



MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta
Ústav experimentální biologie
Oddělení genetiky a molekulární
biologie



Regulace exprese proteinů
glykokalyx endoteliálních buněk

Bakalářská práce

Martin Kubeš

VEDOUCÍ PRÁCE: Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D
2013

Brno

Bibliografický záznam

Autor: Martin Kubeš
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Název práce: Regulace exprese proteinů glykokalyx endoteliálních buněk

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D

Akademický rok: 2012/1013

Počet stran:

Klíčová slova: Glykokalyx, endotel, syndekan, glypikan, perlekan, hyaluronan syntáza, Receptor CD44

Bibliographic entry

Author: Martin Kubeš
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav experimentální biologie

Title of thesis: Regulation of expression of endothelial cell glyocalyx proteins

Degree programme: Biology

Field of study: Molecular biology and genetics

Supervisor: Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D

Academic year: 2012/1013

Number of pages:

Keywords: Glyocalyx, endothelium, syndecan, glypican, perlecan, hyaluronan synthase, cluster of differentiation 44

Abstrakt:

Glykokalyx je důležitou strukturou na povrchu vaskulárního endotelu. Současné poznatky ukazují, že modulace tvorby glykokalyx může výrazným způsobem ovlivnit funkce endoteliálních buněk. Tam modulace tvorby glykokalyx může přispívat k rozvoji patologických procesů v cévách. Cílem práce bude literární rešerše zaměřená na současné poznatky o regulaci exprese proteinů, které patří mezi strukturní molekuly extracelulární matrix na povrchu endoteliálních buněk zejména syndekanů, glypikanů a perlekanu.

Abstract:

Glycocalyx is an important structure, emerging on vascular endothelium surface. Current findings denote that modulation of the glycocalyx production may influence function endothelial cells in significant manner. The modulation of glycocalyx production may contribute to development of pathological processes in vasculature. The aim of the bachelor thesis is to collect current knowledge about regulation of protein expression. The proteins of focus belong to structural molecules of extracellular matrix on the endothelial cells surface, especially we focus on syndecans, glypicans and perlecan.



Vysoká škola: Masarykova univerzita
Fakulta: Přírodovědecká
Ústav: Ústav experimentální biologie



Akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: Experimentální biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Směr: Molekulární biologie a genetika

Student(ka): **Martin Kubeš**

Vedoucí bakalářské práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto bakalářskou práci:

Název tématu: Regulace exprese proteinů glykokalyx endoteliálních buněk

Název tématu anglicky: Regulation of expression of endothelial cell glycolyx proteins

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Lukáš Kubala, PhD

Odborný konzultant: Mgr. Hana Kolářová, PhD

Zásady pro vypracování

Anotace: Glykokalyx je důležitou strukturou na povrchu vaskulárního endotelu. Současné poznatky ukazují, že modulační tvorby glykokalyx může výrazným způsobem ovlivnit funkce endoteliálních buněk. Tam modulační tvorby glykokalyx může přispívat k rozvoji patologických procesů v cévách. Cílem práce bude literární rešerše zaměřená na současné poznatky o regulaci exprese proteinů, které patří mezi strukturální molekuly extracelulární matrix na povrchu endoteliálních buněk zejména syndekanů, glypikanů a perlekanu.

- Co je to endoteliální glykokalyx, obecné funkce
- Struktura a jednotlivé komponenty endoteliálního glykokalyx
- Regulace exprese strukturálních proteinů (glykoproteinů a proteoglykanů) rozčleněno po jednotlivých skupinách (pokud možno i zahrnovat přítomnost na úrovni proteinů "proteinovou expresí"
- Syndecany
- Glypican
- Perlecan
- Regulace exprese dalších proteinů (glykoproteinů a proteoglykanů) vázajících na povrchu endoteliálních buněk GAG (HS, CS, HA) a tak hrající důležitou roli v 3D struktuře glycolyx
- CD44
- HAS
- Shrnutí

Časový harmonogram řešení (postup):

Rozsah bakalářské práce: 30 stran

Jazyk práce: český

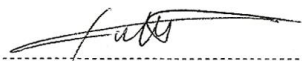
Seznam odborné literatury:

1. Jing Jing Yang, Yong Mei Chen, Takayuki Kurokawa, Jian Ping Gong, Shin Onodera, Kazunori Yasuda - Gene expression, glycocalyx assay, and surface properties of human endothelial cells cultured on hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel matrix with sulfonic moiety: Effect of elasticity of hydrogel
2. Michael Henrich, Marco Gruss, and Markus A. Weigand: Sepsis-Induced Degradation of Endothelial Glycocalyx
3. Martin Götte: Syndecans in inflammation
4. Robert D. Rosenberg, Nicholas W. Shworak, Jian Liu, John J. Schwartz, and Lijuan Zhang Heparan Sulfate Proteoglycans of the Cardiovascular system Specific Structures Emerge But How Is Synthesis Regulated?
5. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. Annu Rev Biomed Eng. 2007;9:121-67.
6. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. Pflugers Arch. 2007 Jun;454(3):345-59.
7. Role of Syndecan-1 in Leukocyte-Endothelial Interactions in the Ocular Vasculature Martin Götte,1,2 Antonia M. Jousen, Christoph Klein, Patrick Andre, Denisa D. Wagner, Michael T. Hinkes, Bernd Kirchhof, Anthony P. Adamis, and Merton Bernfield. Investigative Ophthalmology & Visual Science, April 2002, Vol. 43, No. 4
8. Syndecans in inflammation Martin Götte. Protogeneia, Inc., Münster, Germany

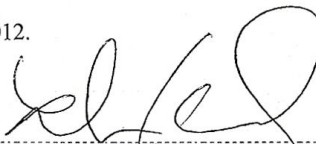
Datum odevzdání bakalářské práce: 19.10.2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

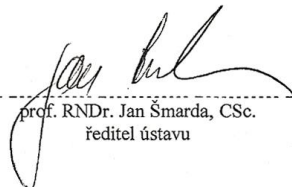
V Brně dne 14.11.2012.



Martin Kubeš
podpis studenta



Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.
podpis vedoucího bakalářské práce



prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel ústavu

Poděkování:

Upřímně si vážím času a konstruktivních připomínek ze strany mého školitele, Mgr. Lukáše Kubaly Ph.D. Děkuji za jeho vstřícný a trpělivý přístup i za patřičný nadhled nad tématem.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 6.5. 2013

.....

Martin Kubeš

Obsah:

1 Úvod: endoteliální glykokalyx a jeho obecné funkce	10
2 Struktura glykokalyx a jeho hlavní komponenty	11
2.1 Struktura glykokalyx	11
2.1.1 Hlavní komponenty glykokalyx	12
2.1.2 Glykosaminoglykany	12
2.1.3 Heparansulfát	12
2.1.4 Chondroitinsulfát	13
2.1.5 Keratansulfát a dermatansulfát	13
2.1.6 Hyaluronan	13
2.1.7 Proteoglykany a glykoproteiny	13
2.1.8 Syndekany	14
2.1.9 Glypikany	16
2.1.10 Perlekan	16
2.1.11 Receptor CD44	17
2.1.12 Hyaluronan syntáza	18
3 Regulace genové exprese strukturních proteinů	19
3.1 Syndekany	19
3.1.1 Syndekan-1	19
3.1.2 Syndekan-2	20
3.1.3 Syndekan-3	22
3.1.4 Syndekan-4	22
3.1.4.1 Infarkt a hypoxie	23
3.1.4.2 Působení lipopolysacharidu	24
3.1.4.3 Onkogeny	24
3.1.4.4 Ostatní faktory	24
3.2 Glypikany	24
3.2.1 Působení TNF- α	25
3.2.2 Vliv oxidovaných lipidů	25
3.3 Perlekan	26
4 Regulace exprese ostatních hlavních proteinů, vázajících GAG	29
4.1 Receptor CD44	29
4.2 Hyaluronan syntáza	31
5 Závěr	34
6 Seznam zkratk	36
7 Přehled literatury	37

1 Úvod: endoteliální glykokalyx a jeho obecné funkce

Endoteliální glykokalyx se nachází na povrchu endoteliálních buněk tepenného a žilního systému. Skládá se jak z látek produkovaných endoteliálními buňkami, tak z látek derivovaných z plazmy. Ačkoli je glykokalyx proměnlivá struktura, tendencí endoteliálních buněk je navracet jeho složení do rovnovážného stavu pokaždé, když se glykokalyx poruší, nebo deformuje. Enzymatické nebo proudové obrušování struktury glykokalyx je přirozeným procesem (Broekhuizen *et al.*, 2009, Reitsma *et al.*, 2007, Weinbaum *et al.*, 2007).

Endoteliální glykokalyx je makromolekulární vrstva, složená z glykosaminoglykanů (GAG), glykoproteinů, proteoglykanů a z proteinů plazmy. Glykokalyx se někdy označuje jako endoteliální povrchová vrstva (Endothelial surface layer). Proteoglykany a glykoproteiny mají funkci páteřních proteinů. Na nich jsou navázány GAG. Další složkou jsou malé molekuly jako např. kyselina sialová nebo anionické a kationické aminokyseliny, které mají tendenci se vázat ke GAG (Tarbell, 2010, Tarbell and Pahakis, 2006).

Za primární funkci glykokalyx je považována vaskuloprotekce – ochrana endotelu před poškozením. Součástí je také kontrola buněčných interakcí s endotelem. Přirozená struktura glykokalyx zabraňuje leukocytům v rolování po cévním endotelu. Vlivem např. zánětlivé reakce může dojít k porušení této funkce a v důsledku toho k odkrytí signálních proteinů umožňujících migraci skrz endotel. Glykokalyx také zamezuje přístupu červených krvinek, jak je pozorovatelné na blokační vrstvě, oddělující červené krvinky od endotelu, což dokazují studie *in vivo* (Klinke *et al.*, 2011). Další důležitou funkcí je přijímání a zprostředkování signálů z lumen, ale také uvolňování vlastních signálních molekul do lumen cévy. Povrch endotelu jako komunikační kanál zprostředkuje informace z cévního prostředí směrem dovnitř buněk endotelu. Zpravidla se jedná o informace o zánětlivých reakcích, nebo stimuly spouštějící tvorbu cév. U funkce glykokalyx jako mediátoru zánětlivých signálů se předpokládá, že některé jeho složky se při uvolnění do krevního řečiště stávají efektorovými molekulami a působí poté na jiných místech v těle, popřípadě v cévním systému (Götte, 2003).

Tloušťka glykokalyx není ve všech cévách shodná, ale roste s průměrem cévy (Megens *et al.*, 2007, Weinbaum *et al.*, 2007). Z výsledků pozorování elektronovou mikroskopií se dříve usuzovalo, že mocnost glykokalyx je okolo 100 nm. Pozorování cév *in vivo* společně s obarvením složek glykokalyx ovšem naznačuje, že vrstva by měla být vysoká 0,5 μm . Pro tento fakt svědčí také to, že leukocyty běžně s endotelem nereagují. Jejich výběžky jsou dlouhé okolo 100 nm a vážou se k oblastem glykokalyx, které jsou u povrchu

cytoplazmatické membrány. Vrstva glykokalyx tedy musí být nutně vyšší než 100 nm. Vazba leukocytů k endotelu často nastává při výstupu z kapilár do postkapilárních venul, kde dochází k deformaci vrstvy glykokalyx (Weinbaum *et al.*, 2007). Zde leukocyty dosáhnou k spodním vrstvám glykokalyx. Signální proteiny se tak stávají pro leukocyty dostupnými, ale za běžných podmínek jsou v glykokalyx ukryty. Nejnovější pozorování uvádí tloušťku vrstvy glykokalyx dokonce až 11 μm (Ebong *et al.*, 2011).

