

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Katedra Fyziologie živočichů



**Eliška Misárková**

Spřažení excitace-kontrakce a excitace-transkripce v buňkách hladkého svalu cév: změny  
u experimentální hypertenze a při přestavbě cév

Excitation-Contraction and Excitation-Transcription Coupling in Vascular Smooth Muscle  
Cells: Alterations in Experimental Hypertension and Vascular Remodeling

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: MUDr. Josef Zicha, DrSc.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 22.8.2013

Podpis

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce MUDr. Josefu Zichovi, DrSc. za trpělivost a cenné rady, kterých bylo při psaní práce potřeba. Poděkování patří také Mgr. Michalu Behuliakovi, PhD. za finální korekce práce a RNDr. Jitce Žurmanové, Ph.D., která byla garantem bakalářské práce v rámci fakulty.

## Abstrakt

Cévní hladkosvalové buňky vykazují značnou fenotypovou plasticitu. Podle potřeby jsou schopny změnit svůj fenotyp z kontraktilního do proliferujícího *in vivo*. Důležité je, že během fenotypového přepnutí nastává změna v expresi transportních proteinů a kanálů, které ve výsledku významně mění  $\text{Ca}^{2+}$  signalizaci hladkosvalových buněk. V diferencovaných buňkách, které představují kontraktilní fenotyp, převládají prudké, krátce trvající výkyvy v koncentraci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+i}$ ), ale klidová  $\text{Ca}^{2+i}$  koncentrace zůstává na nízké úrovni. Tyto  $\text{Ca}^{2+i}$  výkyvy jsou v diferencovaných buňkách způsobeny převážně dvěma komponentami  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace: 1) influx extracelulárního vápníku přes vysokovodivostní napětově ovládané kanály v plazmatické membráně a 2) uvolnění vnitřních zásob vápníku ze sarkoplazmatického retikula přes ryanodinové receptory. Vzniklé oscilace  $\text{Ca}^{2+i}$  jsou rychle redukovány četnými  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázami plazmatické membrány a sarko/endoplazmatického retikula. Proliferující cévní hladkosvalové buňky vykazují pomalé a dlouhotrvající výkyvy  $\text{Ca}^{2+i}$  doprovázené zvýšenou basální koncentrací intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Během přepnutí z kontraktilního fenotypu do proliferujícího fenotypu dochází k snížení aktivity  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáz, zvýšené úloze  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů závislých na vnitřních zásobách vápníku a náhradě vysokovodivostních napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů transientními napětově ovládanými  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Uvedené rozdíly jsou důsledkem změny genové exprese závislé na transkripčních faktorech, hlavně na CRE-vázajícím proteinu a jaderném faktoru aktivovaných T-lymfocytů (NFAT). U cévních hladkosvalových buněk spontánně hypertenzních krys (SHR) jsou patrné některé abnormality, které jsou typické pro proliferující fenotyp. Na druhé straně SHR potkani jsou charakterizováni významnou úlohou L-VGCC při cévní kontrakci, což je vlastnost typická pro diferencované (kontraktilní) buňky.

**Klíčová slova:** cévní hladkosvalové buňky; fenotypové přepnutí;  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace; hypertenze

## Abstract

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) express considerable phenotype plasticity. They are able to change their phenotype *in vivo* if necessary. It is important to know that during this phenotype switch the expression of transport proteins and channels is modified, which results in significant alteration of  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in smooth muscle cells. In differentiated cells, which represent contractile phenotype, there are dominant rapid, transient events in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $\text{Ca}^{2+i}$ ), while the resting cytosolic  $\text{Ca}^{2+i}$  concentration is low. In differentiated cells these  $\text{Ca}^{2+i}$  events are mainly caused by two components of the  $\text{Ca}^{2+}$  signalling pathways: 1) extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx *via* L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (L-type VGCC) in plasma membrane, and 2) depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores *via* ryanodin receptors located on sarcoplasmic reticulum. Rapid  $\text{Ca}^{2+i}$  oscillations are quickly reduced by numerous  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases of sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane. Proliferating vascular smooth muscle cells are characterized by a long-lasting  $\text{Ca}^{2+i}$  oscillations accompanied by sustained elevation of basal intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. During phenotype switch from contractile phenotype to proliferative phenotype there is decreased  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity, and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry is elevated. This is accompanied by the replacement of L-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels with T-type voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. These changes are due to altered gene expression, which is dependent on transcription factors, mainly on CRE-binding protein and nuclear factor of activated T-lymphocytes (NFAT). Vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats (SHR) have some characteristics similar to the proliferative phenotype. On the other hand SHR are characterized by important role of L-type VGCC with T-type VGCC, in vascular contraction which is typical for differentiated (contractile) VSMCs.

**Keywords:** vascular smooth muscle cells; phenotype switch;  $\text{Ca}^{2+}$  signaling; hypertension

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Cévní hladkosvalové buňky – kontrakce a dilatace</b> .....	<b>3</b>
2.1	Vasokonstrikce .....	3
2.1.1	Angiotenzin II.....	3
2.1.2	Endotelin-1 .....	4
2.1.3	Norepinefrin .....	4
2.2	Vasodilatace .....	6
2.2.1	Oxid dusnatý.....	6
2.2.2	Prostacyklin .....	6
2.2.3	$\beta$ -adrenergní systémy .....	6
<b>3</b>	<b>Plně diferencované cévní hladkosvalové buňky</b> .....	<b>7</b>
3.1	$Ca^{2+}$ signalizace .....	8
3.2	Inositol-1,4,5-trifosfátové a ryanodinové receptory .....	10
3.2.1	Ryanodinové receptory.....	11
3.2.2	Inositol-1,4,5-trifosfátové receptory.....	11
3.3	$Ca^{2+}$ ATPáza sarko/endoplasmatického retikula .....	12
3.4	Vstup $Ca^{2+}$ kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku.....	12
3.5	Napětově ovládané vápníkové kanály .....	13
<b>4</b>	<b>Proliferující cévní hladkosvalové buňky</b> .....	<b>13</b>
4.1	Ryanodinové receptory.....	14
4.2	$Ca^{2+}$ ATPáza sarko/endoplasmatického retikula .....	14
4.3	Vstup $Ca^{2+}$ kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku.....	14
4.4	Napětově ovládané vápníkové kanály .....	15
<b>5</b>	<b>Přepínání fenotypů cévních hladkosvalových buněk</b> .....	<b>15</b>
5.1	Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů .....	15
5.2	CRE-vázající protein .....	16
<b>6</b>	<b>Experimentální hypertenze</b> .....	<b>17</b>
6.1	Vysokovodivostní $Ca^{2+}$ ovládané $K^+$ kanály .....	18
6.2	Napětově ovládané vápníkové kanály .....	19
6.3	Vstup $Ca^{2+}$ kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku.....	19
6.4	Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů a CRE-vázající protein.....	19
6.5	Angiotenzin II.....	19
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>21</b>
	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>22</b>
	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>23</b>

## 1 Úvod

Buňky hladkých svalů cév vykazují významný stupeň fenotypové plasticity. Vedle dobře známého kontraktilního fenotypu mohou cévní hladkosvalové buňky proliferovat, migrovat a vytvářet komponenty extracelulární matrix. Tento nekontraktilní fenotyp je charakteristický během vývoje cév, hojení ran a u různých kardiovaskulárních chorob jako jsou ateroskleróza, aneurysma, diabetes nebo hypertenze. Přechod z kontraktilního fenotypu do nekontraktilního nebo naopak je doprovázen změnou exprese iontových transportních proteinů a rozdílnou intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  signalizací například posunem z napětově závislé signalizace do napětově nezávislé signalizace. Během esenciální hypertenze dochází ke zvýšení krevního tlaku při normálním srdečním výdeji. To ukazuje, že příčinou hypertenze je zvýšená resistance periferních cév. Cévní změny během hypertenze jsou zapříčiněny abnormálními extracelulárními stimuly (hormony, neurotransmitery, cytokiny, atd.) a pozměněnou intracelulární signální kaskádou vedoucí k silnější vasokonstrikci, oslabené vasodilataci a remodelaci cévní stěny.

## 2 Cévní hladkosvalové buňky – kontrakce a dilatace

Cévní hladkosvalové buňky (VSMC) se nacházejí v tunica media stěny cév. V odpovědi na vasokonstriktory a vasodilatátory upravují průsvit cév a tím ovlivňují krevní tlak. Podstatou kontrakce je fosforylace lehkého řetězce myosinu, který zajišťuje ATPázovou aktivitu a navázání na aktin.

### 2.1 Vasokonstrikce

Vasokonstrikce je proces, během něhož dochází k zúžení cév, čímž se reguluje odpor oběhového systému. Tento proces je důležitý například při omezení tepelných ztrát nebo při krvácení. Nepřiměřené podněty mohou vést ke zvýšení krevního tlaku. Důležitou komponentou mechanismu vedoucímu k vasokonstrikci je zvýšená koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$ . Jednotlivé signální kaskády využívají různé komponenty, ale všechny vedou ke zvýšení koncentrace  $Ca^{2+}$  ve VSMC. Níže uvedené vasokonstriktory využívají cestu přes fosfolipázu C, inositol-1,4,5-trifosfát a diacylglycerol, inositol-1,4,5-trifosfátové receptory na sarkoplazmatickém retikulu, kalmodulin a kinázu lehkého řetězce myosinu (Obr. 1).

