10.2.1	Příprava vzorků	38
10.2.2	Příprava gelu na elektroforézu, aplikace vzorků na gel	39
10.2.3	Gelová elektroforéza	43
10.2.4	Blotování (elektroforetický transfer)	44
10.2.5	Blokace, nanesení protilátek a detekce	45
10.3	ELISA	49
10.4	Biochemická analýza	49
10.5	Statistická analýza	50
11	Výsledky	50
11.1	Western blot analýza	50
11.2	ELISA	54
11.3	Biochemická analýza	56
11.4	Váha.....	58
12	Diskuze	59
13	Závěr	61
14	Seznam obrázků.....	62
15	Seznam tabulek	62
16	Seznam grafů	62
17	Seznam zkratk.....	63
18	Seznam použité literatury	66

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

Endotel se vyznačuje řadou fyziologických funkcí, které zabezpečují ochranu krevních cév. Jeho úlohou je udržovat tyto funkce v rovnovážném stavu, a pokud dojde k narušení takové rovnováhy, rozvíjí se endotelová dysfunkce. Oxid dusnatý je hlavním relaxačním produktem endotelových buněk, který vedle vazodilatace ovlivňuje další fyziologické procesy související s inhibicí zánětlivých reakcí a protrombogenních stavů. Je syntetizován enzymem endogenní NO syntázou (eNOS) a endotelové buňky jsou hlavním místem exprese takového enzymu (1).

Endotelová dysfunkce je charakteristická sníženou dostupností molekuly NO v důsledku nízké aktivity enzymu eNOS či z důvodu interakce NO s reaktivními molekulami kyslíku (ROS). Hraje důležitou roli v patogenezi chronického zánětlivého onemocnění cév, aterosklerózy, ve které hyperlipidémie a hyperglykémie jsou nejvýznamnějšími kardiovaskulárními faktory zodpovědnými za rozvoj a progresi aterosklerotických lézí (1).

Endoglin představuje transmembránový glykoprotein, který zaujímá významné postavení jako pomocný receptor rodiny TGF- β (transformujících růstových faktorů β). Hlavním místem exprese tohoto proteinu jsou endotelové buňky a exprese je zahájena různými patologickými procesy, jako hypoxie či přímé poškození cév. Je důležitý pro proces angiogeneze a je také důležitou komponentou eNOS aktivačního komplexu. Mimo to stimuluje expresi eNOS regulací signálních drah, konkrétně přes Smad2/3 transkripční faktory (2).

N-terminální část membránového endoglinu může být uvolněna do cirkulace za vzniku solubilní formy. Ta působí opačným účinkem v porovnání s membránovou formou a zaujímá postavení antagonisty TGF- β signálních drah. Vysoké hladiny solubilního endoglinu byly pozorovány u mnoha patologických procesů, jako například preeklampsie, ateroskleróza, onemocnění koronárních tepen, diabetes mellitus II typu či hypertenze (2).

2 Histologie cév

Kardiovaskulární systém hraje důležitou roli v přísunu živin a kyslíku tkáním, stejně tak zajišťuje odvod oxidu uhličitého a ostatních zplodin metabolismu (3). Takový systém je tvořen soustavou krevních cév, v nichž je oběh krve uskutečněn činností srdce, tedy svalového orgánu, který pracuje jako pumpa a jehož úkolem je vhnět krev do cévní soustavy (4).

Krevní cévy můžeme rozdělit do tří základních kategorií: tepny, žíly a kapiláry. Tepny se větví do menších a menších cév a distribuují krev směrem ze srdce spolu s živinami a kyslíkem. Kapiláry se skládají z velmi tenkých trubic a společně vytváří difúzní síť, která realizuje látkovou výměnu plynů, živin, zplodin metabolismu, hormonů a signálních substancí mezi krví a okolní tkání. A konečně žíly, které pak přivádí krev zpět do srdce (5,6).

2.1 Obecná stavba cév

Mezi základní vrstvy tvořící stěnu krevních cév patří tunica intima, tunica media a tunica adventitia (6).

2.1.1 Tunica intima

Tunica intima, kterou také někdy označujeme jako tunica interna, je vnitřní vrstvou cévní stěny. Povrch, který směřuje do cévního lumen, pokrývá jednoduchý dlaždicový epitel, známý pod pojmem endotel, jehož endotelové buňky nasedají na basální laminu představující spojující článek mezi epitelovou a pojivovou tkání. K endotelu těsně přiléhá subendotelová vrstva, která obsahuje pojivovou tkáň a hladké svalové buňky a jejich vzájemné uspořádání je v této vrstvě longitudinální, tedy podélné (5–7).

Vrstva elastických vláken, která vytváří rozhraní mezi intimou a medií, se nazývá lamina elastica interna. Můžeme ji pozorovat u velkých tepen, to především svalového typu, a její hlavní obsahovou složkou je elastin. Objevujeme zde mezery, fenestrace, zabezpečující výživu buněk uložených hluboko v cévní stěně (5–7).

2.1.2 Tunica media

Tunica media zaujímá střední část cévní stěny. Tvoří ji koncentrické vrstvy šroubovitě uspořádaných hladkých svalových buněk, mezi nimiž najdeme elastická a kolagenní vlákna typu III spolu s proteoglykany. Ve stavbě velkých cév, zejména u velkých svalových tepen, je tunica media vymezena od tuniky adventitie elastickou membránou, kterou známe pod názvem lamina elastica externa (5,6).

2.1.3 Tunica adventitia

Zevní vrstva cévní stěny neboli tunica externa, která obsahuje podélně uložená elastická a kolagenní vlákna, převážně s kolagenem typu I, je důležitá pro upevnění cévy v okolní tkáni (5–7).

Vasa vasorum

Pojem vasa vasorum představuje struktury zajišťující výživu velkých cév. Doslovně se jedná o cévy cév a jejich hlavním úkolem je zásobovat střední a vnější vrstvu potřebnými metabolity, jelikož pouhá difúze látek z cévního lumen je u těchto cév nedostačující. U tepen zasahují do oblasti adventitie, avšak u žil mohou dosahovat až na úroveň medie. Jelikož se žilní krev vyznačuje nízkým obsahem kyslíku a samotných živin, cévy cév nacházíme především u žilních struktur (4,5).

2.2 Specifická stavba cév

Složitost ve stavbě cévní stěny stoupá s rostoucí velikostí cév, a to od nejjednoduššího složení kapilár až po velké cévy (4).

2.2.1 Tepny

Tepny dělíme podle velikosti na tepénky (arterioly), tepny svalového typu (tepny s malým až středním průměrem) a tepny elastického typu (tepny s velkým průměrem). Pro všechny je charakteristická převládající mohutnost střední vrstvy (4).

Tepénky (arterioly)

Průměr takových krevních cév je obvykle menší než 0,5 mm. Tunica intima je tvořena endotelovými buňkami s velmi slabou subendotelovou vrstvou a laminu elasticu internu spatříme pouze u těch největších tepének. Až dvě cirkulárně uspořádané vrstvy

hladkých svalových buněk vytváří střední vrstvu a poslední vrstva tunica adventitia je u těchto cév velice tenká (5).

Tepny svalového typu

Jedná se o distribuční větve elastických tepen (8). Jejich společným znakem je rozsáhlá střední vrstva (tunica media), která obsahuje až 40 cirkulárně uspořádaných vrstev hladkých svalových buněk. Podle narůstající velikosti cév zde nacházíme i různé množství elastických vláken (5,8). Jako další charakteristiku můžeme uvést zřetelnou laminu elasticu internu s fenestracemi, která zabezpečuje difúzi různých látek (4,9).

Tepny elastického typu

Hlavními zástupci jsou aorta a plicní tepny (7). Oproti tepen svalového typu se elastické tepny vyznačují vysokým obsahem elastinu a širší vrstvou tuniky intimy s výraznou subendotelovou vrstvou (5,8). Tunica media obsahuje četné množství koncentricky uspořádaných elastických a současně fenestrováných lamel, kde prostory mezi nimi jsou vyplněny fibroblasty, hladkými svalovými buňkami a kolagenními vlákny (4). Tunica adventitia je tenká a nacházíme zde značné množství vasa vasorum (4,9).

2.2.2 Žíly

Dle průměru a tloušťky stěny rozdělujeme žíly do tří skupin: malé (venuly), střední a velké (6). Výrazně zúžená cévní stěna a vyšší kapacita cévního lumen jsou hlavními charakteristikami, které odlišují stavbu žil od stavby tepen odpovídající velikosti. Stejně jako u tepen, tak i ve struktuře žilní stěny nacházíme 3 základní vrstvy: tunica intima, tunica media a tunica adventitia (6,9).

U malých až středních žil je tunica intima velmi tenká, pouze u žil většího průměru je tato vrstva dobře vyvinutá (5).

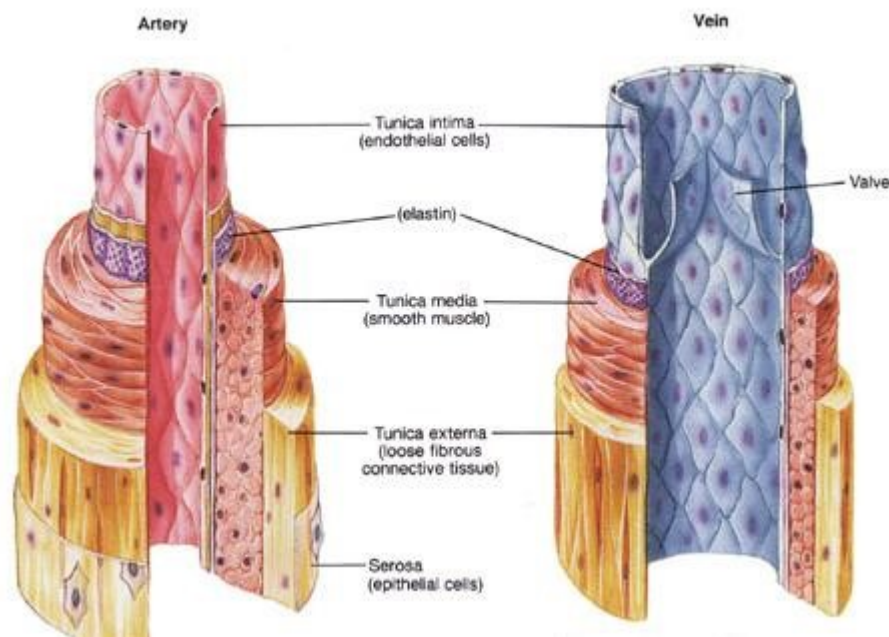
Tunica media je výrazně tenčí v porovnání se střední vrstvou tepen a nacházíme zde jen svazky hladkých svalových buněk (5,9).

Tunica adventitia představuje nejširší vrstvu a zejména u těch největších žil nacházíme longitudinálně uspořádaná svalová vlákna (5,9).

Pro malé a střední žíly jsou typické specifické útvary, které zabezpečují jednosměrný tok krve směrem k srdci a současně zamezují její návrat. Mluvíme o žilních chlopních a pozorujeme je zejména u žil v oblasti končetin. Takové útvary jsou tvořeny ze dvou naproti sobě a do lumen cévy vyčnívajícími záhyby tuniky intimy. Strukturu chlopni posilují kolagenní a elastická vlákna a na jejich povrchu nacházíme vrstvu endotelových buněk (5,6,9).

Obrázek 1: Porovnání stavby tepen a žil

Tunica intima je tvořena jednovrstevným dlaždicovým epitelem, zvaný endotel. Tunica media zaujímá střední část cévní stěny a výrazně vyniká ve stavbě tepen. Tunica adventitia je nejširší vrstvou ve stěně velkých žil. Ty se vyznačují vyšší kapacitou cévního lumen a tenčí cévní stěnou, pokud je porovnáme se stavbou tepen odpovídající velikosti. Navíc obsahují specifické struktury, žilní chlopně.



Zdroj: <http://www.kardiosystem.websnadno.cz/Cevy.html> [1. únor 2019]

2.2.3 Kapiláry

Tyto velmi tenké krevní cévy s průměrem v rozmezí 7 až 9 mikrometrů jsou tvořeny jedinou vrstvou endotelových buněk nasedajících na bazální laminu (5,8). U kapilár se setkáváme se specifickým typem mezenchymových buněk s dlouhými výběžky

a s vlastní bazální laminou, které z části obklopují endotelové buňky. Mluvíme o pericytech a v jejich struktuře najdeme tropomyosin, isomyosin a proteinové kinázy. Díky tomu se pericyty vyznačují vlastní kontraktilní schopností, tudíž mohou regulovat průtok krve kapilárami. Další významnou vlastností takových buněk je jejich schopnost proliferace a diferenciací (5,6,8,9). Kapiláry dělíme do čtyř skupin:

Prvním typem jsou souvislé kapiláry, které nacházíme ve svalech, mozku či nervech. Neobsahují žádné fenestrace, zato jsou bohaté na přítomnost vezikul zabezpečující obousměrný průchod mnoha molekul (5,6,8).

Dalším typem jsou fenestrované kapiláry s uzavřenými póry. Ty se vyznačují vysokým obsahem fenestrací, které jsou navíc pokryty tenkou membránou, diafragmou. Najdeme je v místech s potřebou rychlé výměny látek mezi krví a tkáněmi, jako např. střeva či endokrinní žlázy (5,6).

Jim podobné fenestrované kapiláry s otevřenými póry, které nejsou překryté diafragmou, jsou pak typické pro glomerulus (5,6).

Posledním typem jsou sinusoidní kapiláry s nesouvislou endotelovou výstelkou a nesouvislou bazální laminou. Hlavní charakteristikou jsou rozsáhlé fenestrace bez diafragmy. Takové kapiláry nacházíme v kostní dřeni, lymfatických orgánech, játrech či slinivce (5,6,8).

3 Endotel a jeho fyziologická funkce

Endotel představuje souvislou jednovrstevnou výstelku vyskytující se u všech typů cév lidského těla, které zahrnují jak krevní, tak i lymfatické cévy. Bazální lamina plní funkci pevného lešení a kotví tvarově protažené a úzké endotelové buňky (EB). Tyto dynamické útvary uvolňují řadu rozmanitých substancí, které ovlivňují důležité fyziologické procesy lidského těla (10,11).

EB syntetizují všechny proteiny tvořící bazální laminu, a příslušné enzymy, které naopak zajišťují její rozrušení. Tato vlastnost je velmi důležitá pro proces novotvorby krevních cév, angiogenezi, která je jednou z mnoha funkcí, kde endotel hraje významnou roli (10). Mezi takový angiogenní produkt endotelových buněk patří vaskulární

endoteliální růstový faktor (VEGF), který se váže na VEGF-receptory představující rodinu tyrozin kinázových receptorů. Po navázání ligandu se spouští signalizační kaskáda, čímž dochází k regulaci proliferace, migrace a diferenciaci buněk (11,12).

Endotel je nepostradatelným článkem v procesu hemostázy, koordinuje trombózu a trombolýzu, a jako odpověď na poškození tkáně participuje při rozvoji zánětlivých a imunitních reakcí (13,14). Je také vysoce selektivní bariérou, která reguluje přestup malých a velkých molekul, a dokonce i celých buněčných struktur. Jako například přestup leukocytů, kdy sekrecí adhezních molekul zajistí jejich přilnutí k endotelu. Mluvíme o P-selektinu a E-selektinu, ICAM-1 (intracelulární adhezní molekula 1) a VCAM (vaskulární buněčná adhezní molekula) (11,15).

Stejně tak je důležitý pro usměrňování napětí cévní stěny a proudění krve produkcí vazoaktivních molekul. Oxid dusnatý (NO) a prostacyklin (PGI₂) jsou významnými vazodilatačními substancemi a vedou k relaxaci cévní stěny. Naproti tomu tromboxan (TXA₂) a endotelin-1 (ET-1) působí jako vazokonstrikční látky, které cílí ke stahu svalových vláken (13,14,16).

Oxid dusnatý (NO)

Hlavním relaxačním faktorem hladkého svalstva cévní stěny je oxid dusnatý (NO). Vyznačuje se řadou vlastností, které zabezpečují ochranu krevních cév. Takovými vlastnostmi jsou inhibice buněčné adheze, inhibice destičkové agregace a inhibice migrace hladkých svalových buněk. Také zamezuje oxidační přeměnu LDL částic (17,18).

Vzniká působením enzymu NO syntázy (NOS = nitric oxide synthase, syntáza oxidu dusnatého), který katalyzuje přeměnu aminokyseliny L-argininu právě na NO (16). N-terminální oxygenázová a C-terminální reduktázová doména tvoří dimerní strukturu enzymu a obsahují specifická vazebná místa pro substrát L-arginin, důležité kofaktory tetrahydrobiopterin (BH₄), flavinmononukleotid (FMN), flavinadenindinukleotid (FAD) a nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a pro protein kalmodulin (13,19).