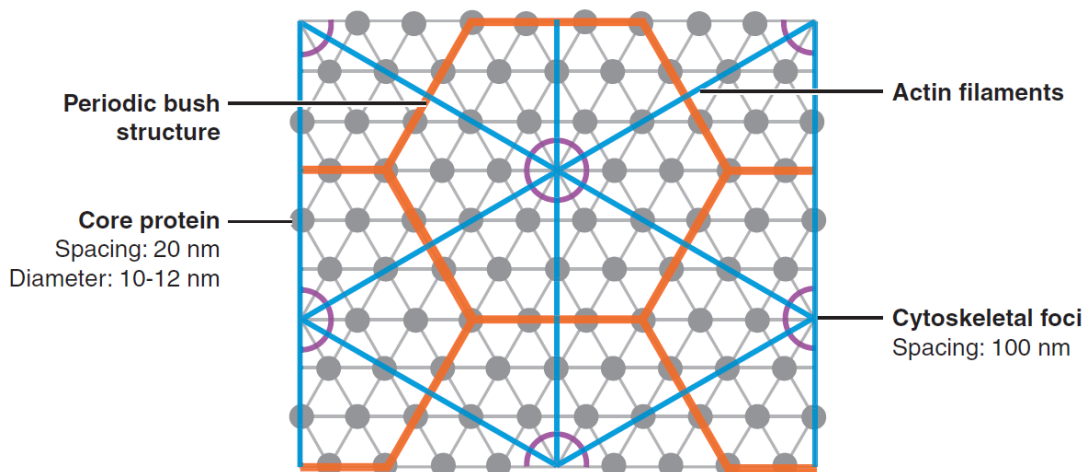
Mezi glykokalyx a krví panuje dynamická rovnováha. Protékající krev ovlivňuje tloušťku glykokalyx. Ten je dokonce soustavně enzymaticky rozkládán/obrušován – nelze ho povrchově přesně geometricky definovat. Jeho struktura však není chaotická. Roli v propustnosti glykokalyx hraje i náboj a vnitřní složení celé struktury. Náboj je negativní díky sulfataci mnoha řetězců. Díky tomu je glykokalyx schopný vázat velké množství vody a tím je dodána celé struktuře větší stabilita. I přesto je ale celá struktura značně nestabilní. Například enzymatické odstranění jedné z komponent dramaticky ovlivní celou kompozici (Weinbaum *et al.*, 2007). Ztráta jedné složky glykokalyx může dokonce zapříčinit ztrátu jeho funkce (Tarbell *et al.*, 2005).

2 Struktura glykokalyx a jeho hlavní komponenty

2.1 Struktura glykokalyx

Glykokalyx se skládá z velké části z GAG, glykoproteinů a proteoglykanů. Glykokalyx tvoří šestistěnné osově symetrické strukturní motivy (Obr. 1). K této struktuře je přes syndekany (SDC) připojena síť aktinového cytoskeletu. Je vidět, že pevnost glykokalyx je důležitým parametrem celého systému, jelikož šestistěnné uspořádání je jedním z nejpevnějších geometrických uspořádání v živočišné říši. Jednotlivé složky glykokalyx mají různou délku a jsou zastoupeny v rovnoměrném geometrickém uspořádání. Na celkovém složení se každá jeho složka podílí v různých poměrných zastoupeních. Proteinové složky jsou pouze bazální a jsou překryty molekulami GAG. Bazální složky mají často funkci receptorů a slouží pro přenos signálů do buňky, popřípadě vážou leukocyty z lumen a umožňují jim interagovat s endotelem. Naproti tomu složky středové či vrchní vrstvy mohou mít signální funkci směrem do lumen – např. hyaluronan je schopný uvolňovat do krevního řečiště svoje fragmenty o různé délce, které pak mají různé signální funkce.

Obrázek 1: Povrchové rozmístění složek endoteliálního glykokalyx na cytoplazmatické membráně, 2D schéma (Weinbaum *et al.*, 2007).



Na obrázku je viditelná periodická „keřovitá“ struktura glykokalyx s páteřními proteiny v cytoplasmě a s aktinovými vlákny, které se kotví k páteřním proteinům.

2.1.1 Hlavní komponenty glykokalyx

Zde více popíšu, jaká je struktura jednotlivých komponent glykokalyx na molekulární, funkční případně evoluční úrovni.

2.1.2 Glykosaminoglykany

GAG se skládají z disacharidových podjednotek z kyseliny uronové (d-glukuronová, l-iduronová) a glukosaminu (glukosamin, galaktosamin), většinou částečně esterifikovaného kyselinou sírovou. Jejich vzájemná kompozice a následná sulfatace pak rozhoduje, o jaký typ GAG řetězce se jedná. Obecně na disacharidovou podjednotku připadá 16 až 48 různých možností sulfatace (URL 1) a jelikož funkční domény bývají penta- až dekasacharidové, panuje zde obrovská strukturální rozmanitost. K běžným GAG patří především heparansulfát (HS), chondroitinsulfát (CS), dermatansulfát (DS), keratansulfát (KS) a hyaluronan (HA) (URL 2). Vazbou GAG řetězců na bílkoviny vznikají proteoglykany.

2.1.3 Heparansulfát

HS je nejčastěji se vyskytující GAG ve struktuře glykokalyx, kde je zastoupený z 50-90% (Weinbaum *et al.*, 2007). Nejběžnější disacharidová stavební jednotka se skládá z kyseliny glukuronové spojené s N-acetylglukosaminem (2-deoxy-2-acetamido- α -D-glukopyranosylem). Další stavební jednotky se mohou lišit sulfatací. Častou funkcí HS je

vazba signálních molekul. Přenos jejich signálu směrem do buňky pak zprostředkují páteřní proteiny.

2.1.4 Chondroitinsulfát

Řetězce CS jsou lineární polymery skládající se ze 40 až 100 nebo i více opakujících se disacharidových podjednotek N-acetylgalaktosaminu a kyseliny iduronové. CS se často vyskytuje jako dvouřetězec společně s DS. CS má záporný náboj a je tudíž schopný vázat vodu, podobně jako ostatní GAG.

2.1.5 Keratansulfát a dermatansulfát

KS a DS sice také patří mezi GAG, nejsou ale v souvislosti s proteiny glykokalyx tolik významné. Uvádím zde pro úplnost jejich krátký popis.

KS byl objeven roku 1939 a v současné době jsou známy dva typy: Typ I, obsahuje opakující se jednotky D-galaktózy a D-glukosamin-6-O-sulfátu. Typ II, obsahuje opakující se jednotky D-galaktózy a D-galaktosamin-6-O-sulfátu (URL 3).

DS bývá také nazýván chondroitin sulfát B. Základní stavební jednotkou je kyselina L-iduronová a N acetylgalaktosamin. Podjednotky jsou spolu spojeny β -1,4 nebo 1,3 vazbami a dávají vznik lineární struktuře (URL 4).

2.1.6 Hyaluronan

HA je dlouhá molekula, přibližně o velikosti 1 - 3 MDa. Je složen z opakujících se β 1,4 disacharidových jednotek kyseliny glukuronové, spojené β 1,3 vazbou k N-acetylglukosaminu (Usui *et al.*, 2000). HA není sulfatovaný. Jeho polyanionická struktura je dána karboxylovými skupinami, které molekule propůjčují hydratační vlastnosti. HA je kovalentně vázán na povrchu endotelu pomocí transmembránového receptoru CD44 a také pomocí řetězců CS (Weinbaum *et al.*, 2007). HA interaguje i sám se sebou a je schopen tvořit komplexy. Jeho syntéza probíhá na cytosolické straně buněčné membrány enzymy hyaluronan syntázami (HAS). Molekula HA již není následně modifikována.

2.1.7 Proteoglykany a glykoproteiny

Proteoglykany jsou složeny z páteřního proteinu a GAG, které se k němu vážou. Samotná glykosylace probíhá v Golgiho aparátu v mnoha krocích.

Glykoproteiny jsou proteiny se sacharidy, které se na ně vážou glykosylací. Jejich syntéza probíhá v endoplazmatickém retikulu a v Golgiho aparátu. Enzymy katalyzující vazbu sacharidů na proteiny se nazývají glykosyltransferázy. Podle vazby sacharidů rozlišujeme N-glykoproteiny, O-glykoproteiny a nově také C-glykoproteiny (URL 5).

2.1.8 Syndekany

SDC jsou transmembránové proteoglykany, evolučně odvozené od SDC, přítomného u bezobratlých. Obratlovci mají čtyři typy SDC, z nichž právě u třech, SDC-1, SDC-2 a SDC-4 je obecně známo, že jsou přítomné v endotelu (Tkachenko *et al.*, 2005). Některé studie ale potvrdily i přítomnost (SDC-3) na endoteliálním povrchu (Roskams *et al.*, 1995, Whitworth *et al.*, 2005).

Na molekulární úrovni je složení SDC rozděleno do tří strukturně odlišných celků. Prvním celkem je extracelulární doména s konsenzuálními sekvencemi pro vazbu GAG. SDC mají vazebná místa pro kovalentní vazbu tří až pěti molekul HS. SDC-1 je navíc schopný vázat místo HS i dvě molekuly CS (Carey, 1997, Tkachenko *et al.*, 2005). Extracelulární doména není příliš konzervovaná a často funguje jako příjemce signálu z lumen. Je schopná se odštěpovat a fungovat jako signální molekula (Fitzgerald *et al.*, 2000). Za extracelulární doménou následuje hydrofobní transmembránová doména a C-terminální cytoplazmatická doména. Transmembránová doména je ze své podstaty vysoce konzervovaná oblast proteinu. Cytoplazmatická doména je krátká a obsahuje dva vysoce konzervované a jeden hypervariabilní úsek. Cytoplazmatická část přímo navazující na transmembránovou část je identická jak u obratlovců, tak u bezobratlých. Na C-koncích všech SDC je také přítomná specifická tetrapeptidová sekvence (Carey, 1997). Pomocí svých cytoplazmatických konců jsou SDC vázány přes tubulin, dynamin a α -aktinin k cytoskeletu (Zhang Y. *et al.*, 1999).

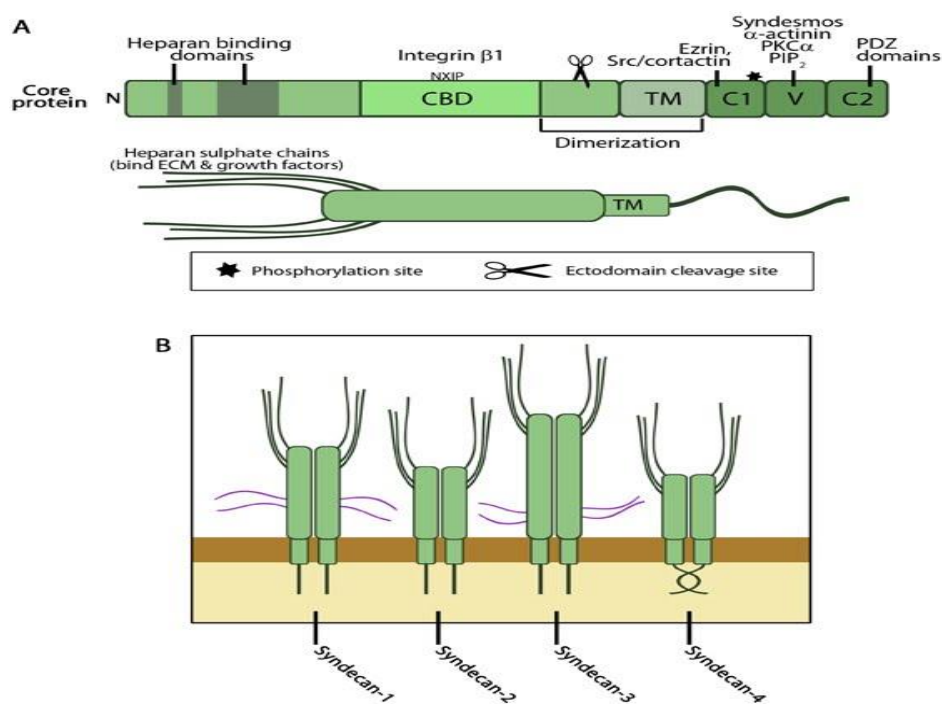
SDC v komplexu s GAG mohou interagovat s proteiny matrix, cytokiny a chemokiny. Řetězce HS, které jsou obohaceny o nesubstituované jednotky glukosaminu, mohou vázat L- a P-selektiny (Götte, 2003).