#### 2.1.1 Angiotenzin II

Renin je sekretován juxtaglomerulárními buňkami v ledvinách jako odpověď na aktivitu sympatiku, který kontroluje krevní tlak. Renin hydrolyzuje angiotenzinogen na angiotenzin I, který je dále účinkem angiotensin-konvertujícího enzymu (ACE) přeměněn na angiotenzin II (ANG II). ACE jednak působí vazokonstrikci pomocí ANG II a jednak oslabuje relaxaci degradací vazodilatátoru bradykininu. ACE hraje důležitou roli při remodelaci cév během aterosklerózy, restenózy a hypertenze. Spontánně hypertenzní potkani (SHR) vykazují zvýšenou aktivitu ACE v aortě a velkých artériích (Nakamura et al., 1988). ANG II má velmi různorodé funkce. Akutní působení ANG II vede ke změnám regulace vodní a solné homeostázy, vazokonstrikci a vzestupu krevního tlaku, zatímco chronické působení ANG II vyvolává hypertrofii a hyperplazii VSMCs (Geisterfer et al., 1988), chronické zánětlivé procesy, tvorbu ROS pomocí NADPH oxidázy atd. Většina známých efektů ANG II je zprostředkována přes ANG II receptor typu I ( $AT_1$ ). Aktivace  $AT_2$  má vasodilatační účinky.  $AT_1$  patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Stimulace  $AT_1$  u VSMCs vede



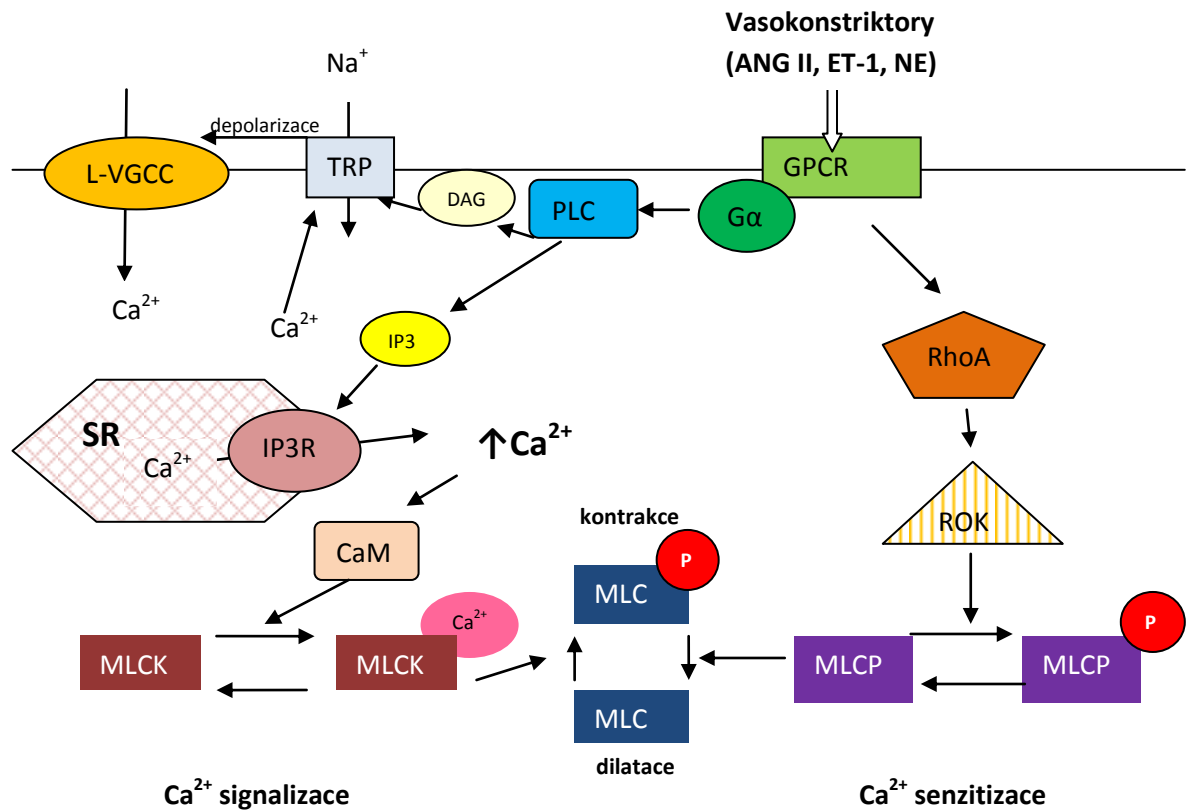
k uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z sarkoplazmatického retikulka přes inositol-1,4,5-trifosfátové receptory a následné kontrakci (Obr. 1).

### 2.1.2 Endotelin-1

Endotelin-1 (ET-1) je silný vasokonstriktor, který se účastní mnoha kardiovaskulárních onemocnění. Zvýšené hodnoty ET-1 v plazmě a tkáni byly popsány během aterosklerózy, hypertenze a srdečního selhání. ET-1 vzniká v buňkách endotelu po stimulaci trombinem, vasopresinem, epinefrinem nebo angiotenzinem II (Dohi et al., 1992). Perfuze artérií angiotenzinem II stimuluje produkci ET-1 *in situ* a zesiluje kontrakci vyvolanou norepinefrinem u SHR, ale nikoli u WKY (Dohi et al., 1992). V buňkách VSMC indukuje proliferaci, hypertrofii a syntézu proteinů extracelulární matrix (Rich a McLaughlin, 2003). ET-1 je agonistou dvou rozdílných receptorů  $\text{ET}_A$  a  $\text{ET}_B$ . Ve VSMC se vyskytuje převážně  $\text{ET}_A$  receptor patřící do rodiny receptorů spřažených s G proteiny. Navázání ET-1 na  $\text{ET}_A$  receptor indukuje aktivaci fosfolipázy C, která vede k tvorbě inositol-1,4,5-trifosfátu a intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 1). Na buňkách endotelu se nachází  $\text{ET}_B$  receptor, který po navázání ET-1 vyvolává produkci NO a prostacyklinů způsobující vasodilataci (Obr. 2) a inhibici růstu (Luscher a Barton, 2000). Za fyziologických podmínek je rovnováha mezi účinky zprostředkovanými  $\text{ET}_A$  a  $\text{ET}_B$  receptory. Při patologických stavech dochází k větší expresi  $\text{ET}_B$  receptoru na VSMC, které fungují jako  $\text{ET}_A$  receptor a zesiluje vasokonstriční a mitogení efekt ET-1 (Rich a McLaughlin, 2003). ET-1 stimuluje produkci cytokinů a růstových faktorů jako je VEGF, PDGF a CTGF a zahajuje některé intracelulární signální systémy včetně aktivace malých G proteinů a mitogenem aktivované protein kinázy (Rodriguez-Vita et al., 2005).

### 2.1.3 Norepinefrin

Norepinefrin (NE) způsobuje vasokonstrukci VSMC hlavně přes  $\alpha_1$ -adrenergní receptor ( $\alpha_1$ -AR), který je také součástí skupiny receptorů spřažených s G-proteiny. Stimulace agonistou aktivuje více než jednu cestu vstupu  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky. Po navázání NE na  $\alpha_1$ -AR dochází k aktivaci fosfolipázy C a  $A_2$  (Piascik a Perez, 2001).  $\text{Ca}^{2+}$  influx potřebuje přetrvávající aktivaci receptoru a pravděpodobně zahrnuje tyrosin kinázy a protein kinázy C (Lagaud et al., 1999).  $\alpha_1$ -AR také aktivuje  $\text{Ca}^{2+}$  influx a to zejména přes napěťově závislé  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Receptor je zahrnut i v signálních kaskádách regulujících buněčný růst, konkrétně se jedná o cestu s mitogenem aktivovanou protein kinázou (Piascik a Perez, 2001).



**Obr. 1 Signální dráhy vedoucí ke kontrakci buněk hladkého svalu cév**

Vasokonstriktory působí přes receptor spřažený s G-proteiny. Stimulace receptoru vede k aktivaci dvou typů GTP-vázajících proteinů: 1) heterotrimerického G-proteinu, který aktivuje fosfolipázu C a 2) malých monomerních GTPáz. Fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol- 4, 5-bisfosfát na diacylglycerol a inositol-1, 4, 5-trifosfát, který se váže na inositoltrifosfátové receptory na sarkoplazmatickém retikulu a způsobuje tak zvýšení koncentrace intracelulárního Ca<sup>2+</sup>. Diacylglycerol nebo uvolněné Ca<sup>2+</sup> aktivují TRP kanály, které umožní Na<sup>+</sup> iontům vstup do buňky a tím depolarizují plasmatickou membránu. Depolarizace otevírá napětově závislé Ca<sup>2+</sup> kanály. Ca<sup>2+</sup> se váže na kalmodulin, který poté aktivuje kinázu lehkého řetězce myosinu. Fosforylace lehkého řetězce myosinu vede ke kontrakci. Rho kinázová cesta je nezávislá na intracelulárním Ca<sup>2+</sup> a vede k Ca<sup>2+</sup> senzitivaci. L-VGCC – vysokovodivostní napětově ovládané Ca<sup>2+</sup> kanály; GPCR – receptory spřažené s G-proteiny; Gα – Gα podjednotka s navázaným GTP; PLC – fosfolipáza C; IP3 - inositol-1, 4, 5-trifosfát; IP3R - inositol-1, 4, 5-trifosfátový receptor; SR – sarkoplazmatické retikulum; CaM – kalmodulin; MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu; MLC – lehký řetězec myosinu; P – fosfátová skupina; RhoA – GTPáza genové rodiny Ras; ROK – Rho-asociovaná protein kináza; MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu; TRP – transient receptor potential; DAG - diacylglycerol (upraveno podle (Bastin a Heximer, 2011))

## 2.2 Vasodilatace

Vasodilatace je způsobená relaxací VSMC a zvětšuje se při ní průsvit cévy. Vasodilátory zvyšují průtok krve a snižují krevní tlak. Vasodilátory způsobují defosforylaci myosinu. Buď snižují koncentraci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  aktivací  $\text{Ca}^{2+}$  pump a výměníků nebo modulací Rho kinázové cesty.

### 2.2.1 Oxid dusnatý

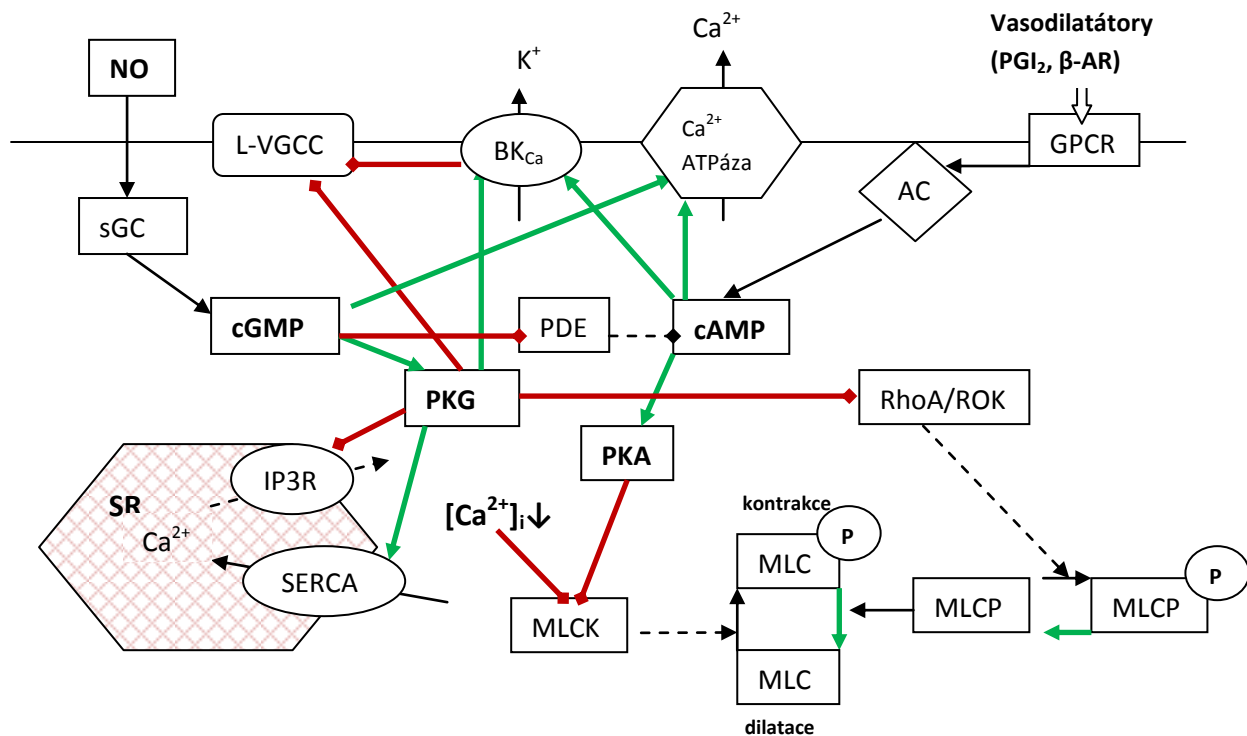
Oxid dusnatý (NO) je silný vasodilatátor produkovaný buňkami endotelu. Abnormality v produkci NO jsou patrné během aterosklerózy, diabetu a hypertenze. NO způsobuje krátkou relaxaci cév, akumulaci cGMP a přímo aktivuje solubilní guanylátcyklázu VSMC (Ignarro et al., 1987). cGMP relaxuje VSMC pomocí desensitizace kontraktálního aparátu k  $\text{Ca}^{2+}$  a hlavně pomocí snížení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 2). cGMP/PKG inhibuje napěťově ovládané vápníkové kanály (L-type VGCC) přímo a nepřímo přes aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentních  $\text{K}^+$  kanálů, které vedou k hyperpolarizaci membrány a inaktivaci L-type VGCC (Bolotina et al., 1994).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníky jsou nepřímo závislé na koncentraci cGMP. cGMP/PKG závislá fosforylace fosfolambanu zvyšuje afinitu  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy sarko/endoplasmatického retikula k  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 2) (Lucas et al., 2000).