Dnes známe tři izoformy takového enzymu: neuronální (nNOS), indukovatelná (iNOS) a endotelová NO syntáza (eNOS). Všechny formy podporují relaxaci hladkého svalstva cév a jejich výslednou vazodilataci. Indukovatelná NOS je exprimována buňkami při zánětlivých procesech, neuronální NOS je důležitá pro synaptickou neurotransmisi a

konečně endotelová NO syntáza, která je z převážné části exprimována endotelovými buňkami. Endotelová NO syntáza je hlavním enzymem, který zabezpečuje tvorbu NO v endotelu cév a tím NO zprostředkovanou vazodilataci (16,20).

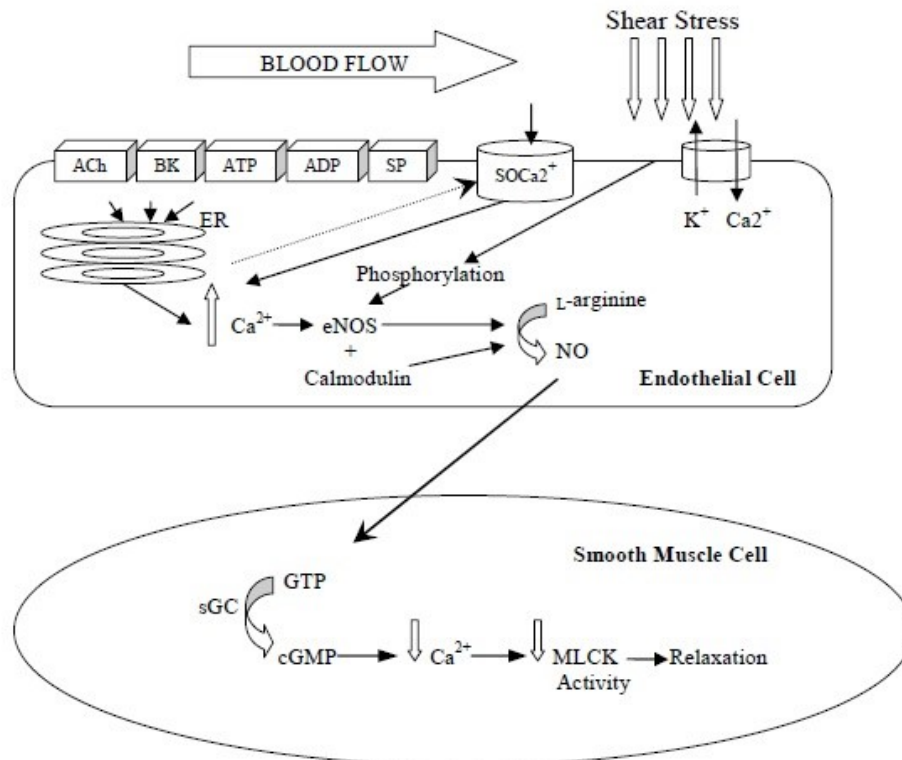
Neaktivní formu eNOS nacházíme v membránových váčcích, které nazýváme kaveoly. V nich je enzym vázán na protein kaveolin-1 a takovou vazbou je zabezpečena inaktivní podoba enzymu (13,21). NO agonisté, jako bradykinin, acetylcholin, adenosintrifosfát, adenosindifosfát, substance P a trombin, podporují vyplavení vápenatých iontů z endoplazmatického retikula, a právě zvýšená koncentrace Ca^{2+} uvnitř buňky umožní tvorbu komplexu Ca^{2+} /kalmodulin. Ten následně naruší interakci mezi eNOS a kaveolinem-1, čímž podpoří aktivitu enzymu (16,21). Se zvýšenou hladinou Ca^{2+} souvisí také konformační změna kalmodulinu, který se následně váže na eNOS, enzym aktivuje a umožní přeměnu substrátu L-argininu na NO. Vzniklý NO následně difunduje do hladké svalové buňky a způsobí její relaxaci (Obrázek 2) (16,18).

Protein kalmodulin může rovněž aktivovat CAM kinázu II a přes ní fosforylovat eNOS (22). Právě fosforylace je dalším mechanismem vedoucím k aktivaci enzymu a taková reakce je uskutečněna enzymy skupiny proteinkináz. Fosforylace serinového zbytku (Ser1177) eNOS má za následek zvýšený proud elektronů přes reduktázovou doménu, zvýšenou citlivost enzymu k Ca^{2+} iontům a jeho následnou aktivaci. Naopak fosforylace threoninového zbytku (Thr495) aktivitu enzymu inhibuje (20,21).

Smykové tření, které vzniká vlivem zvýšeného proudu krve, aktivuje eNOS jak fosforylací, tak zvýšenou koncentrací Ca^{2+} přes Ca^{2+} aktivované K^+ kanály (Obrázek 2) (16). Také protein Hsp90 interakcí a navázáním na enzym eNOS významně posiluje jeho aktivitu tím, že zesiluje afinitu kalmodulinu k eNOS a také redukuje inhibiční účinek kaveolinu-1 přes komplex Ca^{2+} /kalmodulin (21).

Obrázek 2: Syntéza NO a relaxace hladké svalové buňky

NO agonisté: Ach (acetylcholin), BK (bradykinin), ATP (adenosintrifosfát), ADP (adenosindifosfát), SP (substance P) stimulují vyplavení Ca^{2+} iontů z ER (endoplazmatické retikulum). $SOCa^{2+}$ kanály propouštějí extracelulární Ca^{2+} do buňky, jestliže jsou zásoby z ER vyčerpány. Smykové tření (shear stress) zvyšuje jak hladinu Ca^{2+} , tak enzym aktivuje fosforylací. Vlivem zvýšené hladiny Ca^{2+} se protein kalmodulin váže na eNOS.



Výše popsanými mechanismy dochází k aktivaci endotelové NO syntázy (eNOS), která katalyzuje přeměnu L-argininu na NO a vzniklý NO následně difúzí proniká do hladké svalové buňky. Zde se váže na solubilní guanylátcyklázu (sGC), která zajistí přeměnu guanosintrifosfátu (GTP) na cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Sníží se koncentrace Ca^{2+} iontů a klesá aktivita lehkého řetězce myosinu (MLCK). Výsledkem je relaxace hladké svalové buňky.

Zdroj: (16)

Endotelin-1

V lidském těle nacházíme 3 základní formy endotelinu (ET-1, ET-2 a ET-3), avšak cévní endotel uvolňuje pouze endotelin-1 (ET-1). Zánětlivé mediátory, například interleukiny nebo TNF-2, stimulují produkci ET-1 a naopak NO a PGI₂ jeho produkci snižují (16). Známe tři typy receptorů pro ET-1. ET_A a ET_{B2} receptory najdeme v hladké svalovině cév, kdy navázáním ET-1 se zvýší koncentrace Ca²⁺ uvnitř svalové buňky a výsledným efektem je kontrakce hladkého svalstva cév. Naproti tomu ET_{B1} receptory jsou umístěny v endotelu a jejich aktivace má za následek uvolnění NO a PGI₂ a s nimi spojenou vazodilataci (11,13,16).

ET-1 je považován za významný vazokonstriktor, ale endotelové ET_B receptory jsou důležité pro udržení fyziologické funkce cév. Ukázalo se, že jejich inhibice u zdravých jedinců vyvolala zvýšení krevního tlaku, což nastalo v důsledku převládající vazokonstriční aktivity (13,16). ET-1 mimo vliv na cévní tonus povzbuzuje buněčnou proliferaci a zánět, tudíž jeho nadměrná aktivita může být zodpovědná za rozvoj endotelové dysfunkce (16).

Prostacyklin a tromboxan

Mezi další modulátory endotelových funkcí patří prostacyklin (PGI₂) a tromboxan (TXA₂), jejichž navzájem protichůdný efekt napomáhá udržovat fyziologickou rovnováhu u zdravých cév. PGI₂ a TXA₂ vznikají z kyseliny arachidonové (AA) reakcí katalyzovanou enzymem cyklooxygenázou (COX). Známe dvě izoformy COX-1 a COX-2. COX-2 katalyzuje přeměnu AA přes prostaglandin H₂ (PGH₂) na PGI₂ a COX-1 pak katalyzuje syntézu TXA₂ (13,16).

PGI₂ působí v synergii s molekulou NO, čímž působí relaxačně na svalstvo cév. Navíc inhibuje adhezi molekul k cévní stěně, rovněž snižuje agregaci destiček, omezuje proliferaci a migraci hladkých svalových buněk a snižuje produkci růstových faktorů. Tromboxan působí efektem opačným (11,13).

4 Endotelová dysfunkce

Jak již bylo výše uvedeno, endotel hraje velmi důležitou roli v regulaci cévní propustnosti, napětí cévní stěny, v procesu hemostázy a stejně tak usměrňuje zánětlivé a imunologické reakce. Všechny tyto funkce endotelu udržují fyziologickou cévní homeostázu, a pokud dojde k vychýlení jedné z nich, rozvíjí se endotelová dysfunkce (ED). ED se vyznačuje zesílenou vazokonstrikční aktivitou, zvýšenou adhezí leukocytů, aktivací destiček, oxidačním stresem, zánětem a koagulací, tedy procesy vedoucími k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění (15,23).

Hlavními rizikovými faktory podílejícími se na vzniku ED jsou snížená fyzická aktivita, diabetes mellitus II typu, hypertenze, kouření, zánět a proces stárnutí organismu, které prostřednictvím různých patofyziologických mechanismů vedou k narušení až úplné ztrátě ochranných vlastností endotelu. Nízká syntéza NO a oxidační stres a s ním spojený pokles biologické dostupnosti NO jsou hlavními mechanismy. Nejenže dochází k poklesu vazodilatace, ale dochází také k aktivaci prozánětlivých a protrombogenních procesů. Faktory jako asymetrický dimethylarginin, angiotenzin II a endotelin-1, hypercholesterolémie a hyperglykémie výrazně podporují mechanismus vzniku a rozvoje ED (23,24).

4.1 NO a oxidační stres

Velmi často pozorovaným jevem vyskytujícím se u mnoha kardiovaskulárních onemocnění je pokles biologické dostupnosti oxidu dusnatého (23). Nízká aktivita endotelové NO syntázy, která nastává v důsledku působení endogenních nebo exogenních inhibitorů nebo také vlivem nedostatečného přísunu substrátu L-argininu, má za následek sníženou syntézu NO. Oxidační stres, jako jeden z hlavních mechanismů vzniku ED, je spojený s produkcí reaktivních molekul kyslíku (ROS). Tyto reaktivní molekuly, zejména superoxid, reagují s NO za vzniku peroxynitritu, čímž biologická dostupnost NO značně poklesne. Navíc molekula peroxynitritu cílí na důležitý kofaktor tetrahydrobiopterin (BH4) a způsobí jeho uvolnění z domény enzymu eNOS (23,25,26). Tímto mechanismem vzniká tzv. rozpojený (uncoupled) enzym eNOS, tedy nefunkční

forma enzymu, která se stává samotným producentem superoxidu namísto molekuly NO (18). Mimo to stoupá koncentrace BH2 jako produktu oxidace. BH2 poté soutěží s BH4 o vazbu na eNOS, čímž se značně prohlubuje inaktivace enzymu. Peroxynitrit je také zodpovědný za oxidaci LDL molekul (23,25,26).

Zvýšená produkce ROS stimuluje expresi genů pro adhezní (ICAM-1, VCAM-1) a chemotaktické molekuly, jako je makrofágový chemoatraktant (MCP-1). Touto cestou se oxidační stres podílí na rozvoji zánětu v cévní stěně. ROS navíc řídí specifickou formu apoptózy nazývanou anoikis, která spočívá v cíleném oddělení endotelových buněk od extracelulární matrix (25).

Za produkci reaktivních molekul kyslíku jsou zodpovědné hlavně enzymy NADPH oxidáza, xantinoxidáza a mitochondriální enzymy. Mezi takové zdroje řadíme i výše uvedený rozpojený (uncoupled) enzym eNOS (14).

4.2 Asymetrický dimetylarginin

Asymetrický dimetylarginin (ADMA) je kompetitivním endogenním inhibítoem eNOS. Soutěží s molekulou L-argininu, a tím inhibuje vazbu tohoto substrátu na eNOS. Proto vysoké hladiny ADMA mají za následek pokles v produkci vazodilatátoru NO a narušení protektivních funkcí endotelu. Navíc podporují vznik dysfunkční formy enzymu. Vysoká hladina ADMA tak výrazně přispívá k rozvoji endotelové dysfunkce a byla pozorována u mnoha patologických procesů včetně aterosklerózy, čímž značně podporuje riziko akutních koronárních příhod (21,25).

4.3 Angiotenzin II, hypertenze

Endotelová dysfunkce je spojena se zvýšenou expresí vazokonstrikčního peptidu angiotenzinu II, tedy faktoru účastnícího se rozvoje arteriální hypertenze. Vysoké hladiny pozorujeme v patogenezi aterosklerózy, kde právě modulací rizikových faktorů zesiluje její proces a stejně tak zvyšuje propustnost a remodelaci krevních cév, trombózu a zánět (23,24).

4.4 Hypercholesterolémie, ateroskleróza

Víme, že endotelová dysfunkce ve spojitosti s hypercholesterolémií hraje významnou roli v patogenezi aterosklerózy a můžeme zde pozorovat všechny výše uvedené mechanismy rozvoje ED. Ateroskleróza je chronickým zánětlivým

onemocněním tepen, která je charakteristická hromaděním tukových částic ve stěně cév a tvorbou aterosklerotického plátu. Zvýšená hladina cholesterolu v krvi je úzce spojena se zvýšenou produkcí ROS, čímž vede k poškození protektivních funkcí endotelu (23,27).

V časně fázi aterosklerotického procesu pozorujeme zvýšenou propustnost endotelu vzhledem k lipoproteinovým částicím a leukocytům. Vzestup sekrece specifických adhezních molekul VCAM, ICAM, E-selektinu a P-selektinu podporuje adhezi leukocytů k cévní stěně. Lipoproteinové částice se váží s proteoglykany tuniky intimy, kde snadno podléhají chemickým modifikacím, zejména oxidaci (26).

Oxidované LDL částice jsou vychytávány LOX-1 receptory. Intenzivní vychytávání stimuluje další expresi adhezních molekul, současně inhibuje expresi eNOS a také stimuluje produkci ROS. Ukázalo se, že LOX-1 receptory se ve zvýšené míře vyskytují u pacientů s hypertenzí, diabetem mellitem II typu a dyslipidemií. Angiotenzin II a endotelin-1 stimuluje expresi těchto receptorů (15,25).

Makrofágy, které vznikly diferenciací monocytů, pohlcují oxidované LDL částice za vzniku pěnových buněk, které produkcí prozánětlivých markerů, ROS, cytokinů, chemokinů a růstových faktorů prohlubují rozvrat cévní rovnováhy (26,27).

Zvýšená syntéza kolagenu a migrace hladkých svalových buněk usnadňují progresi aterosklerotického plátu, jehož ruptura je hlavní příčinou většiny koronárních trombóz. Ruptura aterosklerotického plátu nastává oslabením vláken fibrózní čepičky, kdy v důsledku nízké koncentrace NO a přítomnosti oxidačního stresu dochází k produkci prozánětlivých cytokinů. Ty pak aktivují expresi enzymů schopných degradovat kolagenní vlákna čepičky. Mluvíme o enzymu matrix metaloproteinázy (MMP). Navíc se sníženou aktivitou NO souvisí i zvýšená agregace destiček přispívající závažnosti aterosklerotického onemocnění. ED je tedy důležitým článkem jak v zahájení, tak v progresi aterosklerózy (25,26).

4.5 Hyperglykémie

Hyperglykémie reprezentuje další mechanismus podílející se na rozvoji ED, a to prostřednictvím proteinkinázy C (PKC), která aktivuje enzym NADPH oxidázu k produkci ROS a NO zprostředkovaná vazodilatace je takovým mechanismem narušena. Navíc vysoká hladina glukózy v krvi souvisí se vznikem konečných produktů pokročilé glykace

(AGEs). AGEs podporují oxidaci LDL molekul, zvyšují permeabilitu cévní stěny, stimulují produkci ROS, rozvoj zánětu a proces koagulace (28).

5 Endoglin

Endoglin, nebo také CD105 či TGF- β receptor III, je homodimerní transmembránový glykoprotein nadrodiny proteinů TGF- β , který zaujímá významné postavení jako regulátor TGF- β signálních drah (2,29).