SDC-1 je více příbuzný SDC-3, SDC-2 pak zase SDC-4 (Obr. 2; URL 6).

Pro angiogenní působení SDC-1 je důležitá úloha heparanázy, která přeměňuje funkci SDC-1 z inhibiční na aktivační, důsledkem čehož je tvorba nových cév směřujících k místu, které je potřeba zahojit (Gerety *et al.*, 1999, Tkachenko *et al.*, 2005, Yuan *et al.*, 2004). SDC-2 je hojně přítomen hlavně během vývoje embrya a také se podílí na tvorbě cév. V dospělosti

představuje SDC-2 okolo 70% všech heparansulfátových proteoglykanů (HSPG) na endotelu. SDC-2 má zásadní fyziologický význam. Snížením exprese SDC-2 u endoteliálních buněk v mikrovaskulatuře mozku se snižuje jejich schopnost tvorby cévní trubice a formování tvaru kapilár *in vitro* (Fears et al., 2006). Další autoři ukázali, že snížení exprese SDC-2 v mikrovaskulatuře inhibuje plošnou velikost a adhezi endoteliálních buněk, navozuje vyšší migraci endoteliálních buněk a snižuje jejich schopnost tvořit kapiláry. SDC-2 má zásadní funkci pro tvorbu tvaru cévních struktur (Noguer *et al.*, 2009). SDC-4 je v endotelu zastoupen v menším množství oproti SDC-1 a SDC-2, případně SDC-3.

Obrázek 2: Struktura SDC, porovnání čtyř savčích typů (URL: 5)



A: Schéma funkčních oblastí SDC: Vlevo se nachází doména vážící HS. Následuje doména vazby k buňkám, která je definována pro SDC-4 a interaguje s integrinem $\beta 1$. V místech poblíž buněčné membrány je na SDC místo pro dimerizaci a také místo, které je rozeznáváno proteázami. Extracelulární část se zde může odštěpovat. Následuje transmembránová doména. Doména C1 interaguje s aktinovými vlákny, zatímco doména C2 interaguje s doménou PDZ proteinů a tvoří tak komplexy. Doména V interaguje se signálními proteiny. Dolní obrázek ukazuje strukturu monomeru SDC s navázanými HS řetězci

B: schématické porovnání čtyř typů SDC. SDC jsou *in vivo* vždy přítomné jako homodimery. SDC-1 a SDC-3 navíc kromě HS vážou také CS, které jsou na obrázku znázorněny fialově.

2.1.9 Glypikany

Glypikany (GPC) jsou HS proteoglykany, které jsou k cytoplazmatické membráně připojeny kovalentní kotvou z glykosylfosfatidylinositolu (GPI). Proto mohou být z povrchu glykokalyx uvolněny aktivitou fosfolipázy (Pries *et al.*, 2000). Rodina GPC obsahuje u obratlovců šest různých typů. Všechny GPC mají N-terminální signální sekvenci, dále globulární doménu obsahující motiv čtrnácti cysteinových reziduí, rozsáhlejší doménu umožňující vazbu GAG řetězců HS a hydrofobní C-terminální sekvenci. C-terminální sekvence hraje roli v tvorbě GPI kotvy (De Cat and David, 2001). U endoteliálních buněk je výrazně zastoupen pouze GPC-1 (Rosenberg *et al.*, 1997). Molekulová hmotnost GPC má rozsah 57 až 69 kDa. Protážená forma proteinu má velikost od 70 do 210 nm. S přihlédnutím k jejich sekundární a terciární struktuře odpovídá jejich efektivní délka výšce glykokalyx, udávané při pozorování elektronovým mikroskopem, tedy 50 – 100 nm (Pries *et al.*, 2000).

2.1.10 Perlekan

Perlekan (PLC) je také známý pod názvem HPSG2 (heparan sulphate proteoglycan 2). Můžeme ho nalézt v mnoha endoteliálních buňkách po celém těle. Barvení pro PLC ukazuje, že je přítomen v sinusoidálních endoteliálních buňkách jater. Reaktivitu vykazují i buňky jaterní arterie a portální žíly (Roskams *et al.*, 1995).

Skládá se z páteřního proteinu o hmotnosti 467 kDa. K tomuto páteřnímu proteinu jsou připojeny GAG řetězce. Obvykle se jedná o řetězce HS nebo CS. Páteřní protein se skládá z pěti hlavních domén: N-terminální doména I obsahuje vazebné místo pro HS. Doména II se skládá ze čtyř repetitivních, homologních k části LDL receptoru. Doména III vykazuje homologii k doménám lamininu IVa a IVb. Doména IV sestává z imunoglobulinových modulů (Ig-like). C-terminální doména V je homologní s dlouhým ramenem lamininu A (Cohen *et al.*, 1993). Pokud je PLC substituován HS, váže se k lamininu a kolagenu-IV. PLC se vyskytuje nejčastěji na bazální straně endoteliálních buněk, ne však výhradně (Maksimenko and Turashev, 2012, Weinbaum *et al.*, 2007, Whitelock *et al.*, 2008). V případě glykokalyx není PLC ukotven v cytoplazmatické membráně, ale nachází se na povrchu glykokalyx (Obr. 3). Přítomnost HS je důležitá pro přispění PLC k bariérové funkci endotelu.

Obrázek 3: Schéma složení endoteliálního glykokalyx (Haraldsson *et al.*, 2008).

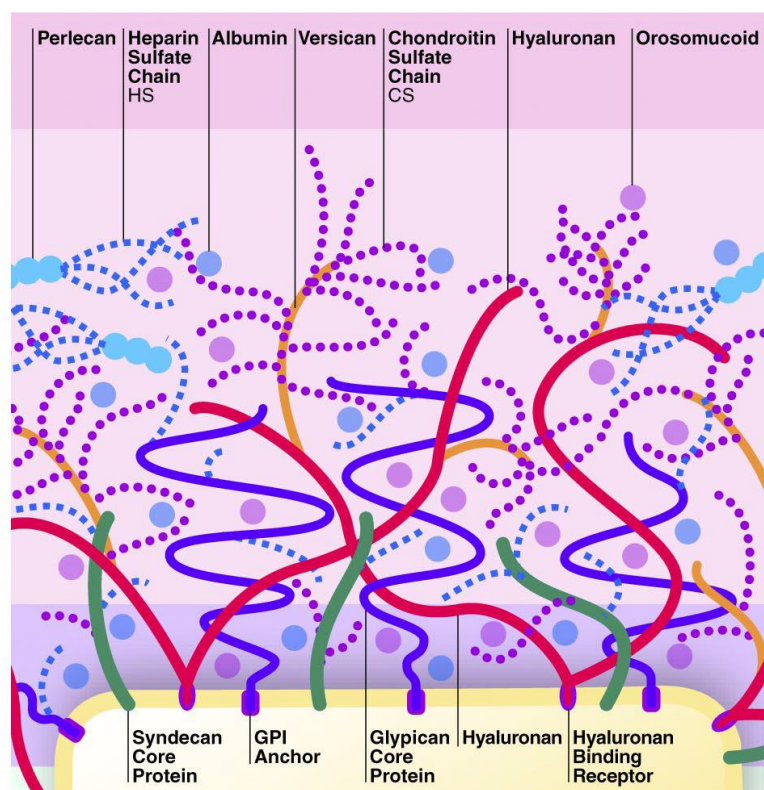


Schéma všech hlavních struktur, které se nachází na povrchu endoteliálních buněk. SDC a GPC jsou zakotveny v cytoplazmatické membráně, kdežto PLC je v glykokalyx vázán volně. Z hlavních GAG zde najdeme HA, CS a HS. Nejsou zobrazeny KS a DS, jelikož jejich zastoupení v endoteliální glykokalyx je minoritní.

2.1.11 Receptor CD44

Receptor CD44 (CD44) je membránově vázaný glykoprotein, který váže HA a další molekuly. Funkce CD44 se liší vzhledem k strukturní heterogenitě tohoto receptoru. Ta je dána možností alternativního sestřihu až deseti exonů (v-1 až v-10) u myši, popřípadě devíti exonů (v-2 až v-10) u lidí (Screaton *et al.*, 1993). Ve většině živočišných buněčných typů se exprimuje standardní varianta CD44s. Sestřihové varianty se označují jako CD44v. Většina variant sestřihu CD44 je substituována CS, pouze izoforma v3 obsahuje konsenzuální motiv ser-gly-X-gly pro navázání HS. Extracelulární doména CD44 může být navíc posttranslačně modifikována, obsahuje totiž několik míst pro N- a O- glykosylaci. Posttranslační modifikace ovlivňují funkce CD44. Receptor CD44 se na endoteliálních buňkách vyskytuje převážně v kaveolách (Obr. 4) (Forster-Horvath *et al.*, 2004).

Obrázek 4: Struktura glykokalyx z profilu (Weinbaum *et al.*, 2007)

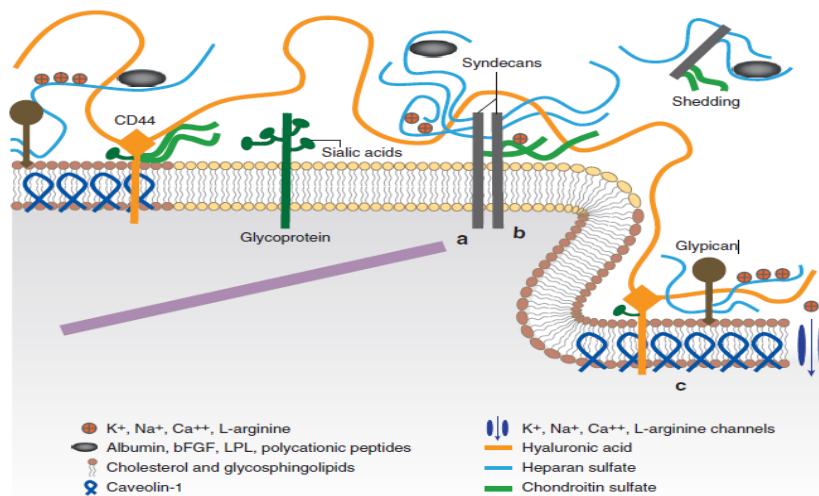


Schéma hlavních komponent glykokalyx. Na obrázku je patrné, v jakých částech cytoplazmatické membrány a jakým způsobem jsou navázány jednotlivé povrchové molekuly. Také je vidět jejich vzájemné vazby.

2.1.12 Hyaluronan syntáza

HAS je transmembránově lokalizovaný enzym, který produkuje HA do extracelulárního prostoru. Zároveň funguje jako kotevní molekula pro HA. V současnosti jsou u savců popsány tři typy HAS: HAS1, HAS2 a HAS3. Geny kódující jednotlivé typy HAS najdeme na rozdílných chromozomech. Rozdíly mezi těmito enzymy spočívají v délce HA, který syntetizují (Usui *et al.*, 2000).

3 Regulace genové exprese strukturních proteinů

Zde uvádím přehled toho, co dosud víme o změnách exprese jednotlivých proteinů na endoteliálním buněčném povrchu. V přehledu jsou uvedeny endotely z různých typů orgánů, z pozorování jak *in vitro*, tak *in vivo*. Uvedeny jsou výsledky působení látek jak tělu vlastních, tak cizích (mikrobiálních, jako např. LPS). Vzhledem k tomu, že ne všechny studie jsou prováděny na lidských buňkách, výsledky zahrnují i endoteliální buňky dalších druhů savců.

3.1 Syndekany

SDC jsou důležité proteoglykany z hlediska jejich připojení dalšími molekulami k aktinovému cytoskeletu. Mají také signální funkci. Jejich exprese a překlad do proteinů je ovlivňována několika popsánymi způsoby. Záleží i na tom, na jakém orgánu se endotel vyskytuje. Další rozdíly jsou pozorovatelné u jednotlivých živočišných druhů.