### 2.2.2 Prostacyklin

Prostacyklin je produkt metabolismu arachidonové kyseliny. Primárně je produkovaný buňkami endotelu. Na VSMC se nachází prostacyklinový receptor (patří do skupiny receptorů spřažených s G proteiny), který je funkčně propojen s adenylátcyklázou. cAMP má hned několik vasodilatačních účinků: 1) aktivuje protein kinázu A, která fosforyluje a inhibuje kinázu lehkého řetězce myosinu, 2) stimuluje ATP-senzitivní  $\text{K}^+$  kanál způsobující hyperpolarizaci buněčné membrány a 3) stimuluje odstraňování  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu (Obr. 2) (Mombouli a Vanhoutte, 1999).

### 2.2.3 $\beta$ -adrenergní systémy

$\beta$ -adrenergní systémy zprostředkovávají kardiovaskulární odpovědi na norepinefrin a epinefrin a vedou k vasodilataci VSMC. Všechny  $\beta$ -adrenergní receptory jsou spřaženy s G-proteiny a aktivují adenylátcyklázu (Obr. 2) (Guimaraes a Moura, 2001).



**Obr. 2 Signální dráhy vedoucí k dilataci buněk hladkého svalů cév**

Molekulární mechanismus způsobující vasodilataci má dvě hlavní komponenty: cGMP a cAMP. cGMP pozitivně ovlivňuje Ca<sup>2+</sup> ATPázu v plazmatické membráně, inhibuje fosfodiesterázu a tím zvyšuje životnost cAMP a váže se na cGMP-dependentní protein kinázu, která ovlivňuje další členy signální dráhy. Aktivní PKG přímo inhibuje vysokovodivostní napěťově ovládané Ca<sup>2+</sup> kanály a nepřímo přes aktivaci K<sup>+</sup> kanálu v plazmatické membráně. PKG dále fosforyluje inositoltrifosfátový receptor v membráně sarkoplasmatického retikula a zvyšuje afinitu Ca<sup>2+</sup> ATPázy sarko/endoplasmatického retikula k Ca<sup>2+</sup>. Tím vším se podílí na snížení koncentrace intracelulárního Ca<sup>2+</sup> a inhibici kinázy lehkého řetězce myosinu. Aktivní PKG inhibuje RhoA/ROK a tak způsobuje Ca<sup>2+</sup> desensitizaci. Hlavní funkcí cAMP je aktivace protein kinázy A, která fosforyluje a inhibuje kinázu lehkého řetězce myosinu. NO – oxid dusnatý; sGC – solubilní guanylátcykláza; cGMP – cyklický guanosinmonofosfát; PKG – cGMP dependentní protein kináza; IP3R – inositol-1, 4, 5-trifosfátový receptor; SERCA – Ca<sup>2+</sup> ATPáza sarco/endoplasmatického retikula; L-VGCC – vysokovodivostní napěťově ovládaný Ca<sup>2+</sup> kanál; BK<sub>Ca</sub> – vysokovodivostní Ca<sup>2+</sup> ovládaný K<sup>+</sup> kanál; PDE – fosfodiesteráza; RhoA/ROK – signální dráha vedoucí přes RhoA a Rho asociovanou protein kinázu; MLCP – fosfatáza lehkého řetězce myosinu; MLC – lehký řetězec myosinu; GPCR – receptory spřažené s G-proteiny; AC – adenylátcykláza; cAMP – cyklický adenosinmonofosfát; PKA – protein kináza A; MLCK – kináza lehkého řetězce myosinu; P – fosfátová skupina; PGI<sub>2</sub> – prostacyklin; β-AR – β-adrenergní systémy (upraveno podle (Lucas et al., 2000))

### 3 Plně diferencované cévní hladkosvalové buňky

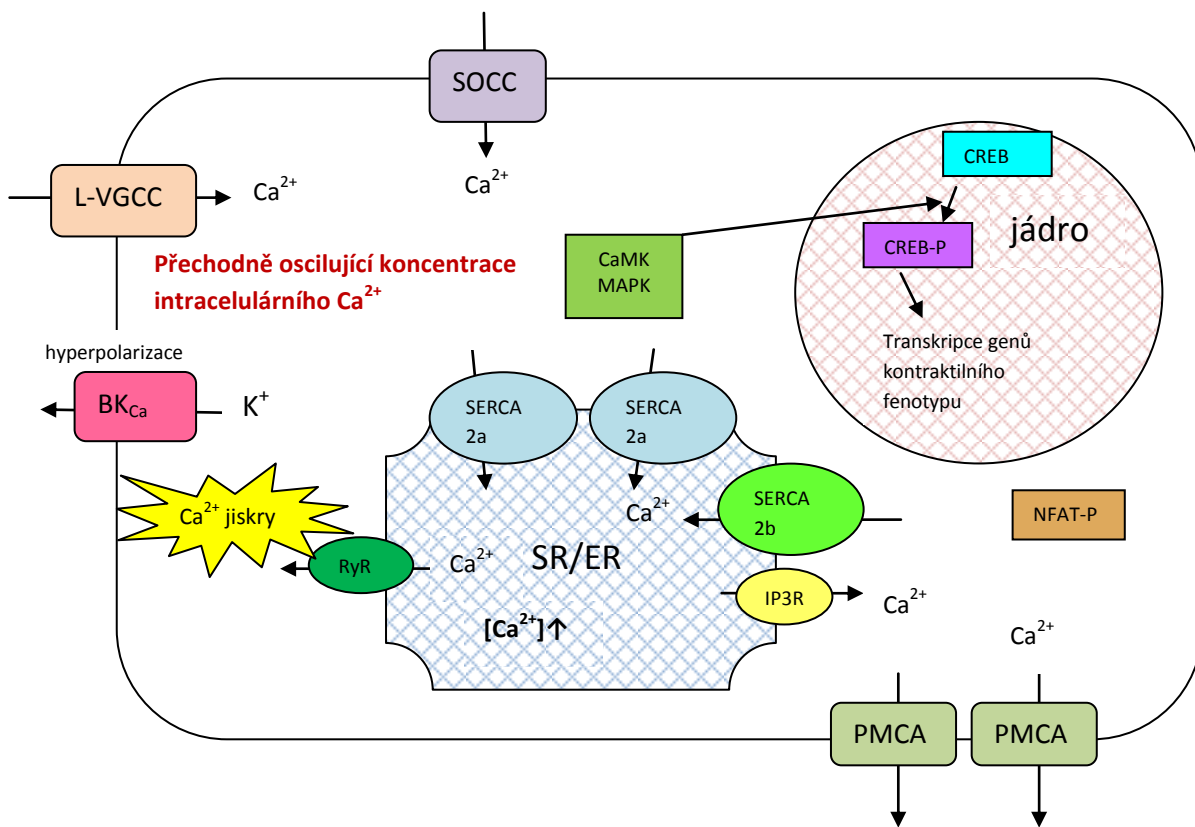
Základní funkcí plně diferencovaných (dospělých) VSMC je kontrakce. VSMC exprimují široký repertoár kontraktálních a regulačních proteinů. Kontrakce je obecně způsobena

vzrůstem koncentrace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ . Mezi nejdůležitější proteiny způsobující nárůst intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  u plně diferencovaných VSMC patří napětově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály (VGCC) (Obr. 3). Dalším rysem je nižší basální hladina cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  oproti proliferujícím VSMC, přičemž změny v  $\text{Ca}^{2+}$  jsou časově a místně omezeného charakteru. Globální nárůst cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  je rychle redukován  $\text{Ca}^{2+}$  pumpami a cytoplazmatické  $\text{Ca}^{2+}$  tak zůstává na nízké úrovni (Matchkov et al., 2012). Diferencované VSMC vykazují jen velmi nízkou míru proliferace a produkují malé množství proteinů extracelulární matrix.