Je důležitým článkem v mnoha patologických, ale i fyziologických procesech a jeho aktivita velmi úzce souvisí s vývojem kardiovaskulárního systému, s angiogenezí a s regulací cévní homeostázy (2,29,30). Zvýšená exprese endoglinu byla pozorována v časně fázi tvorby aterosklerotických lézí, avšak jeho přesná role v procesu aterosklerózy dosud nebyla objasněna. Byla naznačena možná role takového proteinu ve stabilizaci aterosklerotického plátu přes transkripční faktory Smad2/3 a přes zvýšenou produkci kolagenu (2,31,32). Také u srdeční nedostatečnosti byla pozorována spojitost endoglinu se zvýšenou produkcí kolagenu a s fibrózou srdce přes aktivaci faktorů Smad2/3 (33). Endoglin se taktéž účastní procesu hojení rány zvýšenou produkcí extracelulární matrix, expresí proteáz, chemotaxí, proliferací, migrací a diferenciací buněk (34). Navíc stimuluje expresi eNOS, dokonce tento enzym stabilizuje a usnadňuje jeho sdružení s Hsp90. Z tohoto důvodu má značný vliv na regulaci cévního tonu (2,35). Byla pozorována mutace genu pro endoglin, která má za následek vaskulární onemocnění hereditární hemoragickou teleangiektázií typu 1 (30,36). Dále byla potvrzena spojitost takového proteinu s kardiovaskulárními a metabolickými onemocněními, kterými jsou hypertenze, diabetes mellitus II typu a preeklampsie (2,30,37).

5.1 Struktura

Endoglin obsahuje dvě rovnocenné 95 kDa podjednotky, které jsou vzájemně propojeny disulfidovými můstky. Rozlišujeme tři základní domény ve struktuře endoglinového proteinu: velká extracelulární doména, transcelulární a krátká intracelulární doména (31). Extracelulární doména, která se skládá z 561 aminokyselin, obsahuje tripeptidovou sekvenci Arg-Gly-Asp, která je specifická pro strukturu lidského

endoglinu a u myší, prasat či jiných druhů se s ní nesetkáme. Sekvence je rozpoznávacím místem mnoha adhezních molekul (30,33). Endoglin je součástí rodiny proteinů zvaných zona pellucida (ZP) a ZP doména, která je částí endoglinové struktury v extracelulární oblasti, obsahuje 260 aminokyselin a 8 cysteinových zbytků (30).

Genetický kód pro lidský endoglin nacházíme na chromozomu 9. Obsahuje 15 axonů a 13 z nich kódují právě extracelulární doménu (2). Také bylo zjištěno, že homologa endoglinu, která byla nalezena u myší a prasat, vykazují více než 70% shodu v sekvenci aminokyselin v porovnání s lidským endoglinem (31).

Rozpoznáváme 2 izoformy endoglinu, dlouhá (L-izoforma) a krátká (S-izoforma). Izoformy se navzájem liší počtem aminokyselin tvořících intracelulární (cytosolovou) doménu a také úrovní fosforylace. 47 aminokyselin obsahuje cytosolová doména L-izoformy a vyznačuje se vysokým stupněm fosforylace, naproti tomu S-izoforma obsahuje pouze 14 aminokyselin a stupeň fosforylace je nízký. Obě izoformy interagují s receptory ALK-1 a ALK-5, avšak liší se v afinitě ke každému z nich. Zatímco L-izoforma podporuje TGF- β /ALK-1 signalizaci a vyznačuje se pro-angiogenním efektem, S-izoforma stimuluje cestu TGF- β /ALK-5 a má anti-angiogenní efekt na buňky endotelu (31,33,38).

5.2 Exprese

Expresi endoglinu pozorujeme zejména u endotelových buněk, nicméně i ostatní buňky mohou endoglin exprimovat. Mezi ně řadíme hladké svalové buňky, mezenchymální a hematopoetické kmenové buňky či monocyty, tedy i makrofágy, stejně tak buňky nacházející se v srdeční tkáni, jako je endokard a fibroblasty (29,33,39).

Hypoxie, poškození cév či jiné patologické procesy stimulují expresi endoglinu v krevních cévách (2). Bylo zjištěno, že samotná hypoxie mírně stimuluje expresi endoglinu prostřednictvím HIF-1 komplexu. Také TGF- β signalizace vedoucí přes Smad transkripční faktory výrazně stimuluje jeho expresi. V kombinaci hypoxických podmínek s TGF- β 1 signalizací dochází k vytvoření transkripčního multikomplexu, který výrazně stimuluje transkripci endoglinu. Transkripční multikomplex zahrnuje Smad3/Smad4, stimulating protein-1 (Sp1) a hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), čímž nastává synergický účinek dvou signálních drah (30,40). Při poškození cév dochází k interakci mezi Sp1 a Kruppel-like factor 6 transkripčních faktorů a výsledkem je aktivace transkripce

proteinu. Dále bylo zjištěno, že TNF- α má opačný efekt na výslednou transkripci v porovnání s TGF- β 1 (2,31,41).

5.3 Regulační funkce

Endoglin jako takový postrádá vnitřní kinázovou aktivitu. Jeho úlohou je řídit TGF- β signalizaci, a to interakcí s proteiny účastnících se těchto signálních drah. Spolu s transmembránovými serin/treonin kinázovými receptory, jako jsou TGF- β receptory I (activin-like kinázové receptory ALK-1 a ALK-5) a TGF- β receptor II, endoglin tvoří receptorový komplex (2,31). Víme, že endoglin není pravým receptorem, ovlivňuje však aktivitu TGF- β receptoru II a TGF- β receptoru I (ALK-1 a ALK5), tedy úroveň fosforylace transkripčních faktorů (2).

Známe dvě signální dráhy, ve kterých endoglin uplatňuje svou regulační funkci. První cesta endoglin/ALK-1/Smad1/5, stimuluje EB k proliferaci a migraci, naopak druhá cesta endoglin/ALK-5/Smad2 působí inhibičním účinkem na aktivitu EB a angiogenezi. Nicméně se ukázalo, že endoglin vykazuje inhibiční vliv na TGF- β /ALK-5/Smad3, tudíž výsledný účinek na aktivitu endotelových buněk je opačný (2,31)

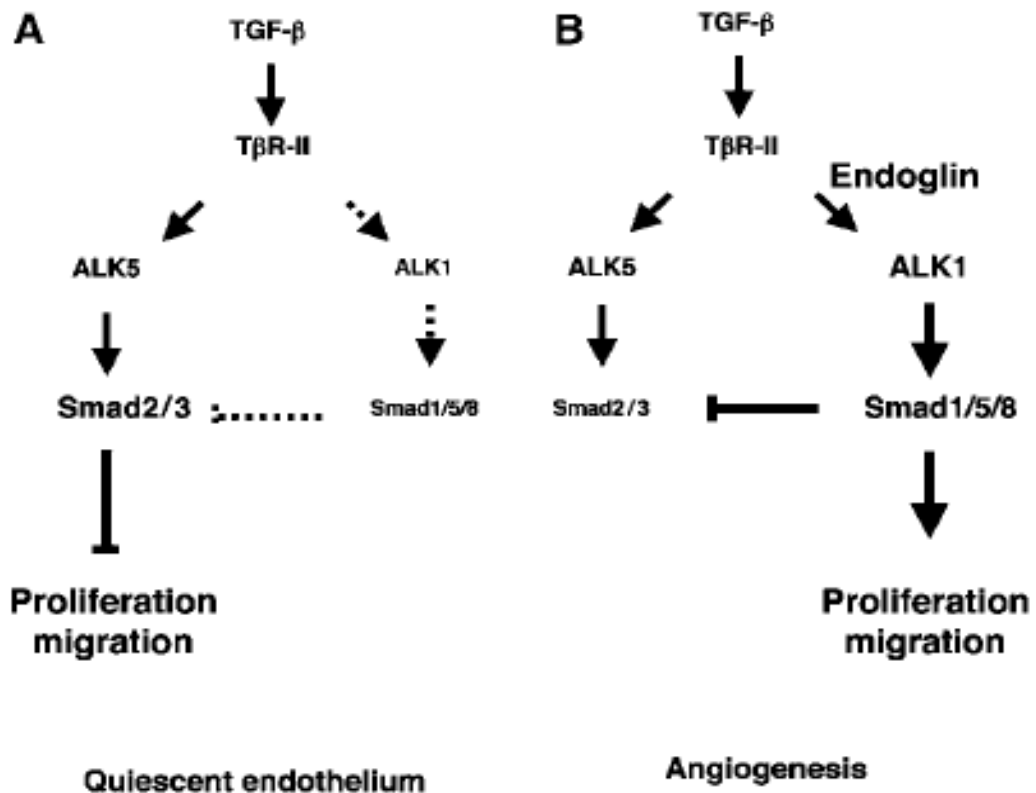
Navázáním TGF- β proteinů na receptory signálních drah dochází k zahájení signalizační kaskády. Byly rozlišeny 3 izoformy TGF- β vyskytujících se u savců, a to TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, které ovlivňují migraci, proliferaci a diferenciaci buněk (42,43). Z nich endoglin váže pouze TGF- β 1 a TGF- β 3, a to jedině za přítomnosti receptoru TGF- β II (42,44). Po navázání ligandu je spuštěna formace funkčního receptorového komplexu, kdy TGF- β receptor II fosforyluje ALK-1 nebo ALK-5 v místě na serin/treonin bohaté cytoplasmatické domény vyvolá konformační změnu receptoru (2,42).

Signalizace se šíří přes aktivaci Smad proteinů (transkripčních faktorů) a jejich následnou translokaci do jádra, kde jsou schopny regulovat genovou expresi (42,45). Známe celkem 8 Smad proteinů, které můžeme rozdělit do tří skupin: Smad proteiny regulované receptory (R-Smad), tzv. common-partner Smad (Co-Smad), a inhibiční Smad proteiny (I-Smad). Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 a Smad8 patří mezi R-Smad proteiny, které podléhají fosforylační aktivitě aktivovaného receptorového komplexu. Smad4 působí jako Co-Smad a vazbou na aktivované R-Smad proteiny umožní jejich přestup do jádra, a nakonec inhibiční Smad6 a Smad7 (42,46,47).

Jak bylo výše zmíněno, endoglin ovlivňuje TGF- β signální dráhy vedoucí přes kinázové receptory ALK-1 a ALK-5. Signální dráha TGF- β /ALK-5 přes fosforylaci Smad2/3 signálních mediátorů udržuje endotel v klidovém stavu, nedochází k buněčné proliferaci či migraci buněk. Naopak signální dráha TGF- β /ALK-1 přes fosforylaci faktorů Smad1/5 má za následek aktivaci endotelu (33,48).

Endoglin je klíčový pro udržení rovnováhy mezi těmito dráhami, kdy negativně ovlivňuje ALK-5 signalizaci, a naopak podporuje ALK-1 signální dráhu (33,49). Inhibiční účinek endoglinu na ALK-5 je nepřímý a je zprostředkovaný přes dráhu ALK-1. Takovým kombinovaným účinkem je výrazně podpořen proces angiogeneze, který je doprovázen zvýšenou propustností cév, migrací a proliferací buněk (48,49). Navíc bylo zpozorováno, že potlačením endoglinové exprese se značně zvýší inhibiční působení na aktivitu EB, a naopak jeho nadměrná exprese má za následek zvýšenou buněčnou proliferaci. Což zdůrazňuje jeho působení jako negativní regulátor TGF- β /ALK-5 signální dráhy (33,42). To dokládá i skutečnost, kdy endoglin deficientní myši měly potlačenou proliferaci endotelových buněk právě kvůli zeslabené signální cestě TGF- β /ALK-1 a zvýšené TGF- β /ALK-5 signalizaci (38,50). S tím souvisí onemocnění vyznačující se poruchou cévní homeostázy v důsledku mutace genu pro endoglin, hereditární hemoragická teleangiektázie typu 1 (33,50).

Obrázek 3: Model regulace angiogeneze endoglinem



- A** Schéma A znázorňuje signalizaci TGF-β v klidovém stavu endotelu. Signalizace přes ALK-5 potlačuje buněčnou proliferaci a ALK-1 naopak proliferaci podporuje. Absence endoglinu značně zesiluje inhibiční vliv signální dráhy ALK-5 na aktivitu endotelových buněk.
- B** Schéma B znázorňuje angiogenní endotel. Endoglin je ve zvýšené míře exprimován při angiogenním procesu a je důležitý pro ALK-1 signální dráhu vedoucí k proliferaci buněk endotelu. Navíc zvýšená exprese endoglinu inhibuje ALK-5 signalizaci, a to nepřímo přes ALK-1, čímž podpoří pro-angiogenní efekt.

Zdroj: (50)

5.4 Endoglin/Smad/eNOS signalizace v cévním systému

Mnohé studie prokázaly spojitost mezi expresí endoglinu a expresí eNOS, tedy expresí enzymu zprostředkujícím syntézu hlavního relaxačního faktoru, oxidu dusnatého (2). Taková souvislost byla prokázána ve studii *Jerkic et al.* na modelu endoglin haploinsuficientních myší, které vykazovaly oslabenou vazodilatační schopnost endotelu právě v důsledku poklesu hladin enzymu eNOS (2,51). Bylo tedy zjištěno, že hladina eNOS je závislá na množství endoglinu, avšak mechanismus, kterým endoglin reguluje expresi eNOS, nebyl zcela jasný. Studií *in vitro* byla navržena možná regulační cesta, ve které endoglin ovlivňuje expresi eNOS cestou přes Smad2/3 transkripční faktory, a to jak za přítomnosti, ale i nepřítomnosti TGF- β 1 (51,52).

Ukázalo se, že endoglin zvyšuje stabilitu, hladinu a fosforylaci transkripčního faktoru Smad2 (2). Dokonce byl navržen mechanismus, kdy endoglin stabilizuje Smad2 protein blokací tzv. Smurf2 (Smad ubiquitination response factor 2), který je zodpovědný za degradaci proteinu Smad2. Následkem zvýšené stability se zvýšila hladina tohoto proteinu a zesílila se signalizační cesta TGF- β /Smad2. Transkripční faktor Smad2 je následně aktivován fosforylací a umožní vytvořit komplex se Smad4. Takový komplex poté přechází do jádra, kde aktivuje jadernou transkripci enzymu (39,52). Dostalo se tak závěru, že endoglin stimuluje expresi eNOS v endotelových buňkách přes zvýšenou hladinu faktoru Smad2, čímž studie potvrdila význam endoglinu v kardiovaskulárním systému (52).

Nicméně do té doby nebyl prokázán přímý vztah mezi expresí endoglinu a expresí proteinů zúčastněných v navržené signální dráze. Tuto korelaci potvrdila studie *in vivo* u normocholesterolemických, ale i hypercholesterolemických myší, tedy potvrdila korelaci mezi expresí endoglinu a expresí proteinů Smad2, pSmad2/3 a eNOS v endotelu myší aorty. Tím studie současně stvrdila důležitost těchto proteinů pro udržení fyziologických funkcí endotelu a také jejich významnou roli při aterogenezi (46).

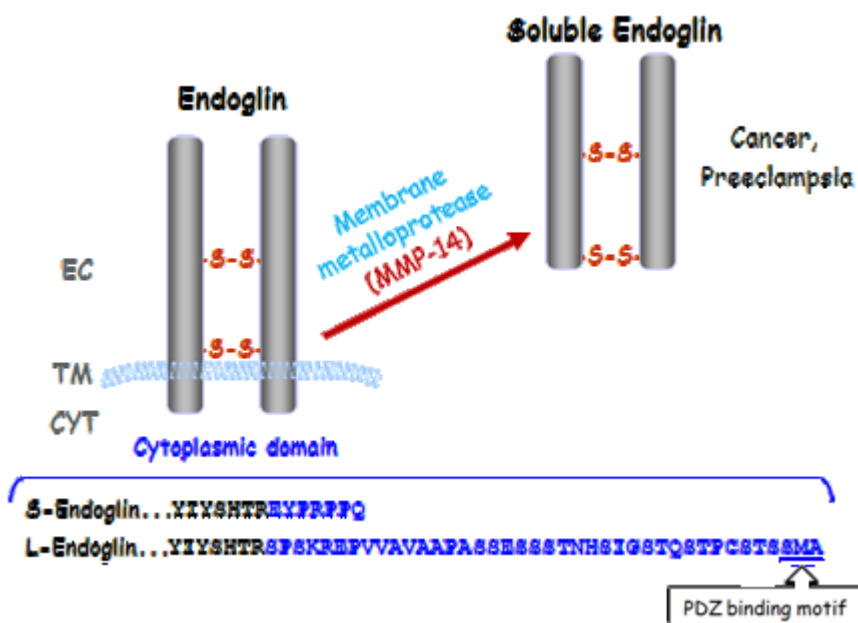
6 Solubilní endoglin

6.1 Tvorba solubilního endoglinu a jeho vztah k dysfunkci endotelu

Jak již bylo řečeno, endoglin je transmembránový glykoprotein, jehož struktura se skládá ze tří domén. Odtržením extracelulární domény membránového endoglinu od intaktní membrány a jeho následným uvolněním do krevní plazmy vzniká solubilní endoglin. Hlavním enzymem zodpovědným za odštěpení domény je metaloproteináza MMP-14 (membrane-type metalloproteinase-14) a ke štěpení dochází na pozici 586 (Obrázek 4) (2,53).

