

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

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



Kateřina Matějková

Transkripční regulace ve vývoji sympatického srdečního systému
Transcriptional regulation in the development of the cardiac sympathetic system

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, PhD.

Praha, 2021

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, 6. 5. 2021

.....
Kateřina Matějková

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé neskonale trpělivé školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, PhD. za pomoc s obsahem i formou. Dále děkuji Ing. Romaně Bohuslavové, PhD. za cenné rady, které pomohly pozvednout práci na vyšší úroveň. V neposlední řadě děkuji rodině za neutuchající podporu v mém vzdělávání, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Abstrakt

Pochopení vývoje sympatického srdečního systému a identifikace genů, které ho regulují, je naprosto zásadním krokem pro vývoj terapeutických a diagnostických metod. Sympatikus vzniká z buněk neurální lišty, které jsou působením NRP1/SEMA3A a neuregulin/ERBB signalizací naváděny k dorsální aortě. Dorsální aorta iniciuje jejich diferenciaci směrem k sympatickému fenotypu. Tento proces je regulován transkripčními faktory, mezi které patří ASCL1, PHOX2A/B, GATA3, HAND2, HIF1A a ISL1. Sympatické neurony, naváděny BDNF/TRKB signalizací, následně migrují do svého konečného paravertebrálního umístění, odkud jejich axony rostou směrem k srdci. Růst axonů je regulován NGF/TRKA a NRP1/SEMA3A signalizací. Cílem této práce je shrnutí dosavadních poznatků (především z myšího modelu), které se týkají regulace vývoje sympatických neuronů a sympatického srdečního systému s důrazem na transkripční faktory. Tyto informace pomohou pochopit rozvoj některých kardiovaskulárních onemocnění, která jsou spojovaná s dysfunkcí sympatického systému a která jsou celosvětově stále dominantní příčinou úmrtí. Mezi tato onemocnění patří např. arytmie, kongestivní srdeční selhání či infarkt myokardu.

Klíčová slova: myší model, neurony, signální dráhy, srdce, sympatikus, transkripční faktory

Abstract

To improve modern therapeutic and diagnostic methods, it is crucial to understand the development of the cardiac sympathetic system and to identify the genes involved in its regulation. Neural crest cells give rise to the sympathetic precursors that migrate towards the