3.1.1 Syndekan-1

SDC-1 je také označován zkratkou CD 138. SDC-1 se vyskytuje na několika typech endoteliálních buněk, jak venul, tak arterií. SDC-1 je hojně exprimován v průběhu procesu hojení granulární tkáně, kdy dochází k novému utváření cév v místě poranění (Alexopoulou *et al.*, 2007, Gallo R.L. *et al.*, 1996, Kainulainen *et al.*, 1996). Kromě poranění kůže lze stejný proces pozorovat i u stavů po operaci u lidí, kdy značné zvýšení výskytu SDC-1 přetrvává právě ve vaskulatuře nově vytvořené pojivové tkáně až po dobu 28 dní po operaci (Alexopoulou *et al.*, 2007, Gallo R.L. *et al.*, 1996).

Exprese SDC-1 je regulována několika faktory. Jedním z nich je ephrinB2 exprimovaný například na makrofázích (Yuan *et al.*, 2004). EphrinB2 se váže na receptor, tyrozin kinázu EphB4, vyskytující se na membráně endotelu venul. Aktivace EphB4 po navázání EphrinB2 zvyšuje množství SDC-1 jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů. K tomuto dochází například během zánětu, kdy dochází k interakci endotelu s makrofágy, které na svém povrchu mají exprimován ephrinB2 (Yuan *et al.*, 2004). Během tohoto procesu dochází také ke zvýšení exprese synteninu, proteinu připojujícího SDC k cytoskeletálním proteinům (URL 8).

Dále je exprese SDC-1 regulována antimikrobiálním peptidem PR-39 derivovaným zánětlivými buňkami, který indukuje zvýšení exprese SDC-1. Toto bylo prokázáno na endotelu srdečních arterií během indukovaného experimentálního infarktu u myši a v podmínkách hypoxie *in vitro* (Gallo R. L. *et al.*, 1994).

Na expresi SDC-1 působí inhibičně faktor nádorové nekrózy α (TNF- α). TNF- α snižuje SDC-1 jak na úrovni RNA, tak na úrovni proteinů, a to v podmínkách se sérem i bez něj, jak bylo prokázáno na linii endoteliálních buněk lidské pupečnickové šňůry EA.hy 926 (Kainulainen *et al.*, 1996). Snížení exprese SDC-1 je koncentračně a časově závislé na expozici endoteliálních buněk k TNF- α (Kainulainen *et al.*, 1996). Snížení exprese SDC-1 pomocí TNF- α potvrdily i další publikace (Halden *et al.*, 2004, Tkachenko *et al.*, 2005). SDC-1 byl na endotelu snížený, ale jeho koncentrace se zvýšila v médiu, kde byly po ovlivnění TNF- α detekovány jeho ektodomény (Kainulainen *et al.*, 1996).

Faktory, které na expresi mRNA SDC-1 nemají vliv, jsou interferon γ (IFN- γ), růstový faktor fibroblastů 2 (FGF-2), interleukin-1 β (IL-1 β), transformující růstový faktor β (TGF- β), a růstový faktor fibroblastů 7 (FGF-7) (Kainulainen *et al.*, 1996). Některé studie zjistily ovlivnění exprese složek glykokalyx pomocí zvýšeného množství glukózy, jak tomu může být u pacientů s diabetem. Překvapivě na SDC neměla zvýšená hladina glukózy žádný vliv, jak bylo ukázáno na modelu endotelu v glomerulu (Singh *et al.*, 2011). Hodnoceny byly SDC-1, -2 a -4 (a také PLC a versikan). Vystavení glukóze trvalo 14 dní. K PLC se váže další studie, která naopak tvrdí, že ke změnám došlo po delším působení glukózy (viz dále).

3.1.2 Syndekan-2

SDC-2 je také znám pod označením fibroglykan. V endoteliálních buňkách je mRNA SDC-2 běžně exprimována. Ke zvýšení exprese SDC-2 dochází při zánětlivých stavech působením cytokinů interleukinu-1 α (IL-1 α), IL-1 β , TGF β a pomocí TNF- α (Götte, 2003, Halden *et al.*, 2004, Tkachenko *et al.*, 2005). Avšak Halden uvádí, že místo změny exprese může být v přítomnosti TNF- α pouze zvýšena stabilita mRNA SDC-2 (Halden *et al.*, 2004).

Exprese SDC-2 je regulována také růstovými faktory. Například růstovým faktorem fibroblastů (FGF) nebo růstovým faktorem cévního endotelu (VEGF). Exprese je zvýšena také aktivátory, kterými jsou fetální bovinní sérum (FBS) a phorbol-12-myristát-13-acetát (PMA). Změna exprese navozená růstovými faktory závisí i na typu kultivačního podkladu, na kterém endoteliální buňky rostou např. na fibronektinu, kolagenu nebo lamininu (Obr. 5). Fibronektin se vyskytuje ve větší míře v extracelulární matrix, sousedící s endoteliálními buňkami v poraněných tkáních. Kolagen a laminin se hojněji vyskytují v některých typech nádorů. Změny exprese byly pozorovány na kultuře endoteliálních buněk HMEC-1 (Human microvascular endothelial cells) (Noguer *et al.*, 2009). FGF zvyšuje expresi SDC-2 na podkladu z fibronektinu a to na dvojnásobek původní hodnoty. To, že FGF má na zvýšení

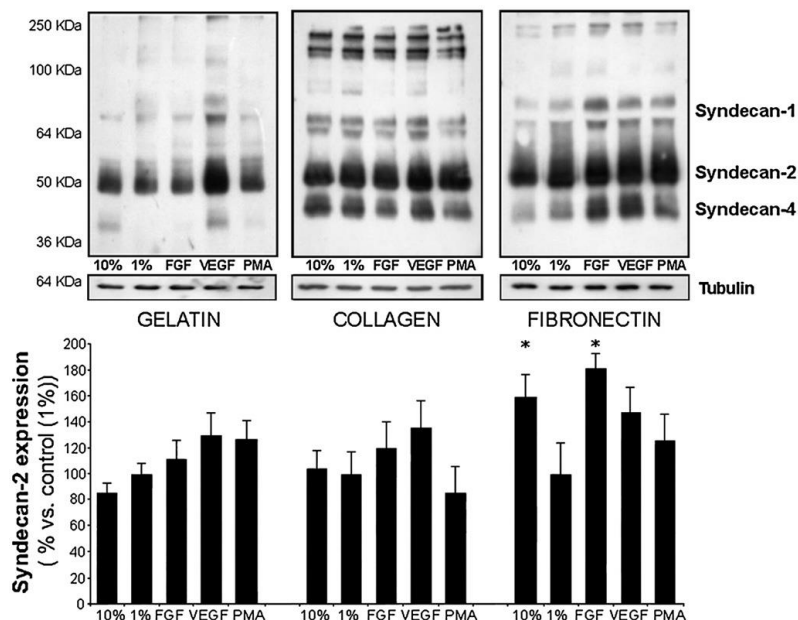
SDC-2 nejvýznamnější vliv je dáno také autoregulační smyčkou. SDC-2 interaguje s receptorem pro FGF, FGFR. Samotný SDC-2 je koreceptorem v odpovědi indukované pomocí FGF (Noguer *et al.*, 2009).

Obdobně jako FGF působí na expresi SDC-2 také VEGF. Na podkladech tvořených želatinou nebo kolagenem je také exprese SDC-2 za přítomnosti VEGF zvýšena (Noguer *et al.*, 2009).

Dále může být exprese SDC-2 zvýšena aktivátory, kterými jsou fetální bovinní sérum (FBS) a phorbol-12-myristát-13-acetát (PMA). PMA je schopen zvyšovat expresi SDC-2 přes mechanismus závislý na aktivaci proteinkinázy C (PKC) na vaskulárních endoteliálních buňkách (VEC) (Noguer *et al.*, 2009). Na buňkách HMEC-1 však nebyla zaznamenána výrazná změna exprese SDC-2 po tomto stimulu. 10% FBS zvyšuje expresi SDC-2 na podkladu z fibronektinu. V menší míře je exprese SDC-2 pomocí FBS zvýšena také na podkladu z kolagenu a želatiny (Noguer *et al.*, 2009).

Ve vaskulatuře nádorů je pozorována zvýšená exprese SDC-2 v gliomu u myši (Fears *et al.*, 2006)

Obrázek 5: Exprese SDC-2 na různých kultivačních podkladech (Noguer *et al.*, 2009)



Na obrázcích gelů nahoře jsou vidět rozdíly v intenzitě exprese SDC na jednotlivých kultivačních podkladech. Dolní schéma vyjadřuje procentuální rozdíl v expresi SDC-2 oproti kontrole při kultivaci s různými růstovými faktory a dalšími molekulami.

3.1.3 Syndekan-3

Různé zdroje uvádí, že by SDC-3 měl být přítomen v úseku endotelu portální žíly, vstupující do jaterní tkáně. SDC-3 se naopak nevyskytuje například v jaterních sinusoidálních cévách. Játra jsou značně specifický orgán a rozmístění SDC je heterogenní v závislosti na typu cévy (Roskams *et al.*, 1995). SDC-3 byl také objeven v endotelu vaječníků (Davies *et al.*, 2004, Whitworth *et al.*, 2005). Podle Whitwortha má být SDC-3 přítomný jak v malých, tak ve velkých kapilárách a korelovat s distribucí HS (Whitworth *et al.*, 2005). Ve značném počtu byla detekována také mRNA SDC-3 na linii lidských endoteliálních buněk pupečnickové šňůry (HUVEC) (Patterson *et al.*, 2005). Avšak podle některých zdrojů se SDC-3 v endotelu nevyskytuje (Weinbaum *et al.*, 2007).

Expresí SDC-3 byla zjištěna u několika patologických stavů. Výrazněji pozitivní endotel pro SDC-3 byl detekován u pacientů s revmatoidní artritidou oproti hodnotám v nerevmatoidním endotelu synovia. Zjištění bylo potvrzeno na úrovni mRNA. Výskyt mRNA SDC-3 v synoviálním endotelu byl zjištěn také u některých pacientů s osteoartritidou (Patterson *et al.*, 2005).

Expresí mRNA a proteinu pro SDC-3 nebyly v korelaci, je tudíž pravděpodobné, že translaci SDC-3 spouští další faktory. Míra exprese SDC-3 v endoteliálních buňkách nezávisela ani na zdravotním stavu pacientů, ti vykazovali stejný průběh a závažnost nemoci, ale v expresi SDC-3 se přesto lišili (Patterson *et al.*, 2005).

3.1.4 Syndekan-4

SDC-4 je známý také pod názvy ryudocan nebo amphiglycan. V endotelu je SDC-4 zastoupen v menším množství v porovnání s ostatními SDC (Tkachenko *et al.*, 2005). Přesto je problematika SDC-4 zmapována rozsáhleji. Text je proto rozdělen podle faktoru, navozujícího změnu jeho exprese.

Během vývoje organismu se exprese SDC-4 liší. Je popsána rozdílná exprese proteinu SDC-4 během embryonálního vývoje oproti dospělosti. Naopak podle Ishigura byla v cévách plodu exprese SDC-4 detekována (Ishiguro *et al.*, 2000). U mikrovaskulatury myší placenty je SDC-4 na úrovni mRNA i proteinů zvýšený. Myši, které jsou deficientní pro SDC-4 vykazují degenerativní stavy cév v placentě. Nedostatek SDC-4 způsobuje vývojové vady vaskulatury a náchylnost k tvorbě trombů (Ishiguro *et al.*, 2000).

Během vývoje cév je SDC-4 zvýšený i v králičím modelu (Deindl *et al.*, 2003). Adhikari naopak uvádí, že exprese mRNA SDC-4 není změněna (Adhikari *et al.*, 2011). SDC

mají vliv na strukturu a tvorbu vaskulatury. Jejich nedostatek způsobuje omezení funkčnosti cév nebo patologické stavy. Následující odstavce tento závěr podporují.

3.1.4.1 Infarkt a hypoxie

Infarkt je výrazným zásahem do organismu, a zhojení poškozené tkáně je nutně spjata s tvorbou nových cév. Zvýšení exprese SDC-4 bylo pozorováno jak na myším, tak na lidském modelu endotelu (Finsen *et al.*, 2004). U lidských pacientů s infarktem myokardu byla nejvyšší hodnota exprese SDC-4 zaznamenána po 2 až 3 týdnech.