Obrázek 4: Uvolnění extracelulární domény endoglinu do cirkulace

Membránová metaloproteináza typu 14 (MMP-14) štěpí strukturu membránového endoglinu v pozici 586, čímž uvolňuje extracelulární doménu do cirkulace.



(EC) extracelulární doména, (TM) transcelulární doména, (CYT) cytoplazmatická, intracelulární doména.

Zdroj: http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ENG.html [1. únor 2019]

Spojitosť endotelové dysfunkce s vysokou hladinou solubilního endoglinu v plazmě byla prokázána u mnoha kardiovaskulárních onemocnění. Mezi ně patří

preeklampsie, hypertenze či diabetes mellitus II typu a solubilní endoglin je u těchto onemocnění označován za biologický ukazatel dysfunkce endotelu (29,37,53). Zvýšená hladina solubilního endoglinu byla rovněž pozorována u pacientů s vysokou hladinou celkového cholesterolu, tedy s rizikovým faktorem vedoucím k rozvoji endotelové dysfunkce a ke vzniku aterosklerózy (54,55). Také u dalších patologických procesů se solubilní endoglin stal ukazatelem dysfunkčnosti endotelu. Například pacienti s akutním infarktem myokardu vykazovali nízkou koncentraci solubilního endoglinu v porovnání se zdravými jedinci a taková snížená hladina pak může poukazovat na závažnost onemocnění. Stejně tak u chronického srdečního selhání byla objevena spojitost se změnami hladin solubilního endoglinu a jeho možný vliv na aktivitu membránového endoglinu, jehož exprese byla zvýšená právě u tohoto onemocnění ve spojitosti s remodelací srdce (33,37).

Solubilní endoglin má opačný efekt na TGF- β signalizaci v porovnání s membránovou formou. Jako antagonist blokuje vazbu TGF- β na receptor, v důsledku čehož dochází k přerušení TGF- β signalizace přes transkripční faktory Smad2/3 a výsledkem je snížená exprese eNOS. S tím související pokles NO zprostředkované vazodilatace může mít za následek zvýšenou cévní rezistenci, která vede k rozvoji arteriální hypertenze. Právě preeklampsie je onemocněním charakterizované hypertenzí a endotelovou dysfunkcí (33,37,54). Solubilní endoglin zvyšuje propustnost cév zesílenou expresí adhezních molekul a vyznačuje se anti-angiogenním účinkem, což je připisováno právě mechanismu blokace signální dráhy TGF- β (29,54).

Solubilní endoglin se stal předmětem mnoha studií. Nicméně odpověď na otázku, zda samotná hladina solubilního endoglinu může mít za následek narušení fyziologických funkcí endotelu, nebyla dosud jednoznačně zodpovězena. Výsledek práce *Nemeckova et al.* ukázal, že samotná vysoká hladina lidského solubilního endoglinu bez přítomnosti rizikových faktorů nezpůsobí dysfunkci endotelu v aortě myši starých od 4 do 6 měsíců (29,53). Následně další studie ukázala, že kombinace vysoké hladiny plazmatického endoglinu s hypercholesterolémií zhoršila endotelovou dysfunkci narušením signální dráhy membránového endoglinu/eNOS. Dospěli tak k závěru, že v kombinaci s rizikovými faktory by solubilní endoglin mohl vést k rozvoji cévních změn (56).

7 Myší modely aterosklerózy

Ateroskleróza je progresivní zánětlivé onemocnění, u něhož je charakteristická akumulace tukových částic ve stěně tepen. Onemocnění progreduje tvorbou aterosklerotického plátu, který může přejít ze stabilní formy do formy nestabilní. Ruptura plátu následně spouští formaci trombů (57). Aterosklerotická kardiovaskulární onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí západního světa (58).

Pro získání informací týkajících se patogeneze a potenciální léčby aterosklerotických lézí bylo během mnohaletých studií použito velké množství zvířecích modelů (58). Tato zvířata umožnila pochopit mechanismy tvorby aterosklerotického plátu a progresu onemocnění, a to na molekulární úrovni (57). Dříve byla značná pozornost věnována velkým zvířecím modelům, jako jsou králíci, prasata a opice (59). Králičí modely však vykazovaly značnou odlišnost v aterosklerotických lézích v porovnání s těmi lidskými. A i když se prasata a opice zdály být vhodnými modely, v dnešní době se nepoužívají z důvodu vysoké ceny, náročného chovu a zejména u opic z důvodu obav týkajících se jejich existence (58).

Hlavním zvířecím modelem využívaným ve výzkumu mechanismu aterosklerózy se stala myš. Takové zvíře se vyznačuje velkým množstvím pozitivních výhod vyžadovaných pro výzkum. Mezi ně patří nenáročnost k pořízení i na chov, krátká generační doba a schopnost vyvinout aterosklerotickou lézi za velmi krátký čas (60). Dokonce mohou být geneticky upravovány vnesením exogenních transgenů nebo inaktivací či nahrazením endogenních genů. Hlavní nevýhodou je jejich drobnost, která značně ztěžuje manipulaci s nimi (58).

Normální (wilde type) myši jsou charakteristické vysokou rezistencí k rozvoji aterosklerózy z důvodu vysoké hladiny anti-aterogenního HDL cholesterolu (až 85 %), a naopak nízké hladiny pro-aterogenních LDL a VLDL molekul v plazmě (61). Z toho vyplývá, že všechny myší modely určené pro výzkum aterosklerózy musí mít narušený lipoproteinový metabolismus (62).

Pro výzkum je nezbytná rychlost tvorby aterosklerotického plátu, která může být u zvířecích modelů podpořena tzv. „Western type“ potravou bohatou na cholesterol,

manipulací genů týkajících se metabolismu cholesterolu či navozením přídatných rizikových faktorů aterosklerózy (57).

V 60. letech byl popsán nejstarší myší model aterosklerózy (58). Ukázalo se, že určitý inbrední myší kmen, konkrétně C57BL/6, může vyvinout aterosklerotické léze po podávání vysokotučné diety. Tato strava obsahovala vysokou koncentraci cholesterolu, tuku a choleové kyseliny (61). U inbredního kmene se vytvořily léze pěnových buněk, kdežto u ostatních pozorovaných kmenů takového stavu dosaženo nebylo (63). Nicméně vzniklé léze vykazovaly značné rozdíly v porovnání s těmi lidskými: byly menší, vyskytovaly se pouze u aortální chlopně a nevedly k rozvoji fibrózního plaku. Navíc samotná dieta působila toxicky a způsobila chronický zánět, což vedlo k domněnku, že genetické rozdíly mezi jednotlivými kmeny mají za následek spíše dietně navozený zánět (58,63).

Genetický zásah do lipoproteinového metabolismu umožnil vytvořit dva nejvyužívanější myší modely aterosklerózy. Jedná se o apolipoprotein E deficientní a LDL receptor deficientní myší modely, které značně pozvedly aterosklerotický výzkum (60,62).

7.1 Apolipoprotein E deficientní (ApoE -/-) myši

Apolipoprotein E (apoE) je důležitý glykoprotein vyskytující se na povrchu lipoproteinových částic, zejména na povrchu chylomikronů, VLDL a HDL částic. Jeho syntéza probíhá hlavně v játrech a rozpoznáváme 3 izoformy: apoE₂, apoE₃ a apoE₄, z nichž apoE₃ je nejčastější (57,59,63). ApoE vystupuje jako ligand pro lipoproteinové receptory a je nezbytný pro vychytávání aterogenních částic z cirkulace (57,62).

Po podávání nízkocholesterolového a nízkotukového krmiva ApoE^{-/-} myším byl zaznamenán nárůst plazmatického cholesterolu na hodnotu 22,2-33,3 mmol/l. Tento nárůst je připisován nahromadění chylomikronů a VLDL lipoproteinových zbytků vlivem nepřítomnosti apolipoproteinu E (63). Běžná hladina plazmatického cholesterolu u myši se pohybuje okolo 4,2-5,6 mmol/l, tudíž vidíme, že došlo ke značnému vzestupu hodnot (57). Dále byly pozorovány jak tukové proužky, tak i rozšířené fibrózní pláty, které se vyskytovaly po celém aortálním kmeni i v jeho větvích, tedy podobně jako u lidí (61,63). Po 5 až 6 týdnech krmení byla zřetelná adheze monocytů ke stěně a jejich migrace přes

endotel. Lipidové proužkování bylo u patrné po 10 týdnech a léze, které obsahovaly pěnové buňky a hladké svalové buňky, po 15 týdnech. A konečně fibrózní pláty, které se objevily po 20 týdnech (58,63). Nicméně ruptura plátu zpozorována nebyla (58).

Dále byla napodobena situace, kdy strava bohatá na cholesterol a tuky tzv. „Western type“ má za následek zhoršení aterosklerotického procesu. Obsahovala 0,15 % cholesterolu a 21 % tuku, ale ne kyselinu cholovou, takže nepůsobila toxicky. Výsledkem byla těžká hypercholesterolémie, léze nabyly na velikosti a progresi aterosklerotických lézí se značně urychlila (61,63). ApoE deficientní model myši byl prvním modelem, u něhož byly léze podobné těm lidským (58).

7.2 LDL receptor-deficientní (LDLr -/-) myši

Takový myši model vykazoval pouze mírnou hypercholesterolémii po podání nízkotučného krmiva (57). Koncentrace celkového cholesterolu v plazmě dosahovala hodnoty okolo 13,9 mmol/l, hlavně akumulací LDL cholesterolu, a aterosklerotické léze zpozorovány nebyly. Zato Western type strava vyvolala vzrůst hodnoty cholesterolu v plazmě na 55,6 až 66,7 mmol/l, tedy vážnou hypercholesterolémii, a rozsáhlé aterosklerotické léze složené hlavně z lipidových proužků. Jedná se o model s vysokou citlivostí na dietně navozenou aterosklerózu a představuje model familiární hypercholesterolémie (61,63).

7.3 ApoE/LDL receptor double knockout myši

ApoE/LDL receptor double knockout myši představují kombinovaný model, který se vyznačuje závažnější hyperlipidémií a aterosklerózou v porovnání s jednotlivými modely ApoE -/- a LDLr -/-. Pravidelným krmením nízkotučnou stravou došlo k zřetelnější progresi aterosklerózy u kombinovaného modelu než u samotného modelu ApoE -/-. Představuje tak model vhodný pro studii anti-aterogenních účinků potenciální farmakoterapie (57).

7.4 ApoE-Cys142 a ApoE-Leiden

Dalšími modely jsou ApoE-Cys142 a ApoE-Leiden. Tyto transgenní myši modely exprimují defektní formy apolipoproteinu E, které jsou charakteristické u pacientů trpících hyperlipoproteinémií III typu. Myši vykazovaly mírnou hyperlipidémii po podání

nízkotučné potraviny, naopak vážnou hypercholesterolémií a lipidové léze jako důsledek potraviny bohaté na cholesterol a tuk (61).

Pro doplnění, existuje model ApoB transgenních myší, které exprimují lidský apolipoprotein B. ApoB je ligand nacházející se na povrchu LDL a umožňuje vylučování těchto částic z cirkulace (63).

7.5 Myší model s vysokými hladinami solubilního endoglinu

Jedná se o model transgenních myší s nadměrnou expresí lidského solubilního endoglinu. Tato linie byla vytvořena genetickou modifikací, konkrétně vnesením exogenního transgenu, který nese kód pro extracelulární doménu endoglinu, do oplozených vajíček CBAx57BL/6J myšího kmene (29,58,64). Vznikl tak myší model fenotypově podobný onemocněním preeklampsii vyznačující se hypertenzí, proteinurií a poškozením ledvin (29). Je důležité zmínit vysokou úroveň homologie mezi lidským a myším solubilním endoglinem a také schopnost lidského solubilního endoglinu působit na signalizaci u myší (56). Takový model nám dává jedinečnou možnost studovat postavení solubilního endoglinu v problematice vzniku a vývoje endotelové dysfunkce a s ní spojený rozvoj kardiovaskulárních a metabolických onemocnění (29).

8 Western blot

Western blot představuje analytickou techniku velmi často využívanou ve výzkumných laboratořích pro identifikaci proteinů určitého vzorku (65). Jeho proces lze rozdělit a charakterizovat ve třech základních krocích. V prvním kroku je směs proteinů rozdělena podle molekulové hmotnosti, a to za použití gelové elektroforézy. Separované proteiny jsou následně přeneseny na membránu, což reprezentuje druhý krok. A v posledním kroku jsou proteiny označeny za využití specifických protilátek pro hledání proteinu (66).

Samotné Western blot analýze předchází příprava vzorků, v nichž chceme proteiny detekovat (66). Buňky a tkáně, ze kterých proteiny extrahujeme, jsou zmrazeny tekutým dusíkem a lyzovány, a to co nejrychleji (67). Pro zajištění lýzy buněk a narušení buněčných membrán se nejčastěji používá mechanická homogenizace. Ta se uskutečňuje za nízké teploty a v pufru obsahujícím inhibitory proteáz, které zabraňují denaturaci proteinů (66,68,69). Po extrakci se spektrofotometricky stanoví koncentrace

proteinu ve vzorku, která je důležitá pro výpočet hmotnosti proteinu na jamku v gelu (68). Následně se vzorky ředí na požadovaný objem, opatří se barvivem pro vizualizaci postupu elektroforézy, a nakonec se vzorky zahřejí na vysokou teplotu, čímž se zajistí denaturace proteinů a získá záporného náboje (66).

8.1 Gelová elektroforéza

Princip gelové elektroforézy je založen na různorodosti dvou gelů navzájem se lišících v koncentraci akrylamidu. Jedná se o horní stacking (zaostřovací) a spodní separating (separační) gel. Horní gel má slabě kyselý charakter, nižší koncentraci akrylamidu, a tudíž je vysoce porózní. Tato vrstva je důležitá pro formování tenkých a ostře definovaných bandů (66). Naopak spodní gel má bazický charakter, vyšší koncentraci akrylamidu a slabší porozitu gelu, která zajistí snadný pohyb proteinů a jejich rozdělení podle molekulové hmotnosti. Následně platí, že proteiny menší velikosti putují gelem rychleji (66,68).

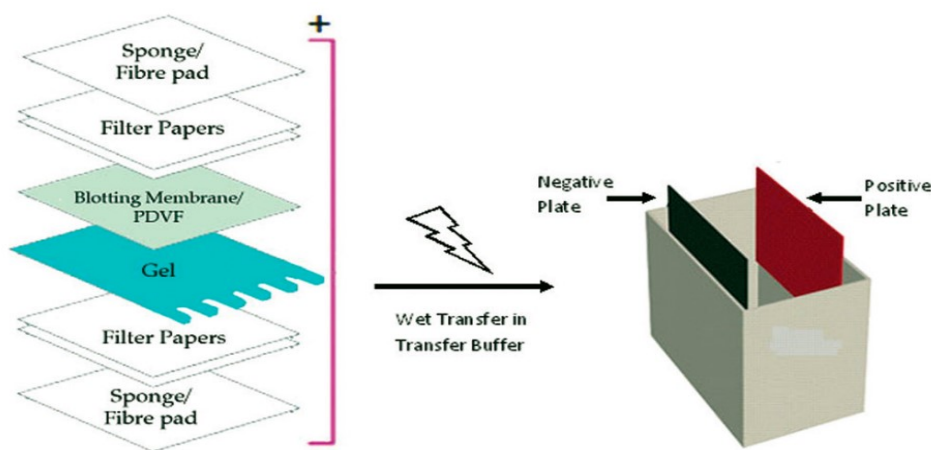
Do jednotlivých jamek v gelu se nanáší marker a extrahované proteiny v pufru, které denurací získaly záporný náboj. Zapojené napětí donutí tyto záporně nabitě proteiny k pohybu směrem k pozitivní elektrodě a rozdílná rychlost proteinů zajistí jejich rozdělení do jednotlivých linií tzv. bandů (66,68). Marker představuje směs proteinů o známé molekulové hmotnosti, čímž umožní dobře rozlišit a identifikovat sledované bandy proteinů (69).

8.2 Blotování

Negativně nabitě proteiny jsou v druhém kroku metody Western blot přinuceny k dalšímu pohybu, a to k přesunu z gelu na membránu za současného působení elektrického proudu (65). Elektrický proud je orientovaný kolmo k povrchu gelu a proteiny se záporným nábojem následně putují k pozitivní elektrodě (Obrázek 5) (66). Membrána je umístěna mezi gelem a pozitivní elektrodou, a tudíž procházející proteiny zastaví a naváže (65). Pro takový elektroforetický transfer proteinů se používá metoda Semi-dry nebo spolehlivější mokrá cesta (66). Nejčastěji používanou membránou je membrána z nitrocelulózy nebo PVDF (polyvinylidenfluoridová) membrána (68).

Obrázek 5: Elektroforetický transfer metodou mokré cesty

Obrázek ukazuje sestavení tzv. sendviče, který se skládá z houbiček a filtrů předem namočených v pufru a v nich se membrána nachází mezi gelem a pozitivní elektrodou. Procházející proud je orientovaný kolmo k povrchu gelu a proteiny se záporným nábojem putují k pozitivní elektrodě, v důsledku čehož jsou následně zachyceny membránou.