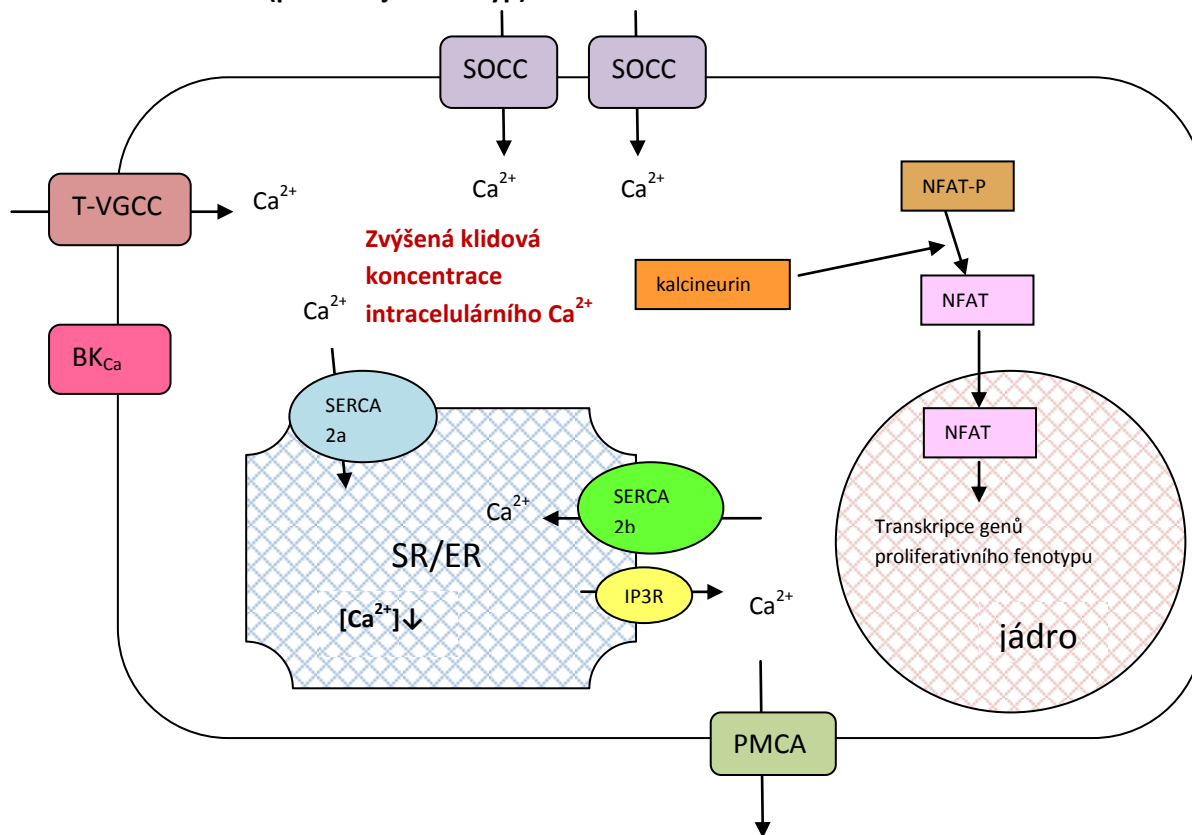
### 3.1 $\text{Ca}^{2+}$ signalizace

$\text{Ca}^{2+}$  je důležitý druhý posel podílející se na řadě buněčných procesů. Začátek  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace je způsoben transientním zvýšením koncentrace volných cytosolických vápenatých iontů v důsledku otevřením  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů v membráně sarco/endoplazmatického retikula (inositol-1,4,5-trifosfátový receptor a ryanodinový receptor). Následné dlouhotrvající zvýšení cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  zahrnuje kanály na povrchu buňky (napětově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály, receptor-operující vstup  $\text{Ca}^{2+}$ , vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky podmíněný deplecí vnitřních zásobáren (SOCE). Napětově ovládané kanály (VGCC) a receptor-operující  $\text{Ca}^{2+}$  kanály produkují krátký, ale velmi intenzivní nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . SOCE pak vytváří dlouhotrvající vzestup intracelulárního vápníku. Koncentrace cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  může být naopak znatelně snížena  $\text{Ca}^{2+}$  pumpami ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza plazmatické membrány,  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza sarko/endoplazmatického retikula (SERCA)) a výměníky ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníky) (Berra-Romani et al., 2008). Cesty, kterými  $\text{Ca}^{2+}$  vstupuje do proliferujících respektive diferencovaných buněk se liší. Můžeme rozlišit dva základní typy  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace: elementární události (jiskry) (Nelson et al., 1995) a globální události (oscilace) (Berridge, 1997). Jednotlivé elementární události jsou schopné vytvořit v malém prostoru cytoplazmy obrovský nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ , ale v globálním měřítku se kvůli krátkému trvání a prostorovém omezení téměř žádný nárůst cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  neprojeví.  $\text{Ca}^{2+}$  jiskry jsou zaměřeny na cíle v jejich bezprostřední blízkosti, konkrétně vysokovodivostní  $\text{Ca}^{2+}$  ovládané  $\text{K}^+$  kanály ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) a specifické proteinkinázy a proteinfosfatázy (Nelson et al., 1995). Cévní tonus je tak určen souhrou odlišných  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentních procesů: vazokonstrikcí, která je způsobená globálním nárůstem  $\text{Ca}^{2+}$  a vasodilatací vyvolanou převážně působením cGMP a lokálními změnami  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrace aktivujícími  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Nelson et al., 1995).

### Diferencované VSMC (kontraktilní fenotyp)



### Rostoucí VSMC (proliferující fenotyp)



## **Obr. 2 Modulační $Ca^{2+}$ signalizace během fenotypového přepnutí**

V kontraktilních VSMC vstupuje extracelulární  $Ca^{2+}$  hlavně přes L-type napěťově ovládané vápníkové kanály, které jsou u proliferačních VSMC nahrazeny T-type napěťově ovládanými kanály. Během fenotypového přepnutí z diferencovaného stavu do stavu proliferačního dochází k vymizení ryanodinových receptorů na sarkoplazmatickém retikulu a k represii  $Ca^{2+}$  ATPázy sarko/endoplazmatického retikula typu 2a. Rovněž ubývá množství  $Ca^{2+}$  ATPázy na plazmatické membráně. Zvýšený je naopak vstup  $Ca^{2+}$  kanály závislými na vnitřních zásobách vápníku. Všechno tyto změny přispívají k ustálení výkyvů v koncentraci intracelulárního  $Ca^{2+}$  a celkově k zvýšení basální koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$ . Kalcineurin je aktivován při dlouhodobě zvýšené koncentraci intracelulárního  $Ca^{2+}$ . Aktivovaný kalcineurin defosforyluje jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů, který poté vstupuje do jádra a spouští transkripci genů pro proliferační fenotyp. Aktivace CRE-vázacího proteinu je namísto toho spojena s aktivitou L-type napěťově ovládaných vápníkových kanálů. SOCC -  $Ca^{2+}$  kanály závislé na vnitřních zásobách vápníku; L-type VGCC – vysokovodivostní napěťově ovládané vápníkové kanály; T-type VGCC – transienční napěťově ovládané vápníkové kanály;  $BK_{Ca}$  - vysokovodivostní  $Ca^{2+}$  ovládané  $K^+$  kanály; PMCA -  $Ca^{2+}$  ATPáza plazmatické membrány; RyR – ryanodinový receptor;  $IP_3R$  - inositol-1,4,5-trifosfátový receptor; SERCA 2a -  $Ca^{2+}$  ATPáza sarko/endoplazmatického retikula typu 2a; SERCA 2b -  $Ca^{2+}$  ATPáza sarko/endoplazmatického retikula typu 2b; NFAT-P – fosforylovaný jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů; NFAT – defosforylovaný/aktivovaný jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů; CaMK -  $Ca^{2+}$ /kalmodulin závislá protein kináza; MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza; CREB – inaktivní CRE-vázací protein; CREB-P – fosforylovaný/aktivní CRE-vázací protein (upraveno podle (House et al., 2008))

### **3.2 Inositol-1,4,5-trifosfátové a ryanodinové receptory**

Inositoltrifosfátové ( $IP_3R$ ) a ryanodinové receptory (RyR) jsou intracelulární  $Ca^{2+}$  kanály na povrchu sarkoplazmatického retikula. Obě rodiny receptorů vykazují děj zvaný vápníkem indukované uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula (v tomto případě jde o extracelulární  $Ca^{2+}$  převážně z napěťově ovládaných vápníkových kanálů), který se podílí na vytváření  $Ca^{2+}$  jisker a regenerujících vln (Berridge, 1997). Další důležitou vlastností  $IP_3R$  a RyR je jejich duální senzitivita k  $Ca^{2+}$ . Nárůst koncentrace cytosolického  $Ca^{2+}$  iniciuje vývoj pozitivní zpětné vazby otevřením blízkých kanálů a to vede k mobilizaci dalšího  $Ca^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula. Pokud je překročena určitá míra koncentrace cytosolického  $Ca^{2+}$ , vyvíjí se negativní zpětná vazba, která kanály naopak zavírá (Bootman a Berridge, 1996). Koordinací aktivity intracelulárních  $Ca^{2+}$  kanálů vznikají globální signály (Berridge, 1997). U čerstvě disociovaných myocytů z krysí mesenterické artérie se nacházejí dvě funkčně nezávislé  $Ca^{2+}$  zásobárny sarkoplazmatického retikula: ryanodin-senzitivní zásobárna a  $IP_3$ -senzitivní zásobárna (Berra-Romani et al., 2008).

### 3.2.1 Ryanodinové receptory

Ryanodinové receptory jsou homotetramerické iontové kanály, které se nachází na sarkoplazmatickém retikulu poblíž plazmatické membrány. Zprostředkovávají uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula dvěma způsoby: 1) vápníkem indukované uvolnění vápníku ze zásobáren, které funguje jako pozitivní regulátor (zesiluje malý  $\text{Ca}^{2+}$  signál a mobilizuje velké množství sarkoplazmatického  $\text{Ca}^{2+}$  do cytosolu) a 2)  $\text{Ca}^{2+}$  jiskry fungují jako negativní regulátor spřažení excitace-kontrakce (viz níže). Lokalizace RyR kanálů blízko u plazmatické membrány naznačuje intenzivní komunikaci mezi těmito kompartmenty. Regulace RyR je zprostředkována fosforylací druhými posly. cADP ribóza a protein kináza A zvyšují citlivost k vápníku, zatímco protein kináza C snižuje citlivost k vápníku (House et al., 2008). RyR jsou schopné lokálně zvýšit koncentraci  $\text{Ca}^{2+}$ , tj. vytvořit tzv.  $\text{Ca}^{2+}$  jiskry, které aktivují vysokovodivostní  $\text{Ca}^{2+}$  ovládané  $\text{K}^+$  kanály ( $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ) (Obr. 3). Zabránění  $\text{Ca}^{2+}$  jisker ryanodinem (blokuje otevření ryanodin-senzitivních kanálů) nebo thapsigarginem (blokuje  $\text{Ca}^{2+}$  ATPáza sarko/endoplazmatického retikula a způsobuje depleci sarkoplazmatického retikula) má stejné účinky jako inhibitory  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Nelson et al., 1995). Z toho je patrné, že  $\text{Ca}^{2+}$  jiskry a  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  spolu funkčně souvisí. Lokální zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  plynoucí z otevření RyR kanálů v membráně sarkoplazmatického retikula vede k hyperpolarizaci membrány způsobené otevřením kanálů pro  $\text{K}^+$ , tím k zavření VGCC a dilataci cév (Nelson et al., 1995).  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanály jsou aktivované nejen nárůstem lokální koncentrace cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$ , ale i membránovou depolarizací.