Při infarktu dochází k hypoxii. Jedná se o stav nedostatečného zásobování tkáně kyslíkem tzv. ischemii. Ke stavu ischemie se pojí reperfúze. Reperfúze je stav obnovy proudění krve tkání, spojený s opětovným zásobováním postiženého místa kyslíkem.

In vitro indukuje hypoxie u endoteliálních buněk zvýšení SDC-4 na úrovni mRNA (Alexopoulou *et al.*, 2007, Ishiguro *et al.*, 2001). Například na buňkách ECV304, je pozorována dvojnásobná exprese mRNA SDC-4 v podmínkách hypoxie oproti kontrolnímu vzorku. Expresi proteinů je zvýšena 2,5 krát. Efekt se dostavuje po jedné hodině s maximem po třech hodinách a změna přetrvává 24 hodin.

Cytokin, který je myoblasty produkován, a mohl tuto změnu způsobit, je TNF- α . Díky testu na poločas životnosti bylo zjištěno, že TNF- α prodlužuje dobu, po kterou je možné pozorovat zvýšení exprese mRNA SDC-4 v buňkách (Zhang Y. *et al.*, 1999). Stejný mechanismus byl uvažován Haldenem v případě SDC-2 (Halden *et al.*, 2004). TNF- α má tedy na SDC-4 opačné účinky v porovnání se SDC-1 (Zhang Y. *et al.*, 1999). SDC-4 je gen včasné odpovědi při reakci na cévní zranění, ale SDC-1 nikoli (Alexopoulou *et al.*, 2007).

Je známo, že TNF- α je schopný aktivovat expresi genů přes transkripční faktor NF- κ B (Zhang Y. *et al.*, 1999). Promotor pro SDC-4 obsahuje vazebné místo pro NF- κ B a předpokládá se, že alespoň z části je možné expresi přes tuto dráhu ovlivnit. Inhibovat expresi SDC-4 přes NF- κ B je možné pomocí I κ B α . Právě TNF- α má schopnost aktivovat expresi SDC-4 vyvoláním rozkladu I κ B α v proteazomu. Pro ověření funkce TNF- α byl inhibován rozklad I κ B α v proteazomu, což je možné navodit lactacystinem. Výsledkem takového ovlivnění je skutečně zastavení účinku TNF- α na zvýšení exprese SDC-4 (Zhang Y. *et al.*, 1999). Působení TNF- α ve stavu hypoxie je podpořeno také metodou knock-outování genu TNF- α . Buňky knock-outované pro gen TNF- α nejsou schopné v podmínkách hypoxie navodit expresi SDC-4. Schopnost TNF- α zvýšit expresi SDC-4 a mimo jiné snížit expresi

SDC-1 umožňuje navodit růst endoteliálních buněk (Kainulainen *et al.*, 1996, Zhang Y. *et al.*, 1999).

3.1.4.2 Působení lipopolysacharidu

Působení lipopolysacharidu (LPS), který je složkou buněčné stěny Gram-negativních bakterií, provází bakteriální infekci. Expresi SDC-4 je pomocí LPS možné zvýšit v mikrovaskulatuře plic, střev, ledvin a jater.

Za účelem zjištění typu a mechanismu účinku LPS se využívá srovnání myši knock-outovaných pro gen SDC-4 a kontrolní varianty wild-type. V kontrolní variantě se po intraperitoneálním podání LPS zvýší exprese SDC-4. Při podání LPS knock-outovaným myším pro SDC-4, vykazují tyto myši vysokou mortalitu. Změna se u obou skupin myši neprojeví hned. Hodinu po injekci LPS ještě nejsou pozorovatelné rozdíly (Ishiguro *et al.*, 2001).

3.1.4.3 Onkogeny

V endotelu může být exprese SDC-4 ovlivněna také pomocí onkogenů. Na králičích modelech byl prokázán účinek onkogenu *Ej-ras*, který zvyšoval míru exprese SDC-4 endoteliálních buněk. Zvýšena byla také míra glykosylace SDC-4. Výsledky poukazují na to, že onkogen *Ej-ras* pozměňuje buněčný cyklus přes signální kaskády a kromě zvýšení SDC-4 snižuje množství enzymů, produkujících HS. Snižuje se také O-sulfatace HS (Lopes *et al.*, 2006). Jelikož sulfatovaný HS váže růstové faktory, je pravděpodobné, že omezení funkčnosti tohoto fyziologického procesu napomáhá rozvoji nádoru.

3.1.4.4 Ostatní faktory

Množství SDC-4 na buněčném povrchu může být regulováno také endocytózou. Tu je možné navodit po působení FGF-2. Celý proces funguje přes makropinocytickou dráhu (Tkachenko *et al.*, 2004).

Expresi SDC-4 v endotelu je zvýšena také při patologickém stavu IgA nefropatii (Yung *et al.*, 2001).

3.2 Glypikany

U savců najdeme 6 typů GPC, přičemž na endotelu se vyskytuje podle Weinbauma pouze GPC-1 (Weinbaum *et al.*, 2007). Podle Pattersona byl endoteliálními buňkami synovia

exprimován GPC-4, ale GPC1 a GPC3 nikoli (Patterson *et al.*, 2005). Jednotlivé typy endotelů se tedy mohou svojí expresí lišit.

Exprese GPC na povrchu buněčných membrán se mění také v průběhu vývoje. Tento jev je zajímavý i z hlediska vaskulární fyziologie. V myši aortě je mnohem vyšší exprese mRNA GPC-1, GPC-3 a GPC-4 v embryonální fázi oproti fázi dospělosti. Největší zastoupení ve fázi vývoje embrya má na endotelu GPC-3 (Adhikari *et al.*, 2011).

3.2.1 Působení TNF- α

Výrazným faktorem v regulaci GPC je opět TNF- α . Jeho působení snižuje expresi mRNA GPC v úměrné závislosti na koncentraci (Ramasamy *et al.*, 1995). TNF- α způsobuje zvýšení propustnosti endotelu a tím oslabení jeho funkce jako přirozené bariéry. Endoteliální bariéra odděluje funkční části cévy, jako jsou hladké svalové buňky od látek obsažených v krevní plazmě. Zvýšení propustnosti endotelu pomocí TNF- α je pozorovatelné jak *in vitro*, tak *in vivo*. Tento jev je spojený právě se snížením exprese GPC (Ramasamy *et al.*, 1995).

3.2.2 Vliv oxidovaných lipidů

Funkce endotelu jako selektivní bariéry může být narušena pomocí oxidovaných derivátů některých lipidů.

Jedním z lipidů, které ovlivňují endotel, je cholesterol. Ten dokáže redukovat mRNA proteoglykanů GPC a biglykanu. Cholesterol snižuje expresi mRNA buněčné kultury endoteliálních buněk při koncentracích 10 μ M a 20 μ M (Ramasamy *et al.*, 1996).

Dalším oxidovaným lipidem je hydroperoxylinoleová kyselina (HPODE). U PLC byla mRNA více snížena pomocí HPODE v porovnání s kyselinou linoleovou (18:2). HPODE dokáže snížit metabolismus proteoglykanů a změnit množství jejich mRNA v závislosti na koncentraci. HPODE po 12 a 24 hodinách snižuje expresi mRNA PLC. Obdobný účinek má i kyselina linoleová (Ramasamy *et al.*, 1996).

Oxidovaný lipid cholestan-3 β ,5 α ,6-triol (triol) dokáže změnit množství mRNA GPC. Triol v porovnání s kontrolním vzorkem zvyšuje koncentraci GPC po 6 hodinách. Při působení po dobu 12 a 24 hodin je účinek na GPC inhibiční a oproti kontrolnímu vzorku se koncentrace proteoglykanů sníží. Nízká koncentrace triolu (10 μ M) zvyšuje expresi mRNA PLC nad hodnotu kontrolního vzorku. Vysoká koncentrace (20 μ M) pak nemá další efekt (Ramasamy *et al.*, 1996).

3.3 Perlekan

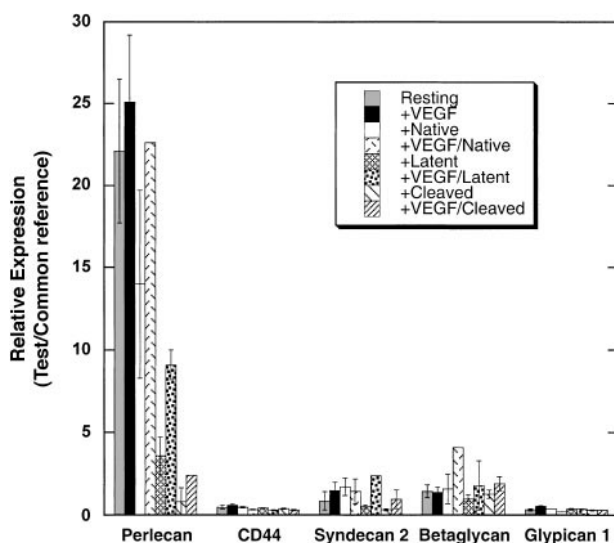
Regulace PLC je ovlivněna několika mechanismy, které jsou spolu vzájemně propojeny. Jeden z možných typů regulace PLC je závislý na tlaku krve proudící po endotelu. Jedná se proto o mechanotransdukční dráhu. Obecně je stav proudění krve označován jako proudové podmínky. Po proudovém působení krve se zvýší povrchová exprese PLC na endotelu (Baker *et al.*, 2008). Pro navození regulace PLC mechanotransdukční dráhou je zapotřebí aktivovat vnitrobuněčnou signalizační dráhu ERK pomocí autokrinního působení transformujícího růstového faktoru β (TGF- β), který je významným regulátorem exprese PLC na endoteliálním povrchu. Proces byl pozorován *ex vivo* na kolonii HUVEC (Baker *et al.*, 2008). Také Iozzo potvrzuje, že promotor pro lidský PLC je aktivován pomocí TGF- β (Iozzo *et al.*, 1997).

V signálování TGF- β je v dráze ERK významná i další molekula. Studie *in vitro* prokazují přítomnost protein kinázy aktivované mitogenem p38 (p38 MAPK) (Baker *et al.*, 2008). V souvislosti s tímto poznatkem byl potvrzen inhibiční účinek produkce PLC pomocí inhibitorů jak pro signální dráhu ERK, tak přímo pro p38 MAPK. Zvýšení exprese PLC, způsobené tlakem proudící krve, je také zablokováno inhibitory pro ERK a TGF- β (Baker *et al.*, 2008).

Povrchová exprese PLC se zvýší přidáním TGF- β i bez proudových podmínek. Samotný mechanismus zahrnující TGF- β tak patrně není závislý na proudových podmínkách. Zvýšení exprese je možné zastavit i pomocí inhibice signálování receptoru I pro TGF- β . Tu je možné navodit přidáním [3-(Pyridin-2-yl)-4-(4-quinonyl)]-1H-pyrazolu. Tím je potvrzena schopnost TGF- β spouštět tuto signální dráhu (Baker *et al.*, 2008).

Snížení exprese PLC se dá zajistit v endoteliálních buňkách několika mechanismy. Molekulou, která snižuje četnost PLC na endoteliálním povrchu je určitý typ antitrombinu (AT), takzvaného antiangiogenického antitrombinu (anAT), blokujícího tvorbu cév (Zhang W. *et al.*, 2004). Rozeznáváme dva druhy anAT s inhibičním účinkem – takzvanou odštěpenou formu (cAT – cleaved AT) a formu latentní (lAT – latent AT). Je třeba zmínit, že klasický antitrombin (AT) nemá inhibiční účinek. Velice důležité jsou vztahy mezi vyjmenovanými typy AT, molekulami TGF- β a FGF2, které budou popsány dále (Zhang W. *et al.*, 2004). Výsledky působení anAT shrnuje Obr. 6.

Obrázek 6: Schéma účinku jednotlivých typů AT na expresi PLC a dalších proteinů u buněčné linie HUVEC (Zhang W. *et al.*, 2004)



Jedná se o analýzu cDNA microarray. Koncentrace jednotlivých AT byla 20 µg/ml. Koncentrace VEGF byla 10 µg/ml. Expres je vztažena relativně k referenční RNA.