Zdroj: (66)

8.3 Blokace, nanesení protilátek a detekce

Před nanesením samotných protilátek na membránu je důležité předejít nežádoucím interakcím mezi protilátkou a membránou. Právě blokace maskuje nespecifické vazby protilátek na membránu, a tím předchází vzniku falešně pozitivního výsledku. Pro takovou blokaci se používá zředěný roztok proteinu, nejčastěji roztok netučného mléka (66,68).

Poté je membrána inkubována s předem stanovenou koncentrací primární protilátky, která se naváže na hledaný protein. Následuje promytí membrány, aby se odstranily nenavázané protilátky, a cyklus se opakuje se sekundární protilátkou počínaje blokací membrány, inkubací s protilátkou a konče promýváním. Sekundární protilátka se váže na primární protilátku cíleného proteinu a obvykle nese označení enzymem HRP (horseradish peroxidáza, křenová peroxidáza). Po přidání chemiluminiscenčních činidel, HRP štěpí takový substrát za produkci barevného signálu, který je následně zachycen fotografickým filmem. Tato senzitivní metoda se nazývá chemiluminiscenční detekce (66,68).

Získané údaje se označují jako semi-kvantitativní. Neposkytují informace o absolutním množství proteinu, ale umožní nám relativně porovnat jeho hladiny mezi jednotlivými vzorky. Western blot je proto velmi častou metodou využívanou pro stanovení a porovnání exprese specifických proteinů různých buněk a tkání (66,67).

9 Cíl práce, zadání práce

Cílem práce bylo sledovat a vyhodnotit vliv dlouhodobého (12měsíčního) působení solubilního endoglinu na signalizaci membránového endoglinu. Tedy sledovat a porovnat expresi proteinů této signální dráhy: endoglinu, eNOS a pSmad2/3 v aortě transgenních myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu starých 12 měsíců. Výsledky exprese jednotlivých proteinů byly porovnány s kontrolní skupinou stejně starých transgenních myší s naopak nízkou hladinou lidského solubilního endoglinu. Pro stanovení a porovnání exprese jednotlivých proteinů byla použita metoda Western blot analýzy. ELISA byla použita pro stanovení koncentrace lidského solubilního endoglinu a solubilní formy molekuly VCAM-1 a hladina celkového cholesterolu a triacylglycerolů v krvi byla určena biochemickou analýzou.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

10 Použitá zvířata a metody

10.1 Zvířata a etické principy

Pro diplomovou práci byl použit model transgenního myšího kmene CBAxC57BL/6J, který byl vytvořen genetickým zásahem ve Španělsku na Univerzitě v Salamance. Pro náš výzkum byly použity dvě skupiny myších jedinců, konkrétně 5 samců jako testovaná skupina a 5 samců jako kontrolní skupina. Obě skupiny pocházely ze stejné linie transgenních myší se stejným genotypem navzájem se lišící pouze v hladině solubilního endoglinu. Myši staré cca 12 měsíců s vysokou hladinou solubilního endoglinu (Sol-Eng⁺) představovaly testovanou skupinu a stejně staré myši, s naopak nízkou hladinou solubilního endoglinu, zastupovaly skupinu kontrolní.

Obě skupiny byly chovány při neměnné teplotě a vlhkosti s dvanáctihodinovým cyklem den a noc, s volným přístupem k vodě a byly krmeny běžnou laboratorní dietou. Všechny pokusy byly provedeny v souladu se směrnicí Evropského parlamentu a Rady 2010/63/EU a také všechny výzkumné postupy byly v souladu s Etickou komisí na ochranu zvířat proti týrání (Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Praze) a Bioetickou komisí (Univerzita v Salamance). Chirurgické zákroky byly vykonány pod anestézií s cílem minimalizace zvířecích útrap.

10.2 Analýza Western blot

10.2.1 Příprava vzorků

Jak již bylo výše uvedeno, Western blot analýze předchází příprava vzorků, v nichž chceme proteiny detekovat. Vzorky aortální tkáně myších jedinců, kontrolní a testované skupiny, byly po preparaci zmrazeny tekutým dusíkem.

Takové vzorky se nejprve zvážily a dbalo se při tom na to, aby byly udržovány neustále na ledu. Následně se zvážené vzorky umístily do předem připravených ependorfových zkumavek o objemu 2 ml, ke kterým se přidal lyzační pufr RIPA (*Sigma-Aldrich, St. Louis, USA*). RIPA pufr je důležitý pro zajištění lýzy buněk a platí pravidlo, kdy na 1 gram tkáně je třeba přidat 20 ml pufru RIPA.

Abychom zabránili rozkladu bílkovin, do zkumavek byly následně přidány inhibitory proteáz (*SERVA Electrophoresis GmbH, Německo*) a fosfatáz (*Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA*). Také zde platí pravidlo, kdy na 1 ml pufru RIPA se přidá 10 μ l inhibitoru proteáz a 10 μ l inhibitoru fosfatáz.

Homogenizace a centrifugace

Takto připravená tkáň aorty spolu s puftrem a inhibitory se nejprve nastříhala za pomoci nůžek a homogenizace byla následně dokončena v mixéru (rotor-stator). Výsledkem nám byla homogenní tekutina a pro oddělení jednotlivých vrstev byly jednotlivé vzorky podrobeny centrifugací s počtem otáček 10 000 RPM při teplotě 4 °C. Po uplynutí 10 minut se následně odsála oddělená vrstva supernatantu, která se umístila do předem vychlazených zkumavek o objemu 1,5 ml. Přičemž zkumavky s extrahovanými proteiny v RIPA pufru musely být drženy neustále na ledu.

Stanovení kalibrační křivky a celkové koncentrace proteinu

Po extrakci proteinů bylo nezbytné zjistit celkovou koncentraci proteinu v daném extraktu. Koncentrace je důležitá pro určení množství proteinu připadající na jamku v gelu a ředění vzorku před aplikací na gel.

Nejprve se připravila kalibrační křivka albuminu, kdy roztok albuminu představoval standard o známé koncentraci. Ředění vzorků na mikrotitrační destičku bylo 10x (10 μ l vzorku a 90 μ l miliQ H₂O) a vše bylo pipetováno v duplikátu. Následně se přidalo 200 μ l reagentu na jamku, který byl důležitý pro zahájení barevné enzymatické reakce. Připravená mikrotitrační destička se vzorky se zabalila do alobalu a nechala se inkubovat po dobu 30 minut. Poté se pomocí přístroje TECAN spektrofotometricky změřila celková koncentrace proteinu a prostřednictvím počítače se vytvořila tabulka pro ředění vzorků nanášených na jamky gelu.

10.2.2 Příprava gelu na elektroforézu, aplikace vzorků na gel

Příprava sady a sklíček

Před přípravou gelu na elektroforézu je nezbytné si nejprve připravit a správně sestavit sadu Mini-PROTEAN® Tetra Cell (*Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) skládající se z průhledného stojanu a dvou menších zelených stojánků. Pro jeden gel jsou potřeba

dvě velikostně odlišná sklíčka, 1 delší a 1 kratší sklíčko. Delší sklíčko bylo po stranách opatřeno vyvýšenými pruhy, na které se položilo sklíčko kratší. Mezi sklíčky tak vznikl prostor pro nalití gelu. Takto na sebe položená sklíčka se opatrně zasunula do zeleného stojánku, kratším sklíčkem v pozici dopředu, a uzavřením postranních dvířek byla sklíčka fixována. Následně se zelené stojánky umístily do průhledného stojanu tak, že spodní část těsně nasedala na těsnící podložku. Správné nasazení zelených stojánků na podložku je důležité pro zamezení odtékání nalitého gelu.

Příprava separačního gelu = SEPARATING GEL

Do takto připravených sklíček nejprve pipetujeme první (spodní) separační gel. Pro naši práci byl použit 10% gel, nicméně lze použít i jiné koncentrace separačního gelu určené vždy dle molekulové hmotnosti stanovovaného proteinu.

Příprava 10% separačního gelu se řídila rozpisem dle tabulky pro přípravu 2 gelů (viz Tabulka 1). V prvním kroku se v kádince smísily jednotlivé složky: akrylamid (Acrylamide/Bis Solution), ultra čistá voda (miliQ H₂O), separační pufr (Separating gel buffer, 1,5 M Tris/HCl pH 8,8) a dodecylsírán sodný (10% SDS). V druhém kroku bylo nezbytné předpřipravit pipety a špičky a co nejrychleji v těsném pořadí za sebou přidat peroxidisírán amonný (10% APS) a N, N, N', N'-tetrametyl-etylendiamin (TEMED). Rychlost byla důležitá, jelikož přidáním TEMED dochází k zahájení polymerace gelu. Všechny přidané složky se opatrným vířením promíchaly tak, aby se zamezila inkorporace vzduchu do roztoku.

Připravený roztok gelu se následně pipetoval mezi sklíčka. Hrot pipety byl umístěn mezi skla podél jedné strany a postupně se přidával roztok do fáze, kdy hladina dosahovala úrovně 1,5 cm pod horní hranou kratšího sklíčka. Tímto způsobem byly napipetovány oba gely a pro minimalizaci přístupu vzduchu, vyhnání bublin a pro vyrovnání hladiny gelu byl separační gel po celé délce pokryt sekundárním butanolem (isobutanol). Doba polymerizace gelu byla různá (30-60 minut) a jako kontrola postupu polymerizace gelu nám sloužil malý zbytek gelu v kádince. Jakmile byl gel zpolymerizován, isobutanol se vylil do umyvadla, sklíčka se propláchl destilovanou vodou a pomocí gázového čtverečku byla následně odsáta přebytečná tekutina mezi sklíčky.

Tabulka 1: Rozpis separačního gelu na 2 gely

Separací gel	10%
Akrylamid/Bis Solution (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	5 ml
miliQ H₂O	9,8 ml
Separating gel buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)	5 ml
10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	200 µl
10% APS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	60 µl
TEMED (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	30 µl

Příprava zaostřovacího gelu = STACKING GEL

Stejně jako příprava separačního gelu, tak i příprava gelu zaostřovacího se řídila rozpisem na přípravu 2 gelů s koncentrací tentokrát 5 % (viz Tabulka 2). Smísily se složky: akrylamid, ultra čistá voda, zaostřovací pufr (Stacking gel buffer, 0,5 M Tris/HCl pH 6,8), SDS a těsně za sebou byly přidány APS a TEMED. Opět se roztok promísil mírným vířením a ihned byl nanesen na separační gel, a to až po okraj kratšího sklíčka. Vzápětí se do gelu zatlačil teflonový hřeben a 3 až 4 sekundy se hřeben v gelu podržel. V důsledku smrštění gelu bylo nutné každé 3 až 4 minuty doplňovat roztok do pravého i levého rohu hřebínku. Polymerizace trvala 30 až 60 minut a opět jako kontrola fáze polymerace nám byl zbytek gelu v kádince.

Tabulka 2: Rozpis zaostřovacího gelu na 2 gely

Zaostřovací gel	5%
Stacking gel buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA)	2,5 ml
MiliQ H₂O	6,15 ml
Akrylamid/Bis Solution (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	1,25 ml
10% SDS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	100 µl
10% APS (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	30 µl
TEMED (SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)	15 µl

Aplikace vzorků na gel

Podle tabulky, která byla vytvořena za pomoci počítače po spektrofotometrickém stanovení koncentrace proteinu, byly jednotlivé vzorky naředěny tak, že do nových a fixou popsaných ependorfových zkumavek se napipetoval stanovený objem vzorku a objem vody. Následně se zkumavky zvortexovaly a k takto připravenému objemu (16 µl) byl přidán stejný objem nanášecího pufru (Laemmli sample buffer). Nanášecí pufr obsahoval stacking gel buffer, milliQ H₂O, 2-merkaptoetanol, glycerol, bromfenolovou modř a 10 % SDS. Glycerol zajistil snadné nanášení vzorku do jednotlivých jamek v gelu, SDS jako anionický detergent zaručil denaturaci proteinů a získání záporného náboje a bromfenolová modř umožnila vizualizaci postupu elektroforézy (66,68).

Zředěné vzorky se následně vložily do centrifugy a poté byly na 5 minut umístěny do vodní lázně předehřáté na 95 °C. Pak se opakovala centrifugace a takto připravené vzorky mohly být nanášeny na gel.

Následovala příprava SDS elektroforetického pufru. Do odměrného válce bylo odměřeno 100 ml pufru č. 1 (10x Tris/Glycine/SDS, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) a doplněno do 1000 ml ultra čistou vodou (miliQ H₂O).

Jakmile zpolymerizoval druhý zaostřovací gel, teflonové hřebínky byly velmi opatrně a jedním směrem vytaženy z gelu, čímž vznikly zřetelné jamky pro nanášení vzorků. Pomocí pipety se jamky opatrně propláchly předem připraveným SDS elektroforetickým pufrem. Zelené stojánky se vyjmuly z průhledného stojanu a opatrným otočením dvířek se sklíčka spolu s gely ze stojánků uvolnila. Ta se následně umístila do Mini-PROTEAN® Tetra Cell nástavce tak, že kratší sklíčka směřovala dovnitř. Sklíčka s gely se následně fixovala uzavřením postranních páček a nástavec byl vložen do tanku. Prostor, který vznikl mezi sklíčky, se vyplnil připraveným SDS elektroforetickým pufrem tak, aby se jamky nacházely pod hladinou pufru. Následně byl pufrem vyplněn zbylý prostor tanku, a to po rysku označující 2 gely.

Do připraveného tanku s gely a s pufrem se nejprve na gel napipetovalo 5 µl markeru (do první jamky v gelu zleva), tedy standardu se známými molekulovými hmotnostmi (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*). Ve směru zleva doprava byly postupně napipetovány jednotlivé vzorky o objemu 14 µl tak, že špička pipety se vložila mezi sklíčka pod hladinou pufru a pomalým tempem se do jamek vpouštěly jednotlivé vzorky. Nakonec se opatrně doplnil pufr uprostřed sklíček.

10.2.3 Gelová elektroforéza

Tank obsahující nástavec s gely, nanesenými vzorky a pufrem se uzavřel víkem s elektrodami podle barevného označení (červená k červené, černá k černé) a přístroj byl zapojen ke zdroji. Na displeji se nastavily hodnoty napětí, proudu a předpokládaný čas elektroforézy (viz Tabulka 3). Jelikož se po dobu gelové elektroforézy přístroj zahříval, musel být ochlazován, a to za pomoci chladících destiček.

Bromfenolová modř, která je složkou nanášecího pufru ve vzorcích nanesených na gel, umožnila vizualizaci postupu separace. Jakmile se tzv. bromfenolové čelo přibližovalo konci gelu, bylo nutné proces pečlivě sledovat a po „vyjetí“ takového čela z gelu do pufru byl přístroj od zdroje odpojen.

Tabulka 3: Hodnoty podmínek elektroforetické separace

Napětí	200 V
Proud	120 mA
Čas	1 hod

10.2.4 Blotování (elektroforetický transfer)

Příprava membrán

Před samotným elektroforetickým transferem proteinů je nutné připravit si a aktivovat membrány. Dle šablony odpovídající velikosti gelu (s rezervou 3 mm na každé straně) byla vystřižena membrána z PVDF (Immobilon®-P PVDF Membrane, *Sigma-Aldrich Inc., MO, USA*). Membrána byla z obou stran pokryta modrou fólií zabraňující přímému dotyku a znečištění membrán. Takto nastříhané membrány jsou intaktní a před použitím je potřeba je aktivovat. Pomocí pinzety byla membrána opatrně vyjmuta z fólie a na 15 sekund byla vložena do vaničky s metanolem. S vaničkou se muselo třást, jelikož membrána není přímo smáčivá. Po uplynutí 15 vteřin byla membrána pinzetou přenesena do druhé vaničky s obsahem ultra čisté vody, kde se nechala stát, minimálně však 2 minuty. Aktivace se opakovala s druhou membránou.

Příprava transférového (blotovacího) pufru

Pro přenos proteinů z gelu na membránu je nezbytná příprava transférového pufru. Do odměrného válce se odměří 100 ml pufru č. 2 (10x Tris/Glycine/ Buffer for Western Blots and Native Gels, *Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*) a následně se doplní do 500 ml ultra čistou vodou. Přidá se 200 ml metanolu a vše se doplní čistou vodou do 1000 ml. Je důležité dodržet přesné pořadí jednotlivých roztoků, protože přidáním metanolu přímo na pufr č. 2 by došlo k jeho vysrážení.

Mokrý cesta

Pro tuto diplomovou práci byla pro elektroforetický přenos proteinů z gelu na membránu použita metoda mokré cesty za využití sady Mini Trans-Blot® Cell (*Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA*). Na černou stranu kazety, pro složení tzv. sendviče, se umístily dvě namočené černé houbičky a namočený bílý filtr. Houbičky a filtry byly

namočeny v předem připraveném transférovém pufru. Černá strana kazety představovala negativní pól a průhledná strana pól pozitivní.