### 3.2.2 Inositol-1,4,5-trifosfátové receptory

Agonisté působící přes receptory spřažené s G-proteiny (acetylcholin, angiotensin II, endothelin, norepinefrin, vasopresin a další) nebo tyrosin kinázové receptory (PDGF, EGF) mohou vytvořit intracelulární  $\text{Ca}^{2+}$  signál díky aktivaci fosfolipázy C. Fosfolipáza C štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na druhé posly –  $\text{IP}_3$  a diacylglycerol.  $\text{IP}_3$  difunduje cytosolem a po navázání na  $\text{IP}_3\text{R}$  způsobuje jeho konformační změnu a následně otevření kanálu a vstup  $\text{Ca}^{2+}$  z lumen sarkoplazmatického retikula do cytoplazmy (Berridge, 1993).  $\text{Ca}^{2+}$  difunduje cytosolem a otevírá další  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. Tento jev se nazývá vápníkem indukované uvolnění vápníku ze sarkoplazmatického retikula a je klíčový pro tvorbu regenerativních  $\text{Ca}^{2+}$  vln, které jsou důležité pro proliferaci VSMC (House et al., 2008). Excitabilita  $\text{IP}_3\text{R}$  je regulována  $\text{IP}_3$ , který zvyšuje senzitivitu  $\text{IP}_3\text{R}$  k  $\text{Ca}^{2+}$  stimulaci (Berridge, 1997) a jeho vysoká



koncentrace brání inaktivaci IP<sub>3</sub>R negativní zpětnou Ca<sup>2+</sup> vazbou (Bootman a Lipp, 1999). IP<sub>3</sub>R je funkčně propojen s membránovými kanály závislými na vnitřních zásobách vápníku (SOCE). Po úbytku Ca<sup>2+</sup> z lumen sarkoplazmatického retikula prochází IP<sub>3</sub>R konformační změnou, která způsobí, že SOCE v plasmatické membráně umožní vstup extracelulárního Ca<sup>2+</sup> (Berridge, 1997). Pro aktivace jaderného faktoru aktivovaných T-lymfocytů je nutné uvolnění Ca<sup>2+</sup> ze sarkoplazmatického retikula a extracelulární Ca<sup>2+</sup> influx přes SOCE (Bobe et al., 2011).

### **3.3 Ca<sup>2+</sup> ATPáza sarko/endoplasmatického retikula**

Ca<sup>2+</sup> ATPáza sarko/endoplasmatického retikula (SERCA) je pumpa v plasmatické membráně hladkosvalových buněk, která za spotřeby ATP transportuje Ca<sup>2+</sup> z cytosolu do lumen endoplazmatického retikula a tím udržuje intracelulární Ca<sup>2+</sup> homeostázu. V SMC se nacházejí dvě sestříhové varianty SERCA 2 genu: 2a a 2b (Lompre, 1998, Vallot et al., 2000). Aktivita pumpy je regulována fosforylací a defosforylací fosfolambanu. Fosfolamban je substrátem cGMP-dependentní protein kinázy a tudíž se podílí na vasodilataci (Lucas et al., 2000). Fosforylovaný fosfolamban se disociuje z SERCA a tím zvyšuje afinitu ATPázy k Ca<sup>2+</sup> (Koss a Kranias, 1996, Lompre, 1998). SERCA 2b má snížený obrat pro ATP hydrolyzu i transport Ca<sup>2+</sup> (Lytton et al., 1992). Exprese SERCA genu se během vývoje mění. Plně diferencované VSMC obsahují SERCA 2a a 2b mRNA i protein. Množství SERCA 2a mRNA roste s věkem paralelně k nárůstu hladkosvalového  $\alpha$ -actinu, který je markerem VSMC, zatímco množství SERCA 2b mRNA zůstává během vývoje konstantní (Lejemtel et al., 1993). Zvýšení SERCA 2a aktivity brání proliferaci VSMC skrz inaktivaci kalcineurinu (Lipskaia et al., 2005). Další změny SERCA 2a nastávají při proliferaci VSMC (viz. 4.2).

### **3.4 Vstup Ca<sup>2+</sup> kanály závislými na vnitřních zásobách vápníku**

Vstup Ca<sup>2+</sup> kanály závislými na vnitřních zásobách vápníku (SOCE) hraje důležitou roli při formování cytoplasmatických Ca<sup>2+</sup> signálů u mnoha buněčných typů včetně VSMC. Skupina SOCE kanálů zahrnuje několik typů kanálů, které pracují na stejném principu (např. receptor-operující Ca<sup>2+</sup> kanály a TRP kanály). Kanály zprostředkovávající SOCE v plasmatické membráně ovlivňují kontrakci, proliferaci a tonus VSMC. SOCE je aktivován poklesem koncentrace Ca<sup>2+</sup> v lumen endoplazmatického retikula. Po vyprázdnění endoplazmatického retikula nastává reorganizace stromální interagující molekuly (STIM1), která funguje jako Ca<sup>2+</sup> senzor endoplazmatického retikula. Dojde k přemístění STIM1 od endoplazmatického

retikula blízko k plazmatické membráně, kde přeneše signál na pór formující molekulu Orai1 (Potier et al., 2009). Ve VSMC se vyskytují i jiné izoformy molekuly Orai, ale jejich inhibice nemá žádný vliv na SOCE (Potier et al., 2009).

### 3.5 Napětově ovládané vápníkové kanály

Napětově ovládané  $\text{Ca}^{2+}$  kanály (VGCC) umožňují vstup  $\text{Ca}^{2+}$  do buňky po depolarizaci buněčné membrány. Existuje několik typů VGCC lišících se svými fyziologickými a farmakologickými vlastnostmi (L-, N-, P-, Q-, R-, T-). L-type VGCC charakteristický svou vysokou vodivostí a pomalou napětově ovládanou inaktivací (Catterall, 2000) je vysoce exprimován v diferencovaných VSMC (Obr. 3), ale při dediferenciaci je jeho množství razantně sníženo. VGCC se skládají z několika podjednotek, ale pouze exprese  $\alpha_1$  podjednotky je v souladu s expresí proteinů specifických pro hladké svaly (hladkosvalový  $\alpha$ -actin, hladkosvalový těžký řetězec myosinu) (Gollasch et al., 1998). Depolarizace buněčné membrány vyvolávající aktivaci VGCC vede ke kontrakci VSMC a také ovlivňuje transkripci proteinů specifických pro VSMC. Transkripce těchto proteinů je blokována inaktivací RhoA nebo ROK (Wamhoff et al., 2004). Inaktivace RhoA/ROK nijak neovlivňuje transkripci časných genů, c-fos, které je také spojená s aktivací VGCC. K depolarizaci membrány a aktivaci VGCC částečně přispívají TRPC kanály (House et al., 2008).

## 4 Proliferující cévní hladkosvalové buňky

Částečně diferencované VSMC hrají důležitou roli při vývoji cév. Mají schopnost migrace, proliferace a syntézy komponent extracelulární matrix. Proliferující VSMC v primární kultuře naopak ztrácejí schopnost kontrakce. Proliferace je asociována s dlouhodobým nárůstem intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  způsobeným zvýšenou excitabilitou  $\text{IP}_3\text{R}$  po navázání  $\text{IP}_3$ , posílenou aktivitou SOCE a T-type VGCC a sníženou aktivitou SERCA a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy plazmatické membrány (Vallot et al., 2000, Matchkov et al., 2012) (Obr. 3). Změna  $\text{Ca}^{2+}$  homeostázy je spojená s modifikací exprese  $\text{Ca}^{2+}$  transportních proteinů a aktivitou  $\text{Ca}^{2+}$  závislých transkripčních faktorů (CRE-vázající protein, jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů). Tyto transkripční faktory jsou aktivovány různými cestami  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace a mají opačné role při kontrole buněčné proliferace. Proliferace VSMC dobře koreluje s aktivací regulátorů buněčného cyklu, cyklinu A a E (Stevenson et al., 2001).

#### 4.1 Ryanodinové receptory

V proliferujících kulturách dochází ke ztrátě RyR kanálů, v důsledku čehož je snížena frekvence  $\text{Ca}^{2+}$  jisker (Vallot et al., 2000). Místně a časově omezené výkyvy v hladině intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  nahrazuje dlouhodobý nárůst intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  (Obr. 3). Důsledkem ztráty RyR kanálů a s nimi  $\text{Ca}^{2+}$  jisker může být součástí hypersenzitivní reakce na vasoaktivní látky, která je pozorována u hypertenzních zvířat a během aterosklerózy (House et al., 2008).

#### 4.2 $\text{Ca}^{2+}$ ATPáza sarko/endoplasmatického retikula

Během dediferenciace dochází k ztrátě mRNA pro SERCA 2a (Vallot et al., 2000). V proliferující VSMC dochází k represí SERCA 2a, zatímco exprese SERCA 2b zůstává nezměněná (Lipskaia et al., 2005) (Obr. 3). Pro aktivaci kalcineurinu ( $\text{Ca}^{2+}$ /kalmomodulin-dependentní serin/treonin-specifická protein fosfatáza 2B) je nutné dlouhotrvající zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a tomu zvýšená SERCA 2a aktivita brání (Bobe et al., 2011). Kalcineurin defosforyluje další proteiny včetně jaderného faktoru aktivovaných T-lymfocytů, který vstupuje do jádra a indukuje proliferaci (Boss et al., 1998, Gomez et al., 2002). V přítomnosti SERCA 2a nedojde k dostatečnému vyprázdnění sarkoplazmatického retikula, které by indukovalo delokalizaci STIM1, která je důležitou komponentou SOCE (Bobe et al., 2011).

#### 4.3 Vstup $\text{Ca}^{2+}$ kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku

V proliferujících VSMC je oproti diferencovaným buňkám vysoká úroveň STIM1 a Orai1 (Berra-Romani et al., 2008). Odstranění STIM1 nebo Orai1 vede k signifikantní inhibici buněčné proliferace a migrace (Potier et al., 2009, Baryshnikov et al., 2009). U lidských proliferujících arteriálních myocytů je Orai1 funkčně propojen s  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázou plasmatické membrány a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníky plasmatické membrány. Odstranění Orai1 genu snižuje expresi  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy plasmatické membrány a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníků a tím redukuje odstraňování  $\text{Ca}^{2+}$  z cytosolu do extracelulárního prostoru (Baryshnikov et al., 2009). Snižovaný SOCE způsobený inhibicí Orai1 je kompenzován nižší expresí  $\text{Ca}^{2+}$  ATPázy plasmatické membrány a  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  výměníků za účelem udržení dostatečné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v cytosolu a uvnitř endoplazmatického retikula.

#### 4.4 Napětově ovládané vápníkové kanály

Exprese L-type VGCC závisí na fázi buněčného cyklu. L-type VGCC jsou exprimovány jen v  $G_0$  fázi buněčného cyklu. V  $G_1$  a S fázi naopak převažuje exprese T-type VGCC, který se nevyskytuje v  $G_0$  fázi (Kuga et al., 1996) (Obr. 3). To naznačuje, že T-type VGCC, který je aktivován při více negativním membránovém potenciálu než L-type VGCC, hraje určitou roli v buněčné proliferaci. Dle studie (Gollasch et al., 1998) dochází k náhradě L-type VGCC za T-type VGCC, který stimuluje  $Ca^{2+}$  indukovaný vstup  $Ca^{2+}$  do buňky pouze slabě. Aktivace VGCC v nedotčených cerebrálních artériích je spojena s fosforylací cAMP-reagujícího element-vázajícího proteinu (CREB) a následovanou zvýšenou expresí časných genů, c-fos (Wellman et al., 2001).