Expres PLC je výrazně snížena v kultuře HUVEC, po působení cAT i lAT. Po působení klasického AT ale k takové změně nedochází (Zhang W. *et al.*, 2004). Zároveň není pomocí anAT ovlivněna míra exprese dalších HSPG na endotelu. Snížení exprese nastává u buněčných kultur jak po stimulaci FGF2, tak bez této stimulace. U buněk stimulovaných FGF2 zastavily anAT proliferaci buněk ve fázi G1 (Zhang W. *et al.*, 2004).

Další molekulou v tomto mechanismu je TGF-β. TGF-β ruší inhibici exprese PLC pomocí anAT. TGF-β také ruší antiproliferativní účinek cAT. Proto je díky TGF-β expres PLC zvýšena, jak bylo popsáno výše. Je třeba podotknout, že cAT i lAT je produkován v buňkách při fyziologických podmínkách (Zhang W. *et al.*, 2004).

TGF-β je schopen utlumit inhibiční efekt anAT vztahující se k syntéze PLC (Zhang W. *et al.*, 2004). Působení TGF-β je tedy silnější nežli působení anAT. Oproti normálním buňkám nebo buňkám inkubovaným s klasickým antitrombinem způsobuje lAT 3 až 6 násobnou supresi PLC a cAT způsobí více jak desetinásobnou inhibici. Tento inhibiční efekt je možné pozorovat jak za kultivace HUVEC spolu s VEGF, tak bez VEGF. Ostatní proteoglykany jako SDC, GPC, betaglykan a CD44 nejsou působením AT výrazně ovlivněny (Zhang W. *et al.*, 2004).

U TGF- β byla pozorována ještě další vlastnost. TGF- β zesiluje účinek FGF2 a cAT utlumuje tento účinek pouze zlehka. Takto zesílený účinek zapříčiňuje velkou odolnost proti inhibici, způsobené cAT. PLC byl v takovém případě snížen velmi málo (Obr. 7).

Obrázek 7: Antiproliferativní účinek AT na buňky HUVEC, ovlivněné TGF- β a FGF2 (Zhang W. *et al.*, 2004)

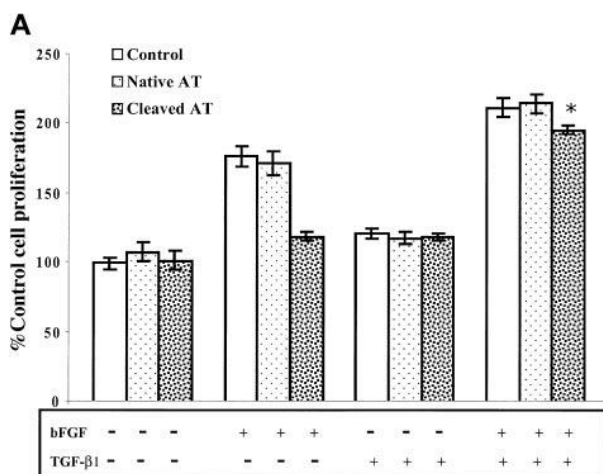


Schéma popisuje jednotlivé kombinace AT, TGF- β (5ng/ml) a FGF2 (10 ng/ml). Analýza byla prováděna po 48 hodinách. Graf ukazuje procento přežívajících buněk oproti kontrolnímu vzorku.

Dalším zajímavým faktem je to, že buňky inkubované s FGF2 mají podle studie Zhanga *et al.* 1,8 krát více PLC nežli kontrolní vzorek. Dokonce, pokud je přítomen přirozený AT, je exprese PLC ještě vyšší, a to 2,7 krát. Exprese mRNA PLC je výrazně zvýšena v přítomnosti přirozeného AT při kultivaci s FGF2 oproti kultivaci bez FGF2. Pozitivní regulace je tak zprostředkována i samotným antitrombinem (Zhang W. *et al.*, 2004).

Expres PLC byla v přítomnosti cAT i lAT snížena 2 krát až 3 krát jak s FGF2, tak bez něj, Formy anAT nejen že vyrušily zvýšení exprese PLC pomocí FGF2, ale dokonce snížily jeho hladinu v porovnání s přirozeným stavem (Zhang W. *et al.*, 2004). Ukazuje se tak, že FGF2 má nižší schopnost ovlivnit expresi PLC a odolávat účinku anAT na rozdíl od TGF- β .

Inhibice proliferace buněk linie HUVEC po stimulaci cAT, lAT a FGF2 byla způsobena zastavením přechodu buněk z fáze G1 do S fáze. Právě hladina koncentrace PLC může být příčinou tohoto jevu. PLC se ukazuje být důležitou molekulou pro regulaci proangiogenických i antiangiogenických procesů v endoteliálních buňkách (Zhang W. *et al.*, 2004).

V regulaci PLC hraje svoji úlohu i glukóza. Její 30mM dávka dokáže snížit expresi PLC na glomerulárních endoteliálních buňkách bezmála o 50%. Takový stav může vést k proteinurii, jak je tomu u diabetické nefropatie (Ha *et al.*, 2004).

4 Regulace exprese ostatních hlavních proteinů, vazajících GAG

Zde bude pojednáno o dvou proteinech endotelu, souvisejících s produkcí nebo vazbou HA. Jedná se o CD44, který váže HA, a o proteiny HAS, které jej syntetizují.

4.1 Receptor CD44

CD44 má více transkripčních variant, které se exprimují rozdílně v různých typech endotelu. Jednou z variant je CD44v3, jehož doména V3 je schopná vázat HS (Koopman *et al.*, 1998).

V endotelu bylo na immortalizovaných buňkách HUVEC detekováno CD44v3 na úrovni mRNA i proteinů. CD44v3 je v zásobním množství v cytoplazmě endoteliálních buněk, ale má jen omezenou povrchovou expresi. Povrchové rozmístění CD44v3 bylo velmi řídké a převážně koncentrované v buněčných protruzích (Kulseth *et al.*, 1999). Kromě linie HUVEC byl CD44v3 přítomen v endoteliálních buňkách linie Kaposiho sarkomu (KSIImm) (Forster-Horvath *et al.*, 2004). Někde naopak nebyl CD44v3 vůbec nalezen. Nevyskytuje se v primární kultuře lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk mozku. Jeho exprese nebyla zaznamenána ani u nízkých pasáží endoteliálních buněk (Griffioen *et al.*, 1997).

Již utvořené cévy jsou nereaktivní k protilátkám vůči CD44. Patří mezi ně HUVEC, kapiláry, cévy kosterního svalstva a ledvin (jak glomerulární, tak intertubulární kapiláry), malé arterioly a vény přítomné ve škáře. Je tedy pravděpodobné, že exprese CD44 je ovlivněna mechanismy spojenými s buněčnou proliferací. Tato domněnka je podpořena údaji o absenci CD44 na vaskulárních buňkách, které jsou v klidovém stadiu (Griffioen *et al.*, 1997). Ve tkáni placenty, kde se předpokládá vysoká míra tvorby cév, je CD44 zastoupeno v hojném množství a funguje jako ukazatel proliferace endoteliálních buněk. Když buňky postupně dorůstají konfluence, exprese CD44 v nich klesá. Konfluentní buňky začnou CD44 opět exprimovat, pokud se jejich konfluence sníží (Griffioen *et al.*, 1997).

Tuto hypotézu podporuje i situace v nádorové tkáni. V nádorech probíhá aktivní tvorba cévního systému, kdežto v klasických tkáních je již cévní síť utvořena. CD44v3 je zastoupena v nově tvořených cévách u mikrovaskulatury melanomu a rakoviny hlasivkové štěrbině (*glottis*) *in vivo*. To poukazuje na roli sestříhové varianty v3 v tvorbě nových cév

(Forster-Horváth, 2004). U solidních nádorů, je také exprese CD44 spojena s angiogenezí, jak ukazuje model karcinomu endotelu ledvin. CD44 je zde zvýšeno oproti normální nerakovinné tkáni stejného pacienta. Poměr CD44 dosahuje v karcinomem postiženém endotelu hodnoty 380% oproti normálním endoteliálním buňkám (Griffioen *et al.*, 1997).

Pro detekci buněčné proliferace se používá také analog pyrimidin-deoxynukleotidu thymidinu, 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), který zvyšuje expresi CD44. Buňky v nízké konfluenci vykazují 3 až 6 násobné zvýšení CD44 po 16 hodinovém ovlivnění BrdU (Griffioen *et al.*, 1997).

V regulaci exprese CD44 hraje roli také TNF- α . Jeho působení zvyšuje expresi CD44 (Kulseth *et al.*, 1999). Po čtyřech hodinách inkubace zvýší TNF- α expresi mRNA CD44 2,5 krát. Pokračující inkubace s TNF- α dokáže zvýšit 24 hodin po stimulaci hladinu mRNA CD44 5,5 krát. Na zvýšení exprese má účinek také IL-1 α , který na endotelu zvyšuje expresi CD44 na dvojnásobek. Delší inkubace s IL-1 α již aditivní efekt nemá. Míra exprese CD44 v případě obou ze stimulujících látek závisí na podaném množství (Kulseth *et al.*, 1999). Po působení TNF- α se také zvyšuje schopnost CD44 vázat HA na buněčném povrchu. Důležitá je v tomto procesu jeho konformační změna (Nandi *et al.*, 2000).

Lidské endoteliální buňky jsou také citlivé k regulaci exprese CD44 pomocí FGF2 a VEGF (Groffen *et al.*, 1999). Po ovlivnění FGF2 jsou maximální hodnoty exprese CD44 dosaženy po třech dnech. Výsledkem je zvýšená vazba HA endoteliálními buňkami. Růstové faktory, FGF2 a VEGF neovlivňují povrchovou expresi CD44v3, ta je za jejich působení stabilní (Forster-Horvath *et al.*, 2004, Groffen *et al.*, 1999).

Endoteliální buňky tvořící nové cévy v místě zhojení zánětu jsou vystaveny růstovým faktorům FGF2 a VEGF. Na pěstovaných buňkách HUVEC je možné pozorovat změnu exprese CD44 po 24 hodinách působení FGF2. Po třech dnech se hodnota exprese CD44 zvyšuje na dvojnásobek až trojnásobek. Ovlivnění je pouze přechodné, jelikož delší inkubace s FGF2 vykazuje opětovné snížení exprese CD44. To je způsobeno tím, že v danou dobu narostou buňky do konfluence a nastane snížení exprese CD44, jak bylo popsáno výše. Stejný účinek jako FGF2 měl i VEGF. Obdobnou regulaci vykazoval také endotel mikrovaskulatury škáry (Groffen *et al.*, 1999).

Existuje mnoho variant sestřihu CD44. Nejhojněji je na endotelu přítomna standardní varianta CD44s. Na nerostoucích buňkách je CD44 exprimován na úrovni mRNA. Byly objeveny minimálně dvě varianty mRNA CD44, obsahující exon v5. V endotelu byly objeveny varianty CD44 obsahující exon v5 a v10, a varianty exprimující pouze exon v3 nebo

v4. Exprese exonu v2 nebyla v aktivovaných endoteliálních buňkách prokázána (Groffen *et al.*, 1999).

Regulace CD44 závisí na variantě sestřihu, která je exprimována. Standardní varianta CD44s nereaguje na působení FGF2. Naopak, molekuly obsahující i variantu v5 jsou po působení FGF2 exprimovány. Nejvyšší hodnoty exprese mRNA CD44, obsahující exon v5 je možné detekovat 24 hodin po působení FGF2. Pro zjištění funkčního dopadu zvýšené exprese CD44 bylo ověřeno, že po působení FGF2 oproti kontrole vykazují endoteliální buňky zvýšenou vaznost k HA. Tu bylo pro potvrzení možné zablokovat pomocí protilátky proti CD44. Čerstvě izolované buňky HUVEC, které neexprimovaly CD44, nevázaly HA (Groffen *et al.*, 1999).