Sklička, v nichž se nacházel gel, se opatrně otevřela, hřebínky gelu se odstranily a po stranách vyčnívajících pruhů delšího skla se gel od kraje skla uvolnil. Poté se skličko, a to s gelem směřujícím dolů, namáčelo ve vaničce s transférovým pufrům tak dlouho, dokud se gel do pufru neuvolnil. Gel byl následně přenesen do středu bílého filtru sendviče, na který se položila aktivovaná membrána. Jakmile byla membrána jednou na gel položena, již se s ní nesmělo hýbat. Na ni pak přišel bílý filtr a za pomoci válečku se opatrně vytlačily vzduchové bubliny. Nakonec se na filtr položily dvě černé houbičky a sendvič se uzavřel. Takto připravené kazety se umístily do stojanu podle barev tak, že černá strana kazety byla orientována k černé straně a čirá strana kazety k červené straně stojanu. Stojan byl umístěn do tanku, který byl následně doplněn transférovým pufrům, tentokrát po rysku pro 4 gely. Po uzavření tanku a zapojení elektrod ke zdroji se na přístroji nastavily hodnoty napětí, proudu a času (viz Tabulka 4). Po uplynutí doby elektroforetického transferu se membrány opatrně vyjmuly ze sendviče a umístily se do vaničky s vodou.

Tabulka 4: Hodnoty podmínek pro elektroforetický transfer

Napětí	140 V
Proud	300 mA
Čas	1,5 hod

10.2.5 Blokace, nanesení protilátek a detekce

Promývací pufr TBS-T

Pro následnou přípravu tzv. blokovacího pufru a promývání membrán bylo zapotřebí si předpřipravít promývací pufr (TBS-T). 100 ml 10 x koncentrovaného TBS (Tris buffer saline) pufru se smísilo s 900 ml ultra čisté vody, přidal se 1 ml Tween® 20 (*SERVA Electrophoresis GmbH, Německo*) a roztok se nechal mísit na míchačce.

Stříhání a blokace membrán

Membrány se vyjmuly z vaničky s vodou a musely být orientovány tak, aby umístění markeru bylo na pravé straně. Dle očekávané molekulové hmotnosti

sledovaného proteinu se v místě markeru tužkou vyznačily počáteční písmena sledovaných proteinů (viz Tabulka 5) a takto označené membrány se nastříhaly na proužky.

Tabulka 5: Molekulové hmotnosti sledovaných proteinů

Protein	Molekulová hmotnost (kDa)
Endoglin	100
eNOS	140
pSmad2/3	52-60
*GAPDH	30-40

*GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) představuje kontrolu nanášených vzorků.

Pro zamezení nespecifických reakcí mezi membránou a protilátkou se nastříhané proužky umístily do předem připraveného blokovacího pufru (TBS-T-5% mléko), který byl připraven rozpuštěním 5 g nízkotučného sušeného mléka (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) ve 100 ml promývacího pufru (TBS-T), a membrány byly blokovány po dobu 1 hodiny na třepačce. Mezitím se připravily vaničky z parafilmu pro inkubaci membrán s primární protilátkou.

Inkubace membrán s primární a sekundární protilátkou

Primární protilátky, které se specificky váží na sledovaný protein na membráně, se musely nejprve naředit na požadovanou koncentraci, a to pomocí předem připraveného blokovacího pufru (viz Tabulka 6). Poté se membrány umístily do předpřipravených vaniček z parafilmu tak, aby vyznačená písmena byla orientována směrem nahoru a ihned se na membránu napipetovala příslušná primární protilátka. Takto připravené vaničky byly umístěny na kývačku a nechaly se inkubovat do následujícího rána v lednici. Další ráno se membrány z vaniček přemístily do krabiček s promývacím pufrem (TBS-T) a po dobu 1 hodiny se membrány promývaly na kývačce, kdy každých 10 minut bylo nutné pufr vyměnit za nový. Následovala inkubace se sekundární protilátkou s navázanou HRP, která se váže na protilátku primární. Sekundární protilátky byly stejně jako primární naředěny blokovacím pufrem na stanovenou koncentraci (viz Tabulka 7) a nanášeny na membrány umístěných do nově

připravených parafilmových vaniček. Tentokrát trvala inkubace 1 hodinu, již za laboratorní teploty, a následovalo promývání stejným způsobem jako po inkubaci s primární protilátkou.

Tabulka 6: Primární protilátky a ředění

protein	Primární protilátka		
	ředění	druh	název
GAPDH	1:10000	Mouse anti GAPDH	Anti GAPDH Antibody, Mouse monoclonal (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA)
Endoglin	1:200	Goat anti Endoglin	Endoglin Antibody (M-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)
eNOS	1:200	Rabbit anti eNOS	NOS3 Antibody (C-20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)
pSmad2/3	1:1000	Rabbit anti pSmad2/3	Phospho-Smad2 (Ser465/467)/Smad3 (Ser423/425) antibody (Cell Signaling Technology, MA, USA)

Tabulka 7: Sekundární protilátky a ředění

protein	Sekundární protilátka*		
	ředění	druh	název
GAPDH	1:20000	Anti Mouse	Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA)
Endoglin	1:5000	Rabbit anti Goat	Anti-Goat IgG-Peroxidase antibody (Sigma-Aldrich Inc., MO, USA)
eNOS	1:2000	Anti Rabbit	Goat F(ab')₂ Anti-Rabbit IgG F(ab')₂ (HRP) preadsorbed (Abcam, Cambridge, Velká Británie)
pSmad2/3	1:2000	Anti Rabbit	Goat F(ab')₂ Anti-Rabbit IgG F(ab')₂ (HRP) preadsorbed (Abcam, Cambridge, Velká Británie)

**Sekundární protilátky byly označeny enzymem HRP (křenovou peroxidázou), zajišťující štěpení detekčního činidla a barevnou reakci*

Chemiluminiscenční detekce

Po promytí se jednotlivé membrány osušily a položily se na pevnou podložku s proteiny orientovanými směrem vzhůru. Při pokládání na podložku bylo důležité pracovat tak, aby se minimalizoval vznik bublin mezi membránou a podložkou. Na takto připravené membrány byly rovnoměrně nanесeny chemiluminiscenční činidla (*Thermo Fisher Scientific Inc., IL, USA*), Piko či Femto:

Piko (Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate)

Femto (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate)

Substráty se musely před nanesením na membránu nejprve připravit smísením detekčního roztoku č. 1 a č. 2 ve skleněné lahvičce v poměru 1:1 a roztok se důkladně promísil. Pro každý sledovaný protein byla určena doba expozice Piko či Femto činidla, tedy substrátů následovně štěpených křenovou peroxidázou navázanou na sekundární protilátce. Doba reakce mohla být případně upravena (viz Tabulka 8). Po uplynutí doby se činidlo z membrány nechalo okapat a membrána se ihned vložila do připravené fólie v kazetě. Pomocí gázového čtverečku byly z fólie vytlačeny přebytečné bubliny, fólie se fixovala lepící páskou a kazeta se následně uzavřela pro minimalizaci přístupu světla.

Další krok se již odehrával v temné komoře. Modrocitlivé fotografické filmy AGFA CP-BU 18x24cm (*Foma Bohemia s.r.o., Hradec Králové, Česká republika*), na nichž byl signál reakce detekován, se posupně vkládaly do kazety, a to na předem stanovenou dobu. Podle výraznosti bandů a pozadí membrán se tato doba expozice filmu mohla případně poupravit. Fotografické filmy se z kazety následně jeden za druhým vsouvaly do přístroje OPTIMAX 2010 X-Ray Film Processor (*PROTEC GmbH & Co. KG, Oberstenfeld, Německo*). Takto získané filmy s imunoreaktivními bandy byly následně naskenovány pomocí zařízení Epson Perfection V5000 Photo (*EPSON Inc., CA, USA*) a denzitometricky kvantifikovány použitím počítačového obrazového analytického programu, Imaging Software NIS-Elements AR verze 4 (*Laboratory Imaging s.r.o., Praha, Česká republika*). Následně byly získané výsledky statisticky vyhodnoceny pomocí programu GraphPad Prism 8.

Tabulka 8: Doba reakce činidla (chemiluminiscenčního substrátu)

Protein	Doba reakce činidla/úprava
GAPDH	Piko 1 minuta/ 30 sekund
Endoglin	Piko 15 minut/ 7 minut
eNOS	Piko 15 minut/ 7 minut
pSmad2/3	Femto 7 sekund

10.3 ELISA

Imunoanalytická metoda ELISA umožnila stanovit koncentrace lidského solubilního endoglinu a molekuly sVCAM-1 v plazmě jak kontrolních, tak testovaných myší, kterým byla odebrána krev.

Za využití Human Endoglin/CD 105 Quantikine ELISA Kit (*Bio-Techne R&D Systems, MN, USA*), kdy se postupovalo podle návodu uvedeným výrobcem, se následně zjistila koncentrace lidského solubilního endoglinu a stejným postupem, za použití Mouse sVCAM-1/CD 106 Quantikine ELISA Kit (*Bio-Techne R&D Systems, MN, USA*), byla určena koncentrace molekuly sVCAM-1 v plazmě sledovaných myší.

Získané výsledky v jednotkách ng/ml byly následně porovnány mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺.

10.4 Biochemická analýza

Biochemickou analýzou, po odebrání krve a získání plazmy, byly zjištěny hladiny celkového cholesterolu a triacylglycerolů v plazmě transgenních myší jak kontrolní, tak testované skupiny.

Tato koncentrace byla stanovena enzymaticky za využití diagnostických souprav (*Lachema, Brno, Česká republika*) a spektrofotometrické analýzy s přístrojem ULTROSPECT III (*Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Švédsko*). Cholesterol byl měřen při vlnové délce 510 nm a TAG při 540 nm vlnové délky.

Výsledné koncentrace byly stanoveny v jednotkách mmol/l a byly porovnány mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺.

10.5 Statistická analýza

Získané údaje se následně statisticky vyhodnotily pomocí počítačového programu GraphPad Prism 8 (verze 8.1.0, *GraphPad Software, Inc., CA, USA*) a výsledky byly vyjádřeny jako průměr \pm SEM (standard error of mean), tedy standardní chyba průměru.

Zda byly rozdíly mezi sledovanými skupinami statisticky významné, to bylo vyhodnoceno pomocí neparametrického T-testu, kdy výsledné *hodnoty p* (hodnoty statistické významnosti) byly považovány za statisticky signifikantní, jestliže se rovnaly nebo byly menší než 0,05.

11 Výsledky

11.1 Western blot analýza

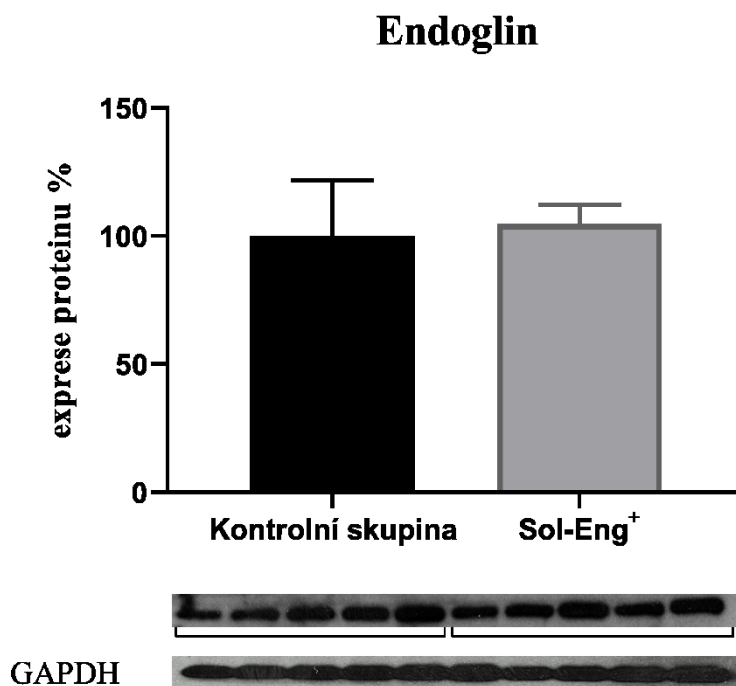
Jednotlivé vzorky aortální tkáně získaných ze samců transgenních myší byly použity pro analýzu Western blot za účelem vyhodnocení rozdílnosti exprese proteinů endoglin, eNOS a pSmad2/3. Hodnoty ukazující úroveň exprese těchto proteinů jsou uvedeny jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM) v %.

Přesnost nanesených vzorků na gel byla potvrzena detekcí proteinu GAPDH a následné kvantitativní vyhodnocení imunoreaktivních bandů každého proteinu bylo přepočítáno na signál tohoto proteinu (GAPDH). Tím se zajistila přesnost konečných výsledků.

ENDOGLIN

Western blot analýza neprokázala signifikantní rozdíl v expresi endoglinu v aortě myší mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺ (100,00 ± 22,00 % vs. 104,70 ± 7,52 %) (viz sloupce Grafu 1).

Graf 1: Expese membránového endoglinu v aortě kontrolních a Sol-Eng⁺ myší



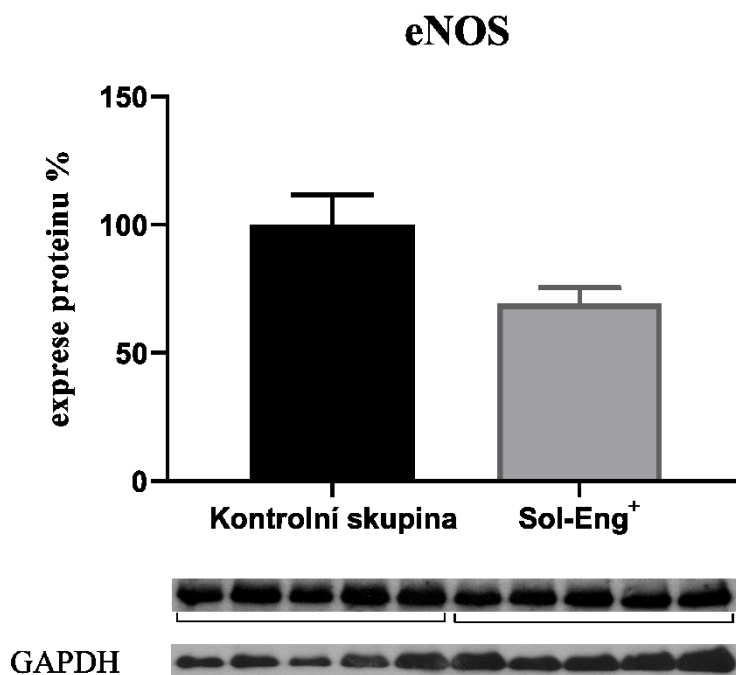
Kontrolní skupina představuje samce transgenního modelu myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje samce transgenního modelu myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl expese membránového endoglinu.

Pod grafem je znázorněn reprezentativní snímek detekce expese proteinu membránového endoglinu, vždy 5 bandů pro skupinu kontrolní a 5 bandů pro skupinu testovanou znázorněny ve snímku. Spodní snímek představuje reprezentativní detekci GAPDH.

eNOS

Analýza Western blot nepotvrdila statisticky významný rozdíl v expresi eNOS v aortě mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺ ($100,00 \pm 11,68\%$ vs. $69,35 \pm 6,20\%$) (viz sloupce Grafu 2).

Graf 2: Expresse enzymu eNOS v aortě kontrolních a Sol-Eng⁺ myší



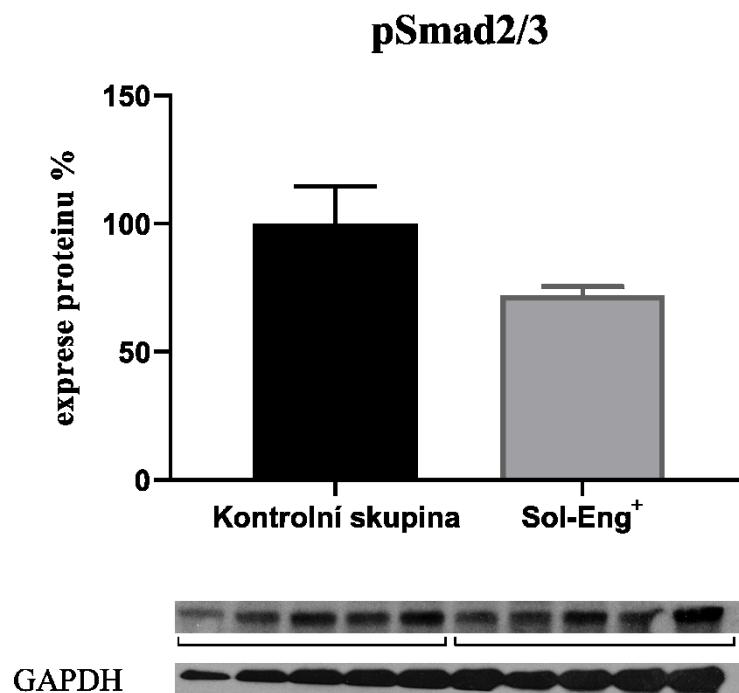
Kontrolní skupina představuje samce transgenního modelu myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje samce transgenního modelu myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl exprese enzymu eNOS.