### 5 Přepínání fenotypů cévních hladkosvalových buněk

Základem fenotypového přepnutí jsou změny v transkripci genů, které jsou spojené s několika  $Ca^{2+}$  závislými transkripčními faktory, mezi něž patří i jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů a CRE-vázající protein.

#### 5.1 Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů

Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (NFAT) je transkripční faktor zprostředkovávající  $Ca^{2+}$ -závislou transkripci genů v různých buněčných typech včetně hladkých svalů (Boss et al., 1998). Fyziologické procesy, kterých se NFAT účastní, jsou různorodé. Patří mezi ně např. vývoj cév během embryogeneze a migrace prekursorů buněk hladkých svalů. Potlačení aktivity NFAT inhibuje proliferaci VSMC (Liu et al., 2005). Transkripce zprostředkovaná NFAT je striktně kontrolována množstvím cytosolického  $Ca^{2+}$ , jehož změny jsou regulovány různými mechanizmy (Boss et al., 1998, Gomez et al., 2002). Zvýšená koncentrace intracelulárního  $Ca^{2+}$  stimuluje kalcineurin-závislou defosforylací cytoplasmatického NFAT (Obr. 3). Defosforylovaný NFAT je translokován do jádra, kde působí jako transkripční faktor. Pro aktivaci NFAT je potřeba dlouhotrvající nárůst  $Ca^{2+}$ . Zvýšená aktivita SERCA2a snižuje množství cytosolického  $Ca^{2+}$  a brání tak aktivaci kalcineurinu (Lipskaia et al., 2005). SERCA2a navíc oslabuje SOCE a níže v kaskádě kalcineurin modifikací intracelulárních  $Ca^{2+}$  událostí z ustáleného stavu do stavu oscilujícího (Bobe et al., 2011). Pro aktivaci NFAT je dostačující uvolnění  $Ca^{2+}$  ze sarkoplazmatického retikula přes  $IP_3R$ . Další cesty vedoucí ke

zvýšení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  fungují spíše jako zesilovače signálu (Bobe et al., 2011). Růstový faktor PDGF vyvolává déle trvající nárůst cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  než angiotensin II nebo trombin a je také silnějším aktivátorem NFAT (Boss et al., 1998). Krátkodobé zvýšení cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  způsobuje fosforylaci NFAT a jeho export z jádra.

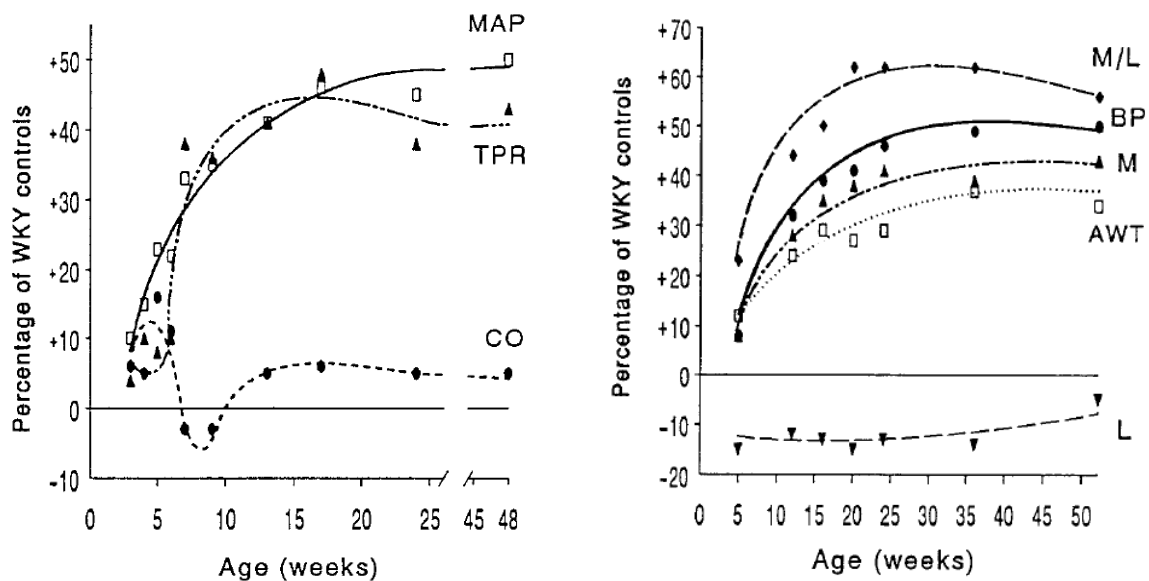
## 5.2 CRE-vázající protein

CRE-vázající protein (CREB) je transkripční faktor citlivý na změny intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . CREB se váže na cAMP reagující element (CRE), který se nachází v promotoru genů charakteristických jak pro kontraktilní, tak pro nekontraktilní fenotyp VSMC (Wamhoff et al., 2006).  $\text{Ca}^{2+}$  může aktivovat CREB-vyvolanou transkripci přes  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin závislou protein kinázu (CaMK) nebo přes mitogenem aktivovanou protein kinázu (Stevenson et al., 2001).  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin se také podílí na kontrakci aktivací kinázy lehkého řetězce myosinu, která fosforyluje myosin.  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dále reguluje NFAT přes fosfatázu kalcineurin (Wamhoff et al., 2006).  $\text{Ca}^{2+}$ -závislá aktivace CREB je iniciována nárůstem intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , navázáním  $\text{Ca}^{2+}$  na kalmodulin, aktivací a translokací CaMK do jádra, kde fosforyluje CREB v místě Ser-133 a tím umožní navázání koaktivátoru CREB-vázajícího proteinu a dále navázání na specifické místo promotoru. Ser-133 na CREB je potenciálním substrátem pro mnoho kináz včetně CaMKIV, CAMKII a protein kináz A a C (Mayr a Montminy, 2001). CREB může být fosforylován CaMKII i na Ser-142. Tato fosforylace působí proti aktivaci CREB a je tak pravděpodobně negativním regulátorem (Sun et al., 1994). Během fenotypového přepnutí dochází ke změně množství jednotlivých izoforem CaMKII (House et al., 2008). CREB je aktivován membránovou depolarizací a otevřením VGCC kanálů (Stevenson et al., 2001). Jedna z funkcí aktivace CREB přes VGCC je udržení diferencovaného stavu (Obr. 3). Zvýšená exprese aktivního CREB má antiproliferační účinky (Klemm et al., 2001). Cyklické nukleotidy (cAMP a cGMP) podporují diferencovaný stav SMC.  $\beta$ -adrenergní stimulace cAMP signalizace je důležitá pro zachování kontraktilní funkce VSMC (Klemm et al., 2001). Umělé zvýšení koncentrace cAMP nebo cGMP vede k inhibici mitogenem aktivované protein kinázy a dalších kináz a k efektivní blokaci vstupu buňky do G1 fáze buněčného cyklu. CREB je jedním z hlavních cílů signalizace cyklických nukleotidů (hlavně cAMP). Inaktivace CREB je také regulována  $\text{Ca}^{2+}$  například přes kalmodulin závislou fosfatázu kalcineurin. Cerebrální artérie hypertenzních krys vykazují zvýšenou koncentraci intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$ , aktivního CREB a c-fos mRNA (tyto geny jsou velmi rychle aktivované v odpovědi na rozličné celulární stimuly).

Tyto efekty jsou výrazně potlačeny inhibicí VGCC (Wellman et al., 2001). Po zablokování  $\text{Ca}^{2+}$  jisker ryanodinem byla opět zvýšena koncentrace fosforylovaného CREB a c-fos aktivace (Cartin et al., 2000). SOCE v intaktních cerebrálních artériích aktivovaný deplecí  $\text{Ca}^{2+}$  zásobáren sarkoplazmatického retikula vede také k fosforylaci CREB. Tato cesta aktivace není senzitivní k inhibici VGCC (Pulver et al., 2004). Z toho vyplývá, že aktivace CREB je důležitá pro udržení kontraktilního fenotypu VSMC.

## 6 Experimentální hypertenze

Dlouhotrvající zvýšený tlak je u potkanů asociován se změnami ve struktuře kardiovaskulárního systému. Zvětšuje se poměr tloušťky stěny k průsvitu cévy. Genetická hypertenze je spojena s vysokým odporem periferních cév. Ačkoli abnormální spřažení excitace a kontrakce VSMC u SHR hraje nezanedbatelnou roli, zásadní pro udržení hypertenzního stavu je právě pozměněná cévní geometrie (Heagerty et al., 1993). Cévní odpor je u čerstvě narozených SHR nižší než u stejně starých WKY. Mezi 4. a 6. týdnem vykazují SHR zvýšený srdeční výdej, ačkoli celkový odpor zůstává nezměněný. Mezi 3. a 10. týdnem dochází k největšímu nárůstu krevního tlaku paralelně k hypertrofii cévní stěny a celkovému odporu systému. Po narození mají SHR větší nárůst krevního tlaku než WKY (Obr. 4) (Zicha a Kunes, 1999). Remodelace malých cév (tzn. přestavba struktury využívající již existující materiál) je u hypertenzních krys doprovázena buněčným růstem, tzv. hyperplázií. Souběžně nastává také hypertrofie stěny velkých artérií jako důsledek trvale zvýšeného krevního tlaku (Heagerty et al., 1993). Hyperplázie a remodelace periferních cév SHR je adaptivní odpověď na zvýšený krevní tlak (Obr. 4) (Bund et al., 1991). Hypertrofie a hyperplázie VSMC jsou často provázeny polyploidizací hladkých svalů cév hypertenzních zvířat (Black et al., 1988). VSMC SHR vykazují zrychlenou proliferaci *in vivo* a v kultuře. Hypertenze je spojena s řadou abnormalit  $\text{Ca}^{2+}$  signalizace v buňkách hladkých svalů. Tyto rozdíly lze najít již u čerstvě narozených zvířat, proto by některé abnormality mohly mít vztah k akcelerovanému růstu buněk (Hadrava et al., 1989).