Zvýšená exprese CD44 v průběhu tvorby cév, popřípadě jako její výsledek, způsobuje intenzivnější signálování, vedoucí k proliferaci, migraci a diferenciaci endoteliálních buněk (Groffen *et al.*, 1999).

4.2 Hyaluronan syntáza

Výskyt HAS je v membráně endotelu nezbytný, jelikož HA tvoří značnou část struktury glykokalyx. Exprese HAS je na endotelu regulována třemi růstovými faktory: TGF- β , růstový faktor krevních destiček PDGF-BB (platelet-derived growth factor) a FGF (Usui *et al.*, 2000). V regulaci jsou zapojeny také geny proteinové rodiny Smad. Rodina Smad zahrnuje intracelulární přenašeče signálů, aktivovaných TGF- β (Usui *et al.*, 2000).

Všechny tři známé typy HAS jsou exprimovány na úrovni mRNA v buňkách endotelu rohovky skotu, BCEC (bovine corneal endothelial cells). Exprese HAS1 není pomocí TGF- β 1 a PDGF-BB ovlivněna a je nižší na úrovni mRNA v poměru k HAS2 (Usui *et al.*, 2000).

Exprese HAS2 je ovlivňována pomocí TGF- β 1 a PDGF-BB. Při stimulaci HAS2 navíc oba růstové faktory vykazují synergický, aditivní efekt. Stimulace mRNA pro HAS2 pomocí TGF- β je zároveň urychlena díky nadměrné expresi proteinů Smad2, Smad3 a Smad4. Inhibována je naopak pomocí Smad7. U všech zmíněných Smad je prokázáno, že jsou zahrnuty v transdukcii signálu od TGF- β k HAS. HAS2 není nadměrně exprimována pomocí Smad v přítomnosti pouze PDGF-BB (bez TGF- β 1), nebo za absence TGF- β 1 (Obr. 8) (Usui *et al.*, 2000).

Exprese HAS3 není pomocí TGF- β 1 a PDGF-BB ovlivněna. Její exprese je, také jako v případě HAS1, nižší na úrovni mRNA v poměru k HAS2 (Usui *et al.*, 2000).

Výsledky naznačují, že existuje signální spřažení mezi TGF- β a PDGF-BB na transkripční nebo translační úrovni. V případě exprese proteinů Smad4 za přítomnosti PDGF-BB není ovlivněna produkce mRNA HAS (Obr. 8). V případě Smad4 není pozorován synergický efekt TGF- β a PDGF-BB. Vysvětlením může být, že v přítomnosti Smad není mezi TGF- β a PDGF-BB žádné spřažení a že produkce HAS je dostatečně stimulována pouze pomocí Smad (Usui *et al.*, 2000).

Obrázek 8: Regulace HAS2 pomocí TGF- β 1, PDGF-BB a Smad (Usui *et al.*, 2000)

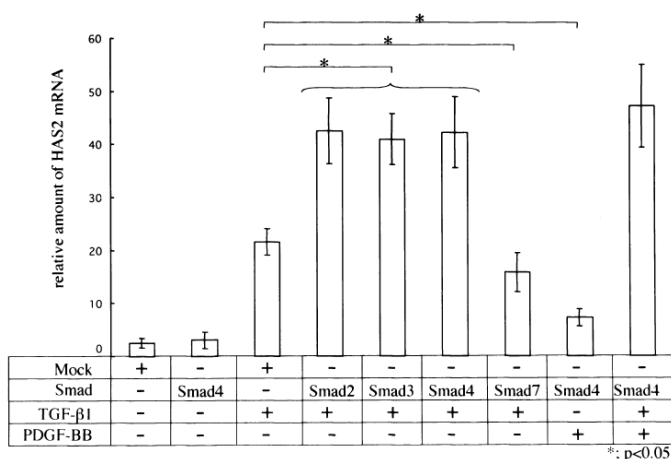


Schéma ovlivnění endoteliálních buněk. Elektroporací byla transfekována cDNA Smad. Zvýšení mRNA HAS2 bylo navozeno pomocí Smad2, Smad3 a Smad4. Inhibiči způsoboval Smad7. Smad nezměnila expresi HAS2 pokud nebyl přítomen TGF- β 1, nebo byl přítomen pouze PDGF-BB.

U lidských vaskulárních endoteliálních buněk VEC je situace podobná. Zde s tím rozdílem, že oproti buňkám BCEC je po působení TGF- β 1 a PDGF-BB změněna u VEC jak exprese HAS2, tak HAS1. Byly zkoumány případy několika proliferativních vitreoretinálních onemocnění (nemoci týkající se sklivce *corpus vitreum* a *retiny*). Synergický efekt obou signálních molekul nebyl v těchto modelech rovněž prokázán. Exprese HAS2 je na úrovni proteinů zvýšena po osmi hodinách u TGF- β 1 4 krát a u PDGF-BB 2 krát oproti buňkám bez stimulace. Kinetika TGF- β 1, ovlivňující expresi HAS2 má pravděpodobně pomalý průběh, mezi 24 a 48 hodinovou inkubací byl velký rozdíl v množství HAS2 (Suzuki, 2003).

Přítomnost HAS1 a HAS2 byla zjišťována u proliferativních membrán pacientů s PDR (proliferativní diabetická retinopatie), PVR (proliferativní vitreoretinopatie), nebo AMD (makulární degenerace spojená s věkem). HAS1 a HAS2 byly zjištěny u membrán pacientů s PDR. U pacientů s PVR nebyly prokázány. Žádná exprese HAS nebyla zaznamenána

v membránách pacientů s AMD. U proliferativních onemocnění není vázán HA v případě absence HAS. Tento stav přispívá k degenerativním stavům (Suzuki, 2003).

Exprese HAS3 je regulována pomocí TNF- α . Tato situace nastává v endotelu střev, na buněčném typu lidských mikrovaskulárních endoteliálních buněk střev, HIMEC (human intestinal microvessel endothelial cells). TNF- α zvyšuje expresi mRNA HAS3. Změny v expresi HAS1 a HAS2 nebyly po stimulaci TNF- α zjištěny (Kessler *et al.*, 2008).

5 Závěr

Práce pojednává o přítomnosti a regulaci hlavních proteinů na povrchu endoteliálních buněk. Byly popsány fyziologické stavy a s nimi spojené signální molekuly, které ovlivňují expresi genů studovaných proteinů na úrovni mRNA, nebo na proteinové úrovni. Jak bylo uvedeno, k jednotlivým proteinům se vážou specifické dráhy, které jsou mnohdy společné jak v rámci jednoho druhu na různých typech endoteliálních buněk, tak mezidruhově. Není to ale vždy pravidlem. V některých orgánech se endotel chová jinak než ve zbylých částech těla. Nejpatrnější je tento jev na endotelu jater.

Mnohé procesy jsou značně komplexní a některé molekuly mají dopad na expresi více proteinů současně a vzájemně je mohou i protichůdně regulovat. Tak tomu bylo například u TNF- α , který zvyšoval expresi SDC-2 a SDC-4, ale zároveň snižoval expresi SDC-1. Jelikož mnohé pokusy často uvažovaly vliv jedné konkrétní látky na funkci endoteliálních buněk, je třeba se do budoucna zamyslet, jaký je komplexní obraz vzájemných interakcí na endotelu. Pokud zahrneme látky, které spolu působí současně, jsme schopni udělat si lepší celkový obraz o funkci endotelu v jednotlivých procesech, ať se jedná o tvorbu nových cév v souvislosti s procesy hojení nebo nádorovým bujením. V případech ischemie jsou po vaskularizaci postiženého místa hodnoty exprese studovaných proteinů opět navraceny do rovnovážného stavu. Obdobný efekt regulace exprese proteinů je popsán také u stavů hojení.

Rozmanitost studií, jak z hlediska sledovaných druhů, tak z hlediska typů buněčných linií považuji za vhodný prvek náhledu na popisované procesy. Díky tomu je možné pokusit se odhalit univerzalitu takových procesů. Vzhledem k tomu že veškeré uvedené studie se týkaly savců, je možné vytvořit zobecněné závěry, které se poté podrobí ověření na buňkách lidských cév. K tomu aby byly pokusy co nejvíce fyziologicky relevantní, je potřeba se ve výzkumu zaměřit na simulaci proudových podmínek, které běžně panují v cévě. Ve studiích *in vitro*, uvedených v bakalářské práci nebyly takové podmínky simulovány, proto je do budoucna důležité učinit porovnání mezi statickými a proudovými buněčnými kulturami. To může přinést nové zajímavé výsledky, protože buňky se po působení proudových podmínek chovají odlišně oproti statickým podmínkám.

Aktuálnější studie se často odkazují i na články s výsledky, které byly provedeny před mnoha lety. Mnohdy nejsou výsledky ověřeny novým měřením, ale pokračuje se na jejich základech s navazujícím výzkumem. Je pravděpodobné, že současné přesnější analytické metody a nové poznatky odhalí skutečnosti, které dříve nebyly zvažovány. Na druhou stranu, pokusy s mnohými molekulami, ovlivňujícími expresi studovaných proteinů vykazovaly

očekávané výsledky v nových studiích. Funkce molekul tak byla ověřena pasivním způsobem – očekávaný efekt, který vědci zamýšleli, se v pokusech potvrdil. Obecná funkce takových molekul na endotelu je považována za známou a potvrzenou. Rozpory se vyskytují spíše v minimu případů. Cévní fyziologie bude patrně v budoucnu zaměřena na zkoumání větší komplexit\ procesů a také na přesah účinků za problematiku cév do širších souvislostí.

Zbývá podotknout, že celá oblast vaskulární fyziologie a genetiky nabízí stále mnoho otázek čekajících na vyřešení a můžeme se tedy o fungování těla v této oblasti stále mnoho dozvědět. Modely cévních systémů byly doposud velmi zjednodušené a často omezené pouze na 2D strukturu. Složitější pokusy s modely cév ve 3D matici by se mohly v dohledné době uskutečnit za pomoci technologií 3D tisku. Současná věda již v této oblasti učinila několik významných pokroků, od modelu cévy, osázené buňkami, po funkční plošný model jaterní tkáně. Prostředí 3D tisknutého endotelu tak do budoucna umožní sledovat morfologické a fyziologické rozdíly v jednotlivých typech endoteliálních buněk na jedné společné matici, protkané množstvím cév. Zároveň budou 3D pokusy mnohem blíže fyziologickým stavům *in vivo*, což jistě přinese přesnější výsledky.