Pod grafem je znázorněn reprezentativní snímek detekce exprese proteinu eNOS, vždy 5 bandů pro skupinu kontrolní a 5 bandů pro skupinu testovanou znázorněny ve snímku. Spodní snímek představuje reprezentativní detekci GAPDH.

pSmad2/3

Poslední sledovanou expresí pomocí Western blot analýzy byla exprese fosforylované formy Smad2/3. Ani zde nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v expresi pSmad2/3 v aortě mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺ ($100,00 \pm 14,68 \%$ vs. $72,13 \pm 3,40 \%$) (viz sloupce Grafu 3).

Graf 3: Expese pSmad2/3 v aortě kontrolních a Sol-Eng⁺ myší



Kontrolní skupina představuje samce transgenního modelu myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje samce transgenního modelu myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl expese pSmad2/3.

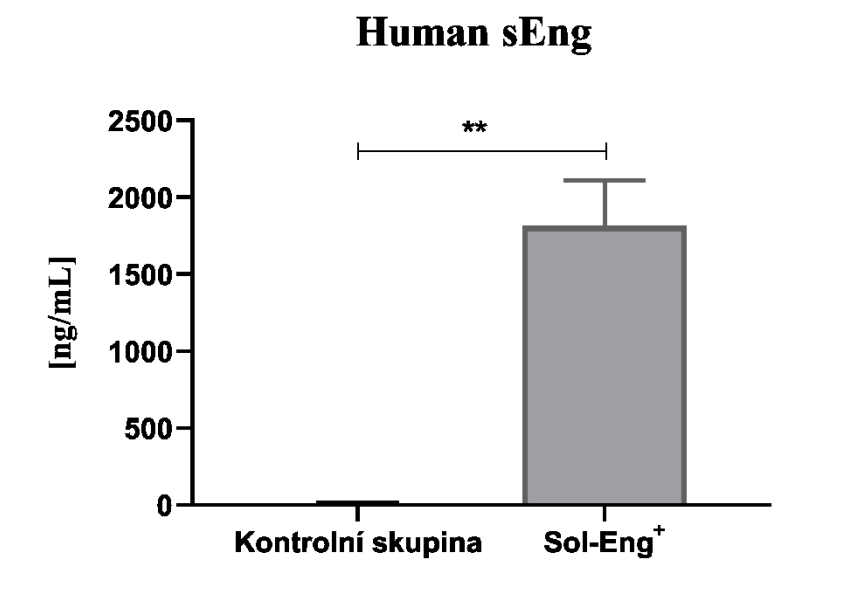
Pod grafem je znázorněn reprezentativní snímek detekce expese pSmad2/3, vždy 5 bandů pro skupinu kontrolní a 5 bandů pro skupinu testovanou znázorněny ve snímku. Spodní snímek představuje reprezentativní detekci GAPDH.

11.2 ELISA

Metodou ELISA byl potvrzen signifikantní rozdíl plazmatických koncentrací lidského solubilního endoglinu mezi sledovanými skupinami. Plazmatická koncentrace lidského solubilního endoglinu byla signifikantně vyšší u myší Sol-Eng⁺ (1818,00 ± 291,60 ng/ml) v porovnání se skupinou kontrolní (5,74 ± 11,76 ng/ml), ukázáno v Grafu 4.

Analýzou nebyl prokázán signifikantní rozdíl plazmatické koncentrace molekuly sVCAM-1 mezi kontrolní (474,80 ± 25,26 ng/ml) a testovanou Sol-Eng⁺ (421,90 ± 19,28 ng/ml) skupinou, znázorněno Grafem 5. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr ± SEM v ng/ml.

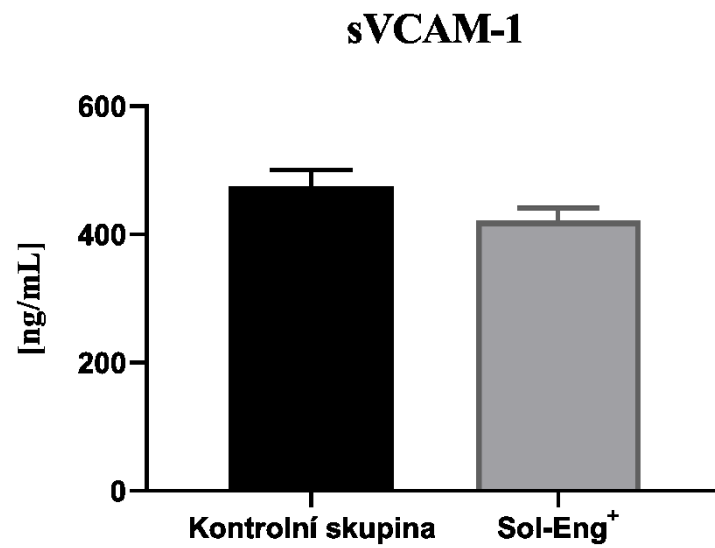
Graf 4: Koncentrace lidského solubilního endoglinu v plazmě myší



Graf ukazuje signifikantní rozdíl plazmatické koncentrace lidského solubilního endoglinu mezi kontrolní a testovanou Sol-Eng⁺ skupinou. Hodnota statistické významnosti (hodnota p) je $\leq 0,01$, proto je graf označen **.

Kontrolní skupina je znázorněna levým sloupcem a testovaná skupina Sol-Eng⁺ sloupcem pravým. Pravý sloupec vykazuje jednoznačně vyšší hladinu solubilního endoglinu v plazmě v porovnání s levým sloupcem.

Graf 5: Koncentrace sVCAM-1 v plazmě kontrolních a Sol-Eng⁺ myší



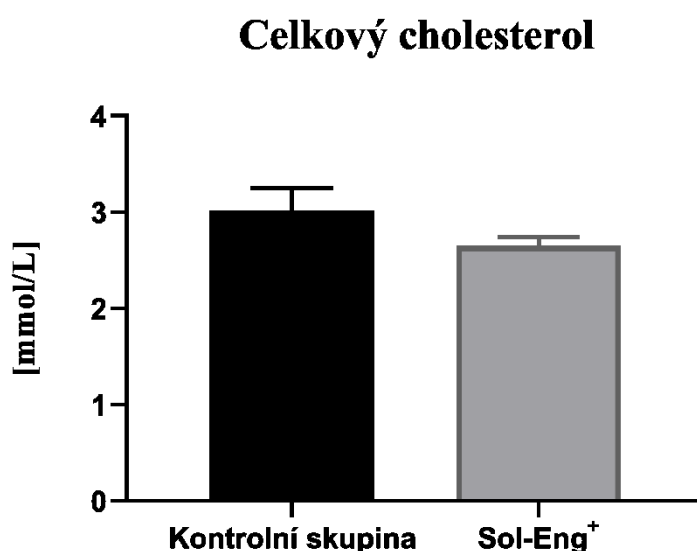
Kontrolní skupina je znázorněna levým sloupcem a testovaná skupina Sol-Eng⁺ sloupcem pravým. Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl hladin molekuly sVCAM-1 v plazmě.

11.3 Biochemická analýza

Biochemická analýza neukázala signifikantní rozdíl v hladině celkového cholesterolu v plazmě mezi skupinou testovanou Sol-Eng⁺ ($2,66 \pm 0,09$ mmol/l) a skupinou kontrolní ($3,02 \pm 0,24$ mmol/l) (viz Graf 6).

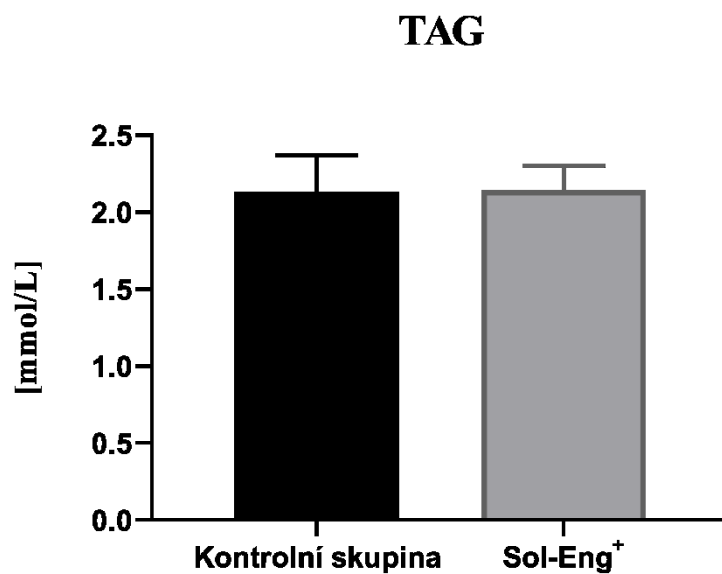
Stejně tak nebyly zaznamenány statisticky významné rozdíly v celkové hladině TAG v plazmě mezi Sol-Eng⁺ testovanou ($2,15 \pm 0,16$ mmol/l) a kontrolní skupinou myší ($2,13 \pm 0,24$ mmol/l) (viz Graf 7). Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM v mmol/l.

Graf 6: Hladiny celkového cholesterolu v plazmě myší



Kontrolní skupina představuje transgenní model myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje transgenní model myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hladině celkového cholesterolu v plazmě.

Graf 7: Celkové hladiny TAG v plazmě myší

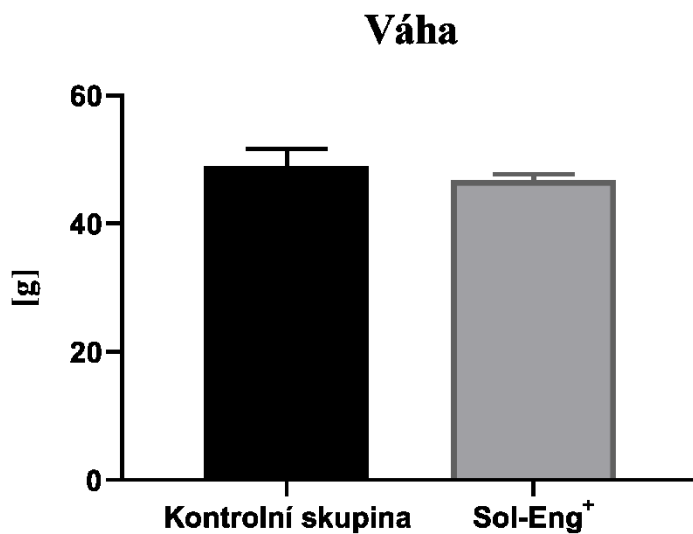


Kontrolní skupina představuje transgenní model myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje transgenní model myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v hladině TAG v plazmě.

11.4 Váha

Také váhy transgenních myší byly statisticky vyhodnoceny. Nebyly však prokázány signifikantní rozdíly mezi kontrolní a testovanou skupinou Sol-Eng⁺ ($49,00 \pm 2,67$ g vs. $46,85 \pm 0,93$ g), znázorněno Grafem 8. Hodnoty jsou uvedeny jako průměr \pm SEM v gramech.

Graf 8: Váhy kontrolních a Sol-Eng⁺ myší



Kontrolní skupina představuje transgenní model myší s nízkou hladinou solubilního endoglinu (levý sloupec), Sol-Eng⁺ skupina představuje transgenní model myší s vysokou hladinou solubilního endoglinu (pravý sloupec). Mezi skupinami nebyl zaznamenán signifikantní váhový rozdíl.

12 Diskuze

Endotelová dysfunkce je považována za první a také stěžejní krok při rozvoji aterosklerózy. Je spojována zejména s poškozenou endoteliem zprostředkovanou vazodilatací, za kterou je zodpovědný produkt endotelových buněk, oxid dusnatý (NO). Endotel zajišťuje produkci NO, a to díky aktivitě endotelové NO syntázy, enzymu eNOS, který představuje jeden z nejdůležitějších faktorů zabezpečující normální relaxaci cév (18,70). Bylo prokázáno, že pokles v expresi membránového endoglinu je spojen s oslabenou na NO závislou vazodilatací a se sníženou expresí eNOS (51,71). Navíc jiná studie ukázala, že endoglin ovlivňuje expresi eNOS v endotelových buňkách přes Smad2/3 transkripční faktory, a to bez účasti TGF- β (52).

Existuje několik studií, které sledovaly hladiny solubilního endoglinu v krvi u pacientů trpících hypercholesterolémií a aterosklerózou (72–74). Nicméně první důkaz zvýšených hladin solubilního endoglinu u pacientů s hypercholesterolémií nám přinesla studie autorů *Blann et al.* (55). Kromě toho, vysoké hladiny solubilního endoglinu korelovaly s hyperglykemií, zvýšeným systolickým krevním tlakem, pulzním tlakem, rychlostí pulzové vlny a hypertrofií levé komory, která byla vyhodnocena elektrokardiografií, u pacientů s hypertenzí a diabetem mellitem s vysokým kardiovaskulárním rizikem. Autoři této studie ukázali, že solubilní endoglin je ukazatel cévních patologií v souvislosti s hypertenzí a diabetem, tedy, že solubilní endoglin je markerem endotelové dysfunkce a poškození kardiovaskulárního systému (37).

Změny v expresi endoglinu reflektují možné patologické procesy tykající se kardiovaskulárního systému. Předchozí práce naznačují, že hypercholesterolémie a progrese aterosklerózy velmi úzce souvisí právě se sníženou expresí endoglinu v myši aortě (75,76). Navíc bylo prokázáno, že signalizace membránového endoglinu vedoucí přes transkripční faktory Smad2/3 ovlivňuje expresi enzymu eNOS a jeho stabilitu (52) a že snížená exprese endoglinu má za následek poškozenou na eNOS závislou vazodilataci (35,51). Nedávno se ukázalo, že kombinace vysokých hladin solubilního endoglinu s mírnou hypercholesterolémií způsobí narušení fyziologických cévních funkcí v aortě myši spolu se změnami v endoglin/Smad2/3/eNOS signalizaci (56). Společně tak můžeme předpokládat, že změna v expresi endoglinu souvisí s potenciálním rozvojem či

progresí endotelové dysfunkce, což naznačuje významné postavení tohoto proteinu jako ochranného prvku endotelu cév.

Na druhou stranu, v práci *Nemeckova et al.* bylo prokázáno, že krátkodobá expozice vysokých hladin solubilního endoglinu neovlivnila endotel, a to jak z funkčního, tak i z morfologického hlediska. Také v signalizaci endoglin, Smad2/3, eNOS nebyly odhaleny žádné signifikantní změny (29).

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit, zda dlouhodobá, a to konkrétně 12měsíční expozice vysokých hladin solubilního endoglinu ovlivní expresi proteinů zúčastněných v signální dráze membránového endoglinu, tedy expresi endoglin/eNOS/pSmad2/3 proteinů.

Biochemická analýza nezaznamenala žádné signifikantní rozdíly hladin celkového cholesterolu a TAG mezi kontrolními a Sol-Eng⁺ myšmi. Tedy podle těchto výsledků můžeme usoudit, že vysoké hladiny solubilního endoglinu neovlivňují lipidový metabolismus. Rovněž analýzou Western blotu nebyly prokázány žádné změny v expresi endoglin/eNOS/pSmad2/3 proteinů v myší aortě. Jak bylo výše zmíněno, exprese proteinů endoglin/eNOS/Smad2/3 a jejich signalizace by měla být rozhodující pro správnou funkci endotelu. Dle výsledků této práce to vypadá, že ani 12měsíční působení solubilního endoglinu nemá vliv na endotel krevních cév. Tudíž se zdá, že k tomu, aby došlo k ovlivnění exprese proteinů endoglin/eNOS/Smad2/3, jejich signalizaci a s tím související zhoršení endotelové dysfunkce, je nezbytná kombinace vysokotukové diety, která vyústí v mírnou hypercholesterolémii, spolu s vysokými hladinami solubilního endoglinu, což bylo nedávno publikováno (56).

V každém případě, výsledky této diplomové práce ukazují, že dokonce ani dlouhodobé působení vysokých hladin solubilního endoglinu neovlivnilo hladiny cholesterolu, hladiny TAG a expresi proteinů endoglin, eNOS a pSmad2/3 a s nimi související signalizaci, což naznačuje, že solubilní endoglin může působit škodlivě pouze v kombinaci s dalšími rizikovými faktory aterosklerózy.