**Obr. 4 Vývoj kardiovaskulárního fenotypu během genetické hypertenze**

Vývoj fenotypu u spontánně hypertenzních krys (vyjádřeno v procentech WKY kontrol)

MAP – střední arteriální krevní tlak; TPR – celkový periferní odpor; CO – srdeční výdej; M/L – poměr tloušťky stěny k průsvitu cévy; BP – krevní tlak; M – tloušťka stěny; AWT – aktivní napětí stěny cévný; L – průsvit cévy; WKY – Wistar-Kyoto krysy (upraveno podle (Zicha a Kunes, 1999))

### 6.1 Vysokovodivostní $\text{Ca}^{2+}$ ovládané $\text{K}^+$ kanály

$\text{BK}_{\text{Ca}}$  ve VSMC jsou složeny z  $\alpha$  podjednotky formující pór a menší pomocné  $\beta 1$  podjednotky (Amberg et al., 2003, Tanaka et al., 1997).  $\beta 1$  podjednotka zvyšuje senzitivitu  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanálu k  $\text{Ca}^{2+}$  (Cox a Aldrich, 2000). Absence  $\beta 1$  podjednotky vede k poruchám propojení  $\text{Ca}^{2+}$  jisker s  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  a tak ke snížení spontánního proudu  $\text{K}^+$  ven z buňky. Spontánní  $\text{K}^+$  proud způsobuje tonickou hyperpolarizaci v závislosti na membránovém potenciálu malých arterií. Senzitivita  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanálu k  $\text{Ca}^{2+}$  bez  $\beta 1$  podjednotky je snížena natolik, že pravděpodobnost aktivace tohoto kanálu pomocí  $\text{Ca}^{2+}$  jisker je minimální a kanál není schopný vytvořit znatelný proud a tak membránu hyperpolarizovat (Brenner et al., 2000). To je zřejmě důvod, proč u  $\beta 1^{-/-}$  myši byl zjištěn zvýšený krevní tlak (Pluger et al., 2000). Během angiotensinem indukované hypertenze je snížena aktivita  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . To je způsobeno redukcí exprese  $\beta 1$  podjednotky u hypertenzních krys a tak sníženou efektivitou, s níž  $\text{Ca}^{2+}$  jiskry otevírají  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (Amberg et al., 2003). U genetické hypertenze je naopak patrná zvýšená aktivita  $\text{Ca}^{2+}$  senzitivních  $\text{K}^+$  kanálů (England et al., 1993). V membráně hladkosvalových buněk SHR byla objevena zvýšená exprese  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  kanálů, ale úroveň mRNA zůstala nezměněná. To naznačuje, že zvýšená

exprese u hypertenzních krys se odehrává na posttranskripční úrovni (Liu et al., 1997). Při inhibici BK<sub>Ca</sub> iberiotoxinem dochází k větší konstrikci arterií u SHR než u WKY. Zvýšený K<sup>+</sup> proud v myocytech arterií hypertenzních krys funguje jako kompenzační mechanismus u takto postižených jedinců (Liu et al., 1997).

## **6.2 Napěťově ovládané vápníkové kanály**

Při fyziologické koncentraci vápníku je u SHR zaznamenán vyšší proud Ca<sup>2+</sup> přes L-type VGCC než u WKY (Cox a Lozinskaya, 1995) (Pratt et al., 2002). VGCC je heteromerický komplex, který je sestaven z pór formující  $\alpha_1$  podjednotky s pomocnými  $\alpha_2\delta$  (1 - 4) a  $\beta$  podjednotkami. Během genetické hypertenze je zvýšená exprese  $\alpha_2\delta$ -1, která podporuje trafficking  $\alpha_1$  podjednotky na povrch buňky. To vede k zvýšenému Ca<sup>2+</sup> proudu přes VGCC u SHR (Bannister et al., 2012).

## **6.3 Vstup Ca<sup>2+</sup> kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku**

Zvýšený Ca<sup>2+</sup> influx přes SOCE způsobený defektním signálem z intracelulárních Ca<sup>2+</sup> zásobáren přispívá k abnormální cévní reaktivitě během hypertenze. Nárůst koncentrace cytosolického Ca<sup>2+</sup> vyvolaný přidáním thapsigarginu nebo cyclopiazonové kyseliny (SERCA inhibitory) je po inhibici STIM1 a Orai1 výrazně redukován (Baryshnikov et al., 2009, Giachini et al., 2009). V případě zablokování vstupu Ca<sup>2+</sup> přes SOCE vymizely rozdíly ve vývoji kontrakce mezi SHR a WKY (Giachini et al., 2009). Jeden z možných mechanismů přispívajících k abnormální funkci SOCE je zvýšená exprese STIM1 a SOCE kanálů nebo zvýšená aktivace/snížená deaktivace SOCE. SHR vykazují zvýšenou expresi STIM1 a Orai1 (Giachini et al., 2009).

## **6.4 Jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů a CRE-vázající protein**

O abnormalitách NFAT s CREB během genetické hypertenze není prozatím publikováno dostatečné množství relevantní literatury.

## **6.5 Angiotenzin II**

Angiotenzin II (ANG II) hraje významnou roli během hypertenze. Odpověď na ANG II v kultuře VSMC je výraznější u SHR než u WKY (Paquet et al., 1990, Bukoski, 1990). Výsledky studie (Cortes et al., 1996) ukazují, že nárůst koncentrace intracelulárního Ca<sup>2+</sup>



indukovaný ANG II v konfluentní a postkonfluentní kultuře je zesílen u SHR, ale snížen v proliferujících kulturách SHR i WKY. Zvýšení koncentrace intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  vyprázdněním zásob v  $\text{Ca}^{2+}$ -free médiu pomocí thapsigarginu je výraznější u SHR (Cortes et al., 1997). SHR mají pravděpodobně větší vnitřní zásoby  $\text{Ca}^{2+}$ . V případě zablokování RyR v  $\text{Ca}^{2+}$ -free médiu nevykazují proliferující kultury změnu v nárůstu cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  v obou kmenech. Naopak v konfluentní kultuře mikromolární koncentrace ryanodinu (blokátor RyR) signifikantně snižují ANG II-vyvolaný nárůst koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Markantnější snížení je patrné u SHR kmenů (až o 65% oproti médiu bez ryanodinu), než u WKY kmenů, kde došlo k poklesu o 45% (Cortes et al., 1997). Výsledky pokusů ukazují, že při odpovědích na ANG II je účast ryanodin-senzitivních  $\text{Ca}^{2+}$  zásob zvýšená u VSMC konfluentních kultur SHR. Přítomnost ryanodinu navíc potlačuje rozdíly mezi SHR a WKY. Z toho vyplývá, že vyšší odpovědovost SHR na ANG II v  $\text{Ca}^{2+}$ -free médiu je způsobená právě RyR. Rozdíly mezi proliferující a konfluentní kulturou mohou být způsobené rozdílnou expresí RyR v jednotlivých stádiích růstu buněk (Vallot et al., 2000).

## 7 Závěr

Diferencované (kontraktilní) a proliferující cévní hladkosvalové buňky se velmi liší z fyziologického i morfologického hlediska. Jednotlivé typy mají rozdílné prvky signálních drah, které ve výsledku vedou k obrovským změnám ve fenotypu buněk. Zajímavé je, že během genetické hypertenze dochází k některým změnám, které lze pozorovat během přepnutí z diferencovaného fenotypu do fenotypu proliferujícího. Cévní hladkosvalové buňky spontánně hypertenzních krys vykazují stejně jako buňky proliferující zvýšenou basální hladinu intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a podobné změny v expresi některých proteinů. Mnoho kardiovaskulárních onemocnění souvisí s abnormální kontraktibilitou a zrychleným růstem buněk hladkého svalu. Terapeutické postupy zaměřené na snížení intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a modulaci spřažení excitace-transkripce by mohly být účinné v prevenci buněčného růstu a proliferace.

## Seznam zkratek

$\alpha_1$ -AR	$\alpha_1$ -adrenergní receptor
ACE	angiotenzin konvertující enzym
ANG II	angiotenzin II
AT <sub>1</sub>	angiotenzinový receptor typu 1
ATP	adenosintrifosfát
BK <sub>Ca</sub>	vysokovodivostní Ca <sup>2+</sup> ovládané K <sup>+</sup> kanály
c-fos	transkripční faktor, protoonkogen
cADP	cyklický adenosindifosfát
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin závislá protein kináza
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CRE	cAMP reagující element
CREB	CRE-vázající protein
CTGF	růstový faktor pojivové tkáně
EGF	epidermální růstový faktor
ET-1	endotelin-1
ET <sub>A,B</sub>	endotelinový receptor typ A a B
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trifosfát
IP <sub>3</sub> R	inositol-1,4,5-trifosfátový receptor
NADPH	redukovaný nikotinamidadeninukleotidfosfát
NE	norepinefrin
NFAT	jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů
NO	oxid dusnatý
Orai1	pór formující molekula Ca <sup>2+</sup> kanálu
PDGF	destičkový růstový faktor
PKG	cGMP-dependentní protein kináza
RhoA	homolog genové rodiny Ras, člen A
ROK	Rho-asociovaná protein kináza
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
RyR	ryanodinový receptor
SHR	spontánně hypertenzní křisy
SOCE	vstup Ca <sup>2+</sup> kanály závislémi na vnitřních zásobách vápníku
Stim1	stromální interagující molekula 1
TRPC	nonselective transient receptor potential canonical
VEGF	cévní endotelový růstový faktor
VGCC	napěťově ovládané Ca <sup>2+</sup> kanály
VSMC	cévní hladkosvalové buňky
WKY	normotenzní Wistar-Kyoto křisy

## Seznam použité literatury

- Amberg, G. C., Bonev, A. D., Rossow, C. F., Nelson, M. T. & Santana, L. F. 2003. Modulation of the molecular composition of large conductance, Ca(2+)activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle during hypertension. *Journal of Clinical Investigation*, **112**, 717-724.
- Bannister, J. P., Bulley, S., Narayanan, D., Thomas-Gatewood, C., Luzny, P., Pachuau, J. & Jaggar, J. H. 2012. Transcriptional Upregulation of alpha(2)delta-1 Elevates Arterial Smooth Muscle Cell Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Surface Expression and Cerebrovascular Constriction in Genetic Hypertension. *Hypertension*, **60**, 1006-+.
- Baryshnikov, S. G., Pulina, M. V., Zulian, A., Linde, C. I. & Golovina, V. A. 2009. Orai1, a critical component of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, is functionally associated with Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump in proliferating human arterial myocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **297**, C1103-C1112.
- Bastin, G. & Heximer, S. P. 2011. Intracellular regulation of heterotrimeric G-protein signaling modulates vascular smooth muscle cell contraction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **510**, 182-189.
- Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V. & Golovina, V. A. 2008. Ca<sup>2+</sup> handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, **295**, C779-C790.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature*, **361**, 315-325.
- Berridge, M. J. 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. *Journal of Physiology-London*, **499**, 291-306.
- Black, M. J., Campbell, J. H. & Campbell, G. R. 1988. Does smooth-muscle cell polyploidy occur in resistance vessels of spontaneously hypertensive rats. *Blood Vessels*, **25**, 89-100.
- Bobbe, R., Hadri, L., Lopez, J. J., Sassi, Y., Atassi, F., Karakikes, I., Liang, L., Limon, I., Lompre, A. M., Hatem, S. N., Hajjar, R. J. & Lipskaia, L. 2011. SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **50**, 621-633.

- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J. & Cohen, R. A. 1994. Nitric-oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth-muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Bootman, M. D. & Berridge, M. J. 1996. Subcellular Ca<sup>2+</sup> signals underlying waves and graded responses in HeLa cells. *Current Biology*, **6**, 855-865.
- Bootman, M. D. & Lipp, P. 1999. Calcium signalling: Ringing changes to the 'bell-shaped curve'. *Current Biology*, **9**, R876-R878.
- Boss, V., Abbott, K. L., Wang, X. F., Pavlath, G. K. & Murphy, T. J. 1998. The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells - Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase c-coupled cell surface receptors. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 19664-19671.
- Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T. & Aldrich, R. W. 2000. Vasoregulation by the beta 1 subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature*, **407**, 870-876.
- Bukoski, R. D. 1990. Intracellular Ca<sup>2+</sup> metabolism of isolated resistance arteries and cultured vascular myocytes of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. *Journal of Hypertension*, **8**, 37-43.
- Bund, S. J., West, K. P. & Heagerty, A. M. 1991. Effects of protection from pressure on resistance artery morphology and reactivity in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Circulation Research*, **68**, 1230-1240.
- Cartin, L., Lounsbury, K. M. & Nelson, M. T. 2000. Coupling of Ca<sup>2+</sup> to CREB activation and gene expression in intact cerebral arteries from mouse - Roles of ryanodine receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Circulation Research*, **86**, 760-767.
- Catterall, W. A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**, 521-555.
- Cortes, S. F., Lemos, V. S., Corriu, C. & Stoclet, J. C. 1996. Changes in angiotensin II receptor density and calcium handling during proliferation in SBR aortic myocytes. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **271**, H2330-H2338.
- Cortes, S. F., Lemos, V. S. & Stoclet, J. C. 1997. Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **29**, 1322-1328.

- Cox, D. H. & Aldrich, R. W. 2000. Role of the beta 1 subunit in large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel gating energetics - Mechanisms of enhanced Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *Journal of General Physiology*, **116**, 411-432.
- Cox, R. H. & Lozinskaya, I. M. 1995. Augmented calcium currents in mesenteric-artery branches of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*, **26**, 1060-1064.
- Dohi, Y., Hahn, A. W. A., Boulanger, C. M., Buhler, F. R. & Luscher, T. F. 1992. Endothelin stimulated by angiotensin-ii augments contractility of spontaneously hypertensive rat resistance arteries. *Hypertension*, **19**, 131-137.
- England, S. K., Wooldridge, T. A., Stekiel, W. J. & Rusch, N. J. 1993. Enhanced single-channel K<sup>+</sup> current in arterial membranes from genetically hypertensive rats. *American Journal of Physiology*, **264**, H1337-H1345.
- Geisterfer, A. A. T., Peach, M. J. & Owens, G. K. 1988. Angiotensin-II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth-muscle cells. *Circulation Research*, **62**, 749-756.
- Giachini, F. R. C., Chiao, C. W., Carneiro, F. S., Lima, V. V., Carneiro, Z. N., Dorrance, A. M., Tostes, R. C. & Webb, R. C. 2009. Increased Activation of Stromal Interaction Molecule-1/Orai-1 in Aorta From Hypertensive Rats A Novel Insight Into Vascular Dysfunction. *Hypertension*, **53**, 409-416.
- Gollasch, M., Haase, H., Ried, C., Lindschau, C., Morano, I., Luft, F. C. & Haller, H. 1998. L-type calcium channel expression depends on the differentiated state of vascular smooth muscle cells. *Faseb Journal*, **12**, 593-601.
- Gomez, M. F., Stevenson, A. S., Bonev, A. D., Hill-Eubanks, D. C. & Nelson, M. T. 2002. Opposing actions of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors on nuclear factor of activated T-cells regulation in smooth muscle. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 37756-37764.
- Guimaraes, S. & Moura, D. 2001. Vascular adrenoceptors: An update. *Pharmacological Reviews*, **53**, 319-356.
- Hadrava, V., Tremblay, J. & Hamet, P. 1989. Abnormalities in growth-characteristics of aortic smooth-muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **13**, 589-597.
- Heagerty, A. M., Aalkjaer, C., Bund, S. J., Korsgaard, N. & Mulvany, M. J. 1993. Small artery structure in hypertension - dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, **21**, 391-397.

- House, S. J., Potier, M., Bisailon, J., Singer, H. A. & Trebak, M. 2008. The non-excitabile smooth muscle: Calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, **456**, 769-785.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E. & Chaudhuri, G. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric-oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 9265-9269.
- Klemm, D. J., Watson, P. A., Frid, M. G., Dempsey, E. C., Schaack, J., Colton, L. A., Nesterova, A., Stenmark, K. R. & Reusch, J. E. B. 2001. cAMP response element-binding protein content is a molecular determinant of smooth muscle cell proliferation and migration. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 46132-46141.
- Koss, K. L. & Kranias, E. G. 1996. Phospholamban: A prominent regulator of myocardial contractility. *Circulation Research*, **79**, 1059-1063.
- Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H. & Takeshita, A. 1996. Cell cycle-dependent expression of L- and T-Type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circulation Research*, **79**, 14-19.
- Lagaud, G. J. L., Randriamboavonjy, V., Roul, G., Stoclet, J. C. & Andriantsitohaina, R. 1999. Mechanism of Ca<sup>2+</sup> release and entry during contraction elicited by norepinephrine in rat resistance arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **276**, H300-H308.
- Lejemtel, T. H., Lambert, F., Levitsky, D. O., Clergue, M., Anger, M., Gabbiani, G. & Lompre, A. M. 1993. Age-related-changes in sarcoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and alpha-smooth muscle actin gene-expression in aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation Research*, **72**, 341-348.
- Lipskaia, L., del Monte, F., Capiod, T., Yacoubi, S., Hadri, L., Hours, M., Hajjar, R. J. & Lompre, A. M. 2005. Sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circulation Research*, **97**, 488-495.
- Liu, Y. P., Pleyte, K., Knaus, H. G. & Rusch, N. J. 1997. Increased expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive K<sup>+</sup> channels in aorta of hypertensive rats. *Hypertension*, **30**, 1403-1409.
- Liu, Z. M., Zhang, C. X., Dronadula, N., Li, Q. Y. & Rao, G. N. 2005. Blockade of nuclear factor of activated T cells activation signaling suppresses balloon injury-induced

- neointima formation in a rat carotid artery model. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 14700-14708.
- Lompre, A. M. 1998. The sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the cardiovascular system during growth and proliferation. *Trends in Cardiovascular Medicine*, **8**, 75-82.
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P. & Waldman, S. A. 2000. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, **52**, 375-413.
- Luscher, T. F. & Barton, M. 2000. Endothelins and endothelin receptor antagonists - Therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*, **102**, 2434-2440.
- Lytton, J., Westlin, M., Burk, S. E., Shull, G. E. & MacLennan, D. H. 1992. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic-reticulum family of calcium pumps. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 14483-14489.
- Matchkov, V. V., Kudryavtseva, O. & Aalkjaer, C. 2012. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signalling and Phenotype of Vascular Smooth Muscle Cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, **110**, 42-48.
- Mayr, B. & Montminy, M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2**, 599-609.
- Mombouli, J. V. & Vanhoutte, P. M. 1999. Endothelial dysfunction: From physiology to therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **31**, 61-74.
- Nakamura, Y., Nakamura, K. & Matsukura, T. 1988. Vascular angiotensin converting enzyme-activity in spontaneously hypertensive rats and its inhibition with cilazapril. *Journal of Hypertension*, **6**, 105-110.
- Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J. & Lederer, W. J. 1995. Relaxation of arterial smooth-muscle by calcium sparks. *Science*, **270**, 633-637.
- Paquet, J. L., Baudouinlegros, M., Brunelle, G. & Meyer, P. 1990. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, **8**, 565-572.
- Piasecki, M. T. & Perez, D. M. 2001. alpha(1)-adrenergic receptors: New insights and directions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **298**, 403-410.
- Pluger, S., Faulhaber, J., Furstenauf, M., Lohn, M., Waldschutz, R., Gollasch, M., Haller, H., Luft, F. C., Ehmke, H. & Pongs, O. 2000. Mice with disrupted BK channel beta 1



- subunit gene feature abnormal Ca<sup>2+</sup> spark/STOC coupling and elevated blood pressure. *Circulation Research*, **87**, E53-E60.
- Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Singer, H. A. & Trebak, M. 2009. Evidence for STIM1-and Orai1-dependent store-operated calcium influx through I-CRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration. *Faseb Journal*, **23**, 2425-2437.
- Pratt, P. F., Bonnet, S., Ludwig, L. M., Bonnet, P. & Rusch, N. J. 2002. Upregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR. *Hypertension*, **40**, 214-219.
- Pulver, R. A., Rose-Curtis, P., Roe, M. W., Wellman, G. C. & Lounsbury, K. M. 2004. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry activates the CREB transcription factor in vascular smooth muscle. *Circulation Research*, **94**, 1351-1358.
- Rich, S. & McLaughlin, V. V. 2003. Endothelin receptor blockers in cardiovascular disease. *Circulation*, **108**, 2184-2190.
- Rodriguez-Vita, J., Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Sanchez-Lopez, E., Plaza, J. J. & Egido, J. 2005. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, **97**, 125-134.
- Stevenson, A. S., Cartin, L., Wellman, T. L., Dick, M. H., Nelson, M. T. & Lounsbury, K. M. 2001. Membrane depolarization mediates phosphorylation and nuclear translocation of CREB in vascular smooth muscle cells. *Experimental Cell Research*, **263**, 118-130.
- Sun, P. Q., Enslen, H., Myung, P. S. & Maurer, R. A. 1994. Differential activation of CREB by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein-kinases type-II and type-IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. *Genes & Development*, **8**, 2527-2539.
- Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H. G. & Toro, L. 1997. Molecular constituents of maxi K-Ca channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha+beta subunit complexes. *Journal of Physiology-London*, **502**, 545-557.
- Vallot, O., Combettes, L., Jourdon, P., Inamo, J., Marty, I., Claret, M. & Lompre, A. M. 2000. Intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **20**, 1225-1235.
- Wamhoff, B. R., Bowles, D. K., McDonald, O. G., Sinha, S., Somlyo, A. P., Somlyo, A. V. & Owens, G. K. 2004. L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels modulate expression of

- smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism. *Circulation Research*, **95**, 406-414.
- Wamhoff, B. R., Bowles, D. K. & Owens, G. K. 2006. Excitation-transcription coupling in arterial smooth muscle. *Circulation Research*, **98**, 868-878.
- Wellman, G. C., Cartin, L., Eckman, D. M., Stevenson, A. S., Saundry, C. M., Lederer, W. J. & Nelson, M. T. 2001. Membrane depolarization, elevated Ca<sup>2+</sup> entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **281**, H2559-H2567.
- Zicha, J. & Kunes, J. 1999. Ontogenetic aspects of hypertension development: Analysis in the rat. *Physiological Reviews*, **79**, 1227-1282.