6 Seznam zkratek

AT – Antitrombin
anAT – Antiangiogenický antitrombin
cAT – Odštěpený antitrombin
LAT – Latentní antitrombin
BCEC – Buňky endotelu rohovky skotu, (bovine corneal endothelial cells)
BrdU - 5-bromo-2'-deoxyuridin
CD44 – Receptor CD44
CD44s – Standardní varianta CD44
CD44v – Sestříhová varianta CD44
CS – Chondroitinsulfát
DS – Dermatansulfát
ERK – signalizační kaskáda ERK
FBS – Fetální bovinní sérum
FGF – Růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
FGFR – Receptor FGF
GAG - Glykosaminoglykany
GPC – Glypikan
GPI – Glykosylfosfatidylinositol
HA – Hyaluronan
HAS – Hyaluronan syntáza
HIMEC – Lidské mikrovaskulární endoteliální buňky střev (human intestinal microvessel endothelial cells)
HPODE – Kyselina hydroperoxylinoleová
HS – Heparansulfát
HSPG – Heparansulfátové proteoglykany
HUVEC – Lidské buňky endotelu pupečnickové šňůry (human umbilical vein endothelial cells)
IFN- γ – Interferon γ
IL-1 α – Interleukin 1 α
IL-1 β – Interleukin 1 β
I κ B α – Jaderný faktor I κ B α
KS – Keratansulfát
NF- κ B – Transkripční faktor NF- κ B
P38 MAPK – Protein kináza aktivovaná mitogenem p38
PDGF-BB – Růstový faktor krevních destiček (platelet-derived growth factor)
PKC – Proteinkináza C
PLC – Perlekan
PR-39 – Antimikrobiální peptid
SDC – Syndekan
Smad – gen Smad
Stat1 – Gen Stat1, Protein Stat1
TGF- β – Transformující růstový faktor β
TGF- β 1 – Transformující růstový faktor β 1
TNF- α – Faktor nádorové nekrózy α
Triol – Cholestan-3 β ,5 α ,6-triol
VEC – Vaskulární endoteliální buňky (vascular endothelial cells)
VEGF – Růstový faktor cévního endotelu (vascular endothelial growth factor)

7 Přehled literatury

- Adhikari N, Carlson M, Lerman B, Hall JL.** 2011. Changes in expression of proteoglycan core proteins and heparan sulfate enzymes in the developing and adult murine aorta. *J Cardiovasc Transl Res* **4** (3): 313-320.
- Alexopoulou AN, Multhaupt HA, Couchman JR.** 2007. Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* **39** (3): 505-528.
- Baker AB, Ettenson DS, Jonas M, Nugent MA, Iozzo RV, Edelman ER.** 2008. Endothelial cells provide feedback control for vascular remodeling through a mechanosensitive autocrine TGF-beta signaling pathway. *Circ Res* **103** (3): 289-297.
- Broekhuizen LN, Mooij HL, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H, Nieuwdorp M.** 2009. Endothelial glycocalyx as potential diagnostic and therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* **20** (1): 57-62.
- Carey DJ.** 1997. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* **327** (Pt 1): 1-16.
- Cohen IR, Grassel S, Murdoch AD, Iozzo RV.** 1993. Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (21): 10404-10408.
- Davies EJ, Blackhall FH, Shanks JH, David G, McGown AT, Swindell R, Slade RJ, Martin-Hirsch P, Gallagher JT, Jayson GC.** 2004. Distribution and clinical significance of heparan sulfate proteoglycans in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **10** (15): 5178-5186.
- De Cat B, David G.** 2001. Developmental roles of the glypicans. *Semin Cell Dev Biol* **12** (2): 117-125.
- Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, Schaper W.** 2003. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res* **92** (5): 561-568.
- Ebong EE, Macaluso FP, Spray DC, Tarbell JM.** 2011. Imaging the endothelial glycocalyx in vitro by rapid freezing/freeze substitution transmission electron microscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31** (8): 1908-1915.
- Fears CY, Gladson CL, Woods A.** 2006. Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **281** (21): 14533-14536.
- Finsen AV, Woldbaek PR, Li J, Wu J, Lyberg T, Tonnessen T, Christensen G.** 2004. Increased syndecan expression following myocardial infarction indicates a role in cardiac remodeling. *Physiol Genomics* **16** (3): 301-308.
- Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, Murphy G, Bernfield M.** 2000. Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol.* **148** (4): 811-824.

- Forster-Horvath C, Meszaros L, Raso E, Dome B, Ladanyi A, Morini M, Albin A, Timar J.** 2004. Expression of CD44v3 protein in human endothelial cells in vitro and in tumoral microvessels in vivo. *Microvasc Res* **68** (2): 110-118.
- Gallo RL, Kim C, Kokenyesi R, Adzick NS, Bernfield M.** 1996. Syndecans-1 and -4 are induced during wound repair of neonatal but not fetal skin. *J Invest Dermatol.* **107** (5): 676-683.
- Gallo RL, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M.** 1994. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (23): 11035-11039.
- Gerety SS, Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ.** 1999. Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* **4** (3): 403-414.
- Götte M.** 2003. Syndecans in inflammation. *FASEB J* **17** (6): 575-591.
- Griffioen AW, Coenen MJ, Damen CA, Hellwig SM, van Weering DH, Vooy W, Blijham GH, Groenewegen G.** 1997. CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation antigen on human endothelial cells. *Blood.* **90** (3): 1150-1159.
- Groffen AJA, Veerkamp JH, Monnens LA, van den Heuvel LP.** 1999. Recent insights into the structure and functions of heparan sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant.* **14** (9): 2119-2129.
- Ha TS, Duraisamy S, Faulkner JL, Kasinath BS.** 2004. Regulation of glomerular endothelial cell proteoglycans by glucose. *J Korean Med Sci.* **19** (2): 245-252.
- Halden Y, Rek A, Atzenhofer W, Szilak L, Wabnig A, Kungl AJ.** 2004. Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem J* **377** (Pt 2): 533-538.
- Haraldsson B, Nystrom J, Deen WM.** 2008. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* **88** (2): 451-487.
- Iozzo RV, Pillarisetti J, Sharma B, Murdoch AD, Danielson KG, Uitto J, Mauviel A.** 1997. Structural and functional characterization of the human perlecan gene promoter. Transcriptional activation by transforming growth factor-beta via a nuclear factor 1-binding element. *J Biol Chem* **272** (8): 5219-5228.
- Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Iwase M, Yoshikai Y, Yanada M, Yamamoto K, Matsushita T, Nishimura M, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T.** 2001. Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* **276** (50): 47483-47488.
- Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Nakamura E, Ito M, Nagasaka T, Kobayashi H, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T.** 2000. Syndecan-4 deficiency impairs the fetal vessels in the placental labyrinth. *Dev Dyn* **219** (4): 539-544.

- Kainulainen V, Nelimarkka L, Jarvelainen H, Laato M, Jalkanen M, Elenius K.** 1996. Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* **271** (31): 18759-18766.
- Kessler S, Rho H, West G, Fiocchi C, Drazba J, de la Motte C.** 2008. Hyaluronan (HA) deposition precedes and promotes leukocyte recruitment in intestinal inflammation. *Clin Transl Sci* **1** (1): 57-61.
- Klinke A, Nussbaum C, Kubala L, Friedrichs K, Rudolph TK, Rudolph V, Paust HJ, Schroder C, Benten D, Lau D, Szocs K, Furtmuller PG, Heeringa P, Sydow K, Duchstein HJ, Ehmke H, Schumacher U, Meinertz T, Sperandio M, Baldus S.** 2011. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood* **117** (4): 1350-1358.
- Koopman G, Taher TE, Mazzucchelli I, Keehnen RM, van der Voort R, Manten-Horst E, Ricevuti G, Pals ST, Das PK.** 1998. CD44 isoforms, including the CD44 V3 variant, are expressed on endothelium, suggesting a role for CD44 in the immobilization of growth factors and the regulation of the local immune response. *Biochem Biophys Res Commun* **245** (1): 172-176.
- Kulseth MA, Kolset SO, Ranheim T.** 1999. Stimulation of serglycin and CD44 mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF-alpha and IL-1alpha. *Biochim Biophys Acta* **1428** (2-3): 225-232.
- Lopes CC, Toma L, Pinhal MA, Porcionatto MA, Sogayar MC, Dietrich CP, Nader HB.** 2006. EJ-ras oncogene transfection of endothelial cells upregulates the expression of syndecan-4 and downregulates heparan sulfate sulfotransferases and epimerase. *Biochimie* **88** (10): 1493-1504.
- Maksimenco AV, Turashev AD.** 2012. No-reflow phenomenon and endothelial glycocalyx of microcirculation. *Biochem Res Int* **2012**: 859231.
- Megens RT, Reitsma S, Schiffers PH, Hilgers RH, De Mey JG, Slaaf DW, oude Egbrink MG, van Zandvoort MA.** 2007. Two-photon microscopy of vital murine elastic and muscular arteries. Combined structural and functional imaging with subcellular resolution. *J Vasc Res* **44** (2): 87-98.
- Nandi A, Estess P, Siegelman MH.** 2000. Hyaluronan anchoring and regulation on the surface of vascular endothelial cells is mediated through the functionally active form of CD44. *J Biol Chem.* **275** (20): 14939-14948.
- Noguer O, Villena J, Lorita J, Vilaro S, Reina M.** 2009. Syndecan-2 downregulation impairs angiogenesis in human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* **315** (5): 795-808.
- Patterson AM, Gardner L, Shaw J, David G, Loreau E, Aguilar L, Ashton BA, Middleton J.** 2005. Induction of a CXCL8 binding site on endothelial syndecan-3 in rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* **52** (8): 2331-2342.
- Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P.** 2000. The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **440** (5): 653-666.

- Ramasamy S, Lipke DW, Boissonneault GA, Guo H, Hennig B.** 1996. Oxidized lipid-mediated alterations in proteoglycan metabolism in cultured pulmonary endothelial cells. *Atherosclerosis* **120** (1-2): 199-208.
- Ramasamy S, Lipke DW, McClain CJ, Hennig B.** 1995. Tumor necrosis factor reduces proteoglycan synthesis in cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* **162** (1): 119-126.
- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG.** 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch* **454** (3): 345-359.
- Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L.** 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J Clin Invest.* **99** (9): 2062-2070.
- Roskams T, Moshage H, De Vos R, Guido D, Yap P, Desmet V.** 1995. Heparan sulfate proteoglycan expression in normal human liver. *Hepatology* **21** (4): 950-958.
- Screaton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG.** 1993. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem* **268** (17): 12235-12238.
- Singh A, Friden V, Dasgupta I, Foster RR, Welsh GI, Tooke JE, Haraldsson B, Mathieson PW, Satchell SC.** 2011. High glucose causes dysfunction of the human glomerular endothelial glycocalyx. *Am J Physiol Renal Physiol* **300** (1): F40-48.
- Suzuki K.** 2003. Expression of hyaluronan synthase in intraocular proliferative diseases: regulation of expression in human vascular endothelial cells by transforming growth factor- β . *Japanese Journal of Ophthalmology* **47** (6): 557-564.
- Tarbell JM.** 2010. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc Res* **87** (2): 320-330.
- Tarbell JM, Pahakis MY.** 2006. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J Intern Med* **259** (4): 339-350.
- Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD.** 2005. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* **33** (12): 1719-1723.
- Tkachenko E, Lutgens E, Stan RV, Simons M.** 2004. Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J Cell Sci* **117** (Pt 15): 3189-3199.
- Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M.** 2005. Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res* **96** (5): 488-500.
- Usui T, Amano S, Oshika T, Suzuki K, Miyata K, Araie M, Heldin P, Yamashita H.** 2000. Expression regulation of hyaluronan synthase in corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41** (11): 3261-3267.

Weinbaum S, Tarbell JM, Damiano ER. 2007. The structure and function of the endothelial glycocalyx layer. *Annu Rev Biomed Eng* **9**: 121-167.

Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV. 2008. Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry* **47** (43): 11174-11183.

Whitworth MK, Backen AC, Clamp AR, Wilson G, McVey R, Friedl A, Rappreger AC, David G, McGown A, Slade RJ, Gallagher JT, Jayson GC. 2005. Regulation of fibroblast growth factor-2 activity by human ovarian cancer tumor endothelium. *Clin Cancer Res* **11** (12): 4282-4288.

Yuan K, Hong TM, Chen JJ, Tsai WH, Lin MT. 2004. Syndecan-1 up-regulated by ephrinB2/EphB4 plays dual roles in inflammatory angiogenesis. *Blood* **104** (4): 1025-1033.

Yung S, Woods A, Tak MC, Davies M, Williams JD, Couchman R. 2001. Syndecan-4 up-regulation in proliferative renal disease is related to microfilament organization. *FASEB J.* **15** (9): 1631-1633.

Zhang W, Chuang YJ, Swanson R, Li J, Seo K, Leung L, Lau LF, Olson ST. 2004. Antiangiogenic antithrombin down-regulates the expression of the proangiogenic heparan sulfate proteoglycan, perlecan, in endothelial cells. *Blood* **103** (4): 1185-1191.

Zhang Y, Pasparakis M, Kollias G, Simons M. 1999. Myocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF-alpha. *J Biol Chem* **274** (21): 14786-14790.

Internetové zdroje

URL 1: chemistry.tutorvista.com

URL 2: <http://lekarske.slovníky.cz/>

URL 3: <http://www.medvik.cz/bmc/view.do?gid=235661&type=3>

URL 4: http://en.wikipedia.org/wiki/Chondroitin_sulfate

URL 5: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Glykoproteiny>

URL 6: <http://www.mechanobio.info/>

URL 7: <http://en.wikipedia.org/wiki/Perlecan>

URL 8: <http://www.uniprot.org/uniprot/O00560>