13 Závěr

Cílem práce bylo sledovat a vyhodnotit vliv dlouhodobého (12měsíčního) působení vysoké hladiny solubilního endoglinu na signalizaci membránového endoglinu, tedy stanovit a porovnat expresi proteinů zúčastněných v této signalizaci: endoglin, eNOS a pSmad2/3 v aortě myší mezi skupinou kontrolní (transgenní samci s nízkou hladinou lidského solubilního endoglinu) a skupinou testovanou (transgenní samci s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu, Sol-Eng⁺). Jedinci z obou skupin byli staří 12 měsíců a po tuto dobu byli krmeni běžnou laboratorní dietou.

Western blot analýzou nebyly v aortě těchto myší zaznamenány signifikantně významné rozdíly v expresi membránového endoglinu, enzymu eNOS a pSmad2/3 mezi kontrolní a testovanou Sol-Eng⁺ skupinou, z čehož vyplývá, že signalizace membránového endoglinu vedoucí přes transkripční faktory Smad2/3 k expresi eNOS nebyla vlivem dvanáctiměsíčního působení vysoké hladiny solubilního endoglinu ovlivněna.

Rovněž biochemickou analýzou nebyly zpozorovány statisticky signifikantní rozdíly hladin cholesterolu a TAG, tudíž vysoké hladiny solubilního endoglinu neovlivnily lipidový metabolismus. Stejně tak analýzou ELISA nebyl prokázán signifikantní rozdíl hladin solubilní formy molekuly VCAM-1 mezi skupinou kontrolní a skupinou testovanou. Mezi těmito skupinami byly signifikantní pouze rozdíly hladin lidského solubilního endoglinu.

Práci jsme ukázali, že vysoká hladina solubilního endoglinu v plazmě nemá za následek zhoršení funkčnosti endotelu u Sol-Eng⁺ myší starých 12 měsíců. U těchto myší nedošlo během dlouhodobého (12měsíčního) působení vysokých hladin solubilního endoglinu ke změně v endoglin/Smad2/3/eNOS signalizaci a s ní spojenou narušenou NO zprostředkovanou regulaci cévního tonu a homeostázy cévního systému.

14 Seznam obrázků

Obrázek 1: Porovnání stavby tepen a žil.....	14
Obrázek 2: Syntéza NO a relaxace hladké svalové buňky	18
Obrázek 3: Model regulace angiogeneze endoglinem	27
Obrázek 4: Uvolnění extracelulární domény endoglinu do cirkulace.....	29
Obrázek 5: Elektroforetický transfer metodou mokré cesty.....	36

15 Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozpis separačního gelu na 2 gely	41
Tabulka 2: Rozpis zaostřovacího gelu na 2 gely.....	42
Tabulka 3: Hodnoty podmínek elektroforetické separace	44
Tabulka 4: Hodnoty podmínek pro elektroforetický transfer	45
Tabulka 5: Molekulové hmotnosti sledovaných proteinů	46
Tabulka 6: Primární protilátky a ředění	47
Tabulka 7: Sekundární protilátky a ředění.....	47
Tabulka 8: Doba reakce činidla (chemiluminiscenčního substrátu)	49

16 Seznam grafů

Graf 1: Expres membránového endoglinu v aortě kontrolních a Sol-Eng ⁺ myší	51
Graf 2: Expres enzymu eNOS v aortě kontrolních a Sol-Eng ⁺ myší.....	52
Graf 3: Expres pSmad2/3 v aortě kontrolních a Sol-Eng ⁺ myší.....	53
Graf 4: Koncentrace lidského solubilního endoglinu v plazmě myší	54
Graf 5: Koncentrace sVCAM-1 v plazmě kontrolních a Sol-Eng ⁺ myší	55
Graf 6: Hladiny celkového cholesterolu v plazmě myší	56
Graf 7: Celkové hladiny TAG v plazmě myší.....	57
Graf 8: Váhy kontrolních a Sol-Eng ⁺ myší	58

17 Seznam zkratek

AA	kyselina arachidonová
ADMA	asymetrický dimethylarginin
ADP	adenosindifosfát
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
Ach	acetylcholin
ALK	activin-like kinázové receptory
ApoE-/-	apolipoprotein E deficientní model myši
APS	peroxodisíran amonný
ATP	adenosintrifosfát
BH4, BH2	kofaktor tetrahydrobiopterin a produkt oxidace
BK	bradykinin
CD105	endoglin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
Co-Smad	tzv. common partner Smad protein
COX	cyklooxygenáza
EB	endotelové buňky
ED	endotelová dysfunkce
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
eNOS	endotelová syntáza oxidu dusnatého
ER	endoplazmatické retikulum
ET-1	endotelin-1
ET _A , ET _{B1} , ET _{B2}	receptory pro endotelin-1

FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
GTP	guanosintrifosfát
HRP	horseradish peroxidáza, křenová peroxidáza
Hsp90	heat shock protein 90
ICAM	intracelulární adhezní molekula
iNOS	indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
I-Smad	inhibiční protein Smad
LDLr-/-	LDL receptor deficientní model myši
LOX-1	receptory pro oxidované LDL
MilliQ H ₂ O	ultra čistá voda
MMP	enzym matrix metaloproteináza
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukováná forma)
NO	oxid dusnatý
nNOS	neuronální syntáza oxidu dusnatého
PGI ₂	prostacyklin
PGH ₂	prostaglandin H ₂
PKC	proteinkináza C
PVDF	polyvinylidenfluoridová membrána
RIPA	lyzační pufr
ROS	reaktivní molekuly kyslíku
RPM	otáčky za minutu (revolutions per minute)

R-Smad	receptory regulovaný Smad protein
SDS	dodecylsírán sodný
SEM	standardní chyba průměru
sGC	solubilní guanylátcykláza
Smad	transkripční faktor
Sol-Eng ⁺	transgenní model myši s vysokou hladinou lidského solubilního endoglinu
TAG	triacylglyceroly
TBS-T	promývací pufr
TBS-T-5 %	blokovací pufr
TEMED	tetrametyletylendiamin
TGF- β 1,2,3	transformující růstové faktory
TXA ₂	tromboxan
VCAM	vaskulární buněčná adhezní molekula
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
ZP	zona pellucida

18 Seznam použité literatury

1. Sima A V, Stancu CS, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. *Cell Tissue Res.* 2009;335:191–203.
2. Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2012;224:4–11.
3. *InformedHealth.org* [online]. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG), 2006-. 2010 [citován 4. březem 2019]. How does the blood circulatory system work? Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279250/>
4. Klika E. *Histológia: učebnica pre lekárske fakulty*. 1. vydání. Martin: Osveta; 1988. 189–204 s.
5. Junqueira LCU, Kelley J, Carneiro OR. *Basic histology*. 9th ed. Stamford: Appleton & Lange; 1988. 202–214 s. ISBN: 0-8385-0590-2
6. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. 3rd ed. Saunders/Elsevier; 2007. 251–267 s. ISBN: 978-0-8089-2356-5
7. Open Stax College. *Anatomy and Physiology* [online]. OpenStax CNX. 2013 [citován 4. březem 2019]. Structure and Function of Blood Vessels. Dostupné z: <https://cnx.org/contents/FPtK1zmh@11.1:WNsszrPZ@5/Structure-and-Function-of-Blood-Vessels>
8. Paulsen DF. *Histologie a buněčná biologie: opakování a příprava ke zkouškám*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství H & H Vyšehradská, s. r. o.; 2004. 156–162 s. ISBN: 80-7319-024-9
9. Lüllmann-Rauch R. *Histologie*. 3. vydání. Praha: Grada; 2012. 211–222 s. ISBN: 978-80-247-3729-4
10. Féléto M. *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators* [online]. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. 2011 [citován 4. březem 2019]. Chapter 1, Introduction. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57145/>

11. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth*. 2004;93(1):105–13.
12. Yan XC, Cao J, Liang L, Wang L, Gao F, Yang Z, et al. miR-342-5p Is a Notch Downstream Molecule and Regulates Multiple Angiogenic Pathways Including Notch, Vascular Endothelial Growth Factor and Transforming Growth Factor b Signaling. *J Am Hear Assoc*. 2016;5(2):e003042.
13. Kerr P, Tam R, Plane F. Endothelium. In: Fitridge R, Thompson M, editors. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists* [online]. Adelaide (AU): University of Adelaide Press. 2011 [citován 9. březen 2019]. 1. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534266/>
14. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9(10):1057–69.
15. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed Res Int*. 2014;2014:801896.
16. Sandoo A, van Zanten JJCSV, Metsios GS, Carroll D, Kitis GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J*. 2010;4:302–12.
17. Nachtigal P, Pospisilova N, Vecerova L, Micuda S, Brcakova E, Pospechova K, et al. Atorvastatin Increases Endoglin, SMAD2, Phosphorylated SMAD2/3 and eNOS Expression in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *J Atheroscler Thromb*. 2009;16(3):265–74.
18. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. 2004;109(23 Suppl 1):III27–32.
19. Fleming I, Busse R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res*. 1999;43(3):532–41.
20. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012;33(7):829–837, 837a–837d.

21. Yang Z, Ming X. Recent advances in understanding endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Clin Med Res*. 2006;4(1):53–65.
22. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci*. 2004;117(12):2427–9.
23. Su JB. Vascular endothelial dysfunction and pharmacological treatment. *World J Cardiol*. 2015;7(11):719–41.
24. Bolad I, Delafontaine P. Endothelial dysfunction: its role in hypertensive coronary disease. *Curr Opin Cardiol*. 2005;20(4):270–4.
25. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(8):1983–92.
26. Matsuzawa Y, Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment. *Coron Artery Dis*. 2014;25(8):713–24.
27. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME, Brock RW, Frisbee JC. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction : interventional strategies. *J Inflamm*. 2010;7:54.
28. Hadi HAR, Suwaidi J Al. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(6):853–76.
29. Nemeckova I, Serwaczak A, Oujó B, Jezkova K, Rathouska J, Fikrova P, et al. High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119665.
30. López-Nova JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2010;299(4):H959–74.
31. Jang Y-S, Choi I-H. Contrasting Roles of Different Endoglin Forms in Atherosclerosis. *Immune Netw*. 2014;14(5):237–40.
32. Bot PTG, Hoefer IE, Sluijter JPG, van Vliet P, Smits AM, Lebrin F, et al. Increased expression of the transforming growth factor-beta signaling pathway, endoglin, and early growth response-1 in stable plaques. *Stroke*. 2009;40(2):439–47.
33. Kapur NK, Morine KJ, Letarte M. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular

- health. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:195–206.
34. Valluru M, Staton CA, Reed MWR, Brown NJ. Transforming growth factor- β and endoglin signaling orchestrate wound healing. *Front Physiol.* 2011;2:89.
 35. Toporsian M, Gros R, Kabir MG, Vera S, Govindaraju K, Eidelman DH, et al. A role for endoglin in coupling eNOS activity and regulating vascular tone revealed in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Circ Res.* 2005;96(6):684–92.
 36. Llorca O, Trujillo A, Blanco F, Bernabeu C. Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007;365:694–705.
 37. Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, et al. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 2010;8:86.
 38. Ten Dijke P, Goumans MJ, Pardali E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. *Angiogenesis.* 2008;11:79–89.
 39. Bernabeu C, Conley BA, Vary CPH. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 2007;102(6):1375–88.
 40. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Langa C, Bernabéu C. Endoglin expression is regulated by transcriptional cooperation between the hypoxia and transforming growth factor- β pathways. *J Biol Chem.* 2002;277(46):43799–808.
 41. Li C, Guo B, Ding S, Rius C, Langa C, Kumar P, et al. TNF alpha down-regulates CD105 expression in vascular endothelial cells: a comparative study with TGF beta 1. *Anticancer Res.* 2003;23(2B):1189–96.
 42. Ellis LM, Samuel S, Fan F, Gray MJ, Lim SJ, Dallas NA, et al. Endoglin (CD105): A Marker of Tumor Vasculature and Potential Target for Therapy. *Clin Cancer Res.* 2008;14(7):1931–7.
 43. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming Growth Factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling Introduction: The biology of TGF- β . *J Mol Cell*

Cardiol. 2011;51(4):600–6.

44. Barbara NP, Wrana JL, Letarte M, Barbara NP, Wrana JL, Letarte M. Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of Multiple Members of the Transforming Growth Factor- β Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex. *J Biol Chem.* 1999;274(2):584–94.
45. Finnsen KW, Parker WL, Chi Y, Hoemann CD, Goldring MB, Antoniou J, et al. Endoglin differentially regulates TGF- β -induced Smad2/3 and Smad1/5 signalling and its expression correlates with extracellular matrix production and cellular differentiation state in human chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2010;18(11):1518–27.
46. Nachtigal P, Vecerova L, Pospisilova N, Micuda S, Brckova E, Hernandez EN, et al. Endoglin co-expression with eNOS, SMAD2 and phosphorylated SMAD2/3 in normocholesterolemic and hypercholesterolemic mice: An immunohistochemical study. *Histol Histopathol.* 2009;24(12):1499–506.
47. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Dijke P Ten. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* 2000;267:6954–67.
48. Laake LW Van, Driesche S Van Den, Post S, Feijen A, Jansen MA, Driessens MH, et al. Endoglin Has a Crucial Role in Blood Cell – Mediated Vascular Repair. *Circulation.* 2006;114(21):2288–97.
49. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF- β receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 2005;65:599–608.
50. Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RLC, Valdimarsdottir G, Thorikay M, et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004;23(20):4018–28.
51. Jerkic M, Rivas-Elena J V., Prieto M, Carrón R, Sanz-Rodríguez F, Pérez-Barriocanal F, et al. Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *FASEB J.* 2004;18(3):609–11.

52. Santibanez JF, Letamendia A, Perez-Barriocanal, Fernando et al. Endoglin Increases eNOS Expression by Modulating Smad2 Protein Levels and Smad2-Dependent TGF- β Signaling. *J Cell Physiol.* 2007;210(2):456–68.
53. Jezkova K, Rathouska J, Nemeckova I, Dolezelova E, Fikrova P, Varejckova M, et al. High Levels of Soluble Endoglin Induce a Proinflammatory and Oxidative-Stress Phenotype Associated with Preserved NO-Dependent Vasodilatation in Aortas from Mice Fed a High-Fat Diet. *J Vasc Res.* 2016;53(3–4):149–62.
54. Rathouska J, Jezkova K, Nemeckova I, Nachtigal P. Soluble endoglin, hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Atherosclerosis.* 2015;243:383–8.
55. Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1996;120(1–2):221–6.
56. Vitverova B, Blazickova K, Najmanova I, Vican M, Hyšpler R, Dolezelova E, et al. Soluble endoglin and hypercholesterolemia aggravate endothelial and vessel wall dysfunction in mouse aorta. *Atherosclerosis.* 2018;271:15–25.
57. Veseli BE, Perrotta P, Meyer GRA De, Roth L, Donckt C Van Der, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2017;816:3–13.
58. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55(3):503–17.
59. Daugherty A. Mouse Models of Atherosclerosis. *Med Sci.* 2002;323(1):3–10.
60. Smith JD, Breslow JL. The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med.* 1997;242(2):99–109.
61. Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci.* 2001;6:D515–525.
62. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, Weij JDV Der, Hoorn V Der, Princen HM, et al. Mouse Models for Atherosclerosis and Pharmaceutical Modifiers. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2007;27(8):1706–21.
63. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science.* 1996;272(5262):685–8.

64. Ruiz-remolina L, Ollauri-iba C, Pe F, Lo M, Pericacho M, Rodri A. Circulating soluble endoglin modifies the inflammatory response in mice. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188204.
65. Eslami A, Lujan J. Western blotting: sample preparation to detection. *J Vis Exp*. 2010;(44):2359.
66. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429–34.
67. Ghosh R, Gilda JE, Gomes A V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(5):549–60.
68. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec*. 2012;295:369–71.
69. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(1):4–25.
70. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*. 2008;49(4–6):134–40.
71. Jerkic M, Rodriguez-Barbero A, Prieto M, Toporsian M, Pericacho M, Rivas-Elena J V, et al. Reduced angiogenic responses in adult Endoglin heterozygous mice. *Cardiovasc Res*. 2006;69(4):845–54.
72. Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, et al. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2008;197(1):264–70.
73. Perucci LO, Gomes KB, Freitas LG, Godoi LC, Alpoim PN, Pinheiro MB, et al. Soluble endoglin, transforming growth factor-Beta 1 and soluble tumor necrosis factor alpha receptors in different clinical manifestations of preeclampsia. *PLoS One*. 2014;9(5):e97632.
74. Valbuena-diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Castrillo A, Bernabeu C. Oxysterol-Induced Soluble Endoglin Release and Its Involvement in Hypertension.

Circulation. 2012;126:2612–24.

75. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brcakova E, Kudlackova Z, et al. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J*. 2011;75(7):1747–55.
76. Vecerova L, Strasky Z, Rathouska J, Slanarova M, Brcakova E, Micuda S, et al. Activation of TGF-beta receptors and Smad proteins by atorvastatin is related to reduced atherogenesis in ApoE/LDLR double knockout mice. *J Atheroscler Thromb*. 2012;19(2):115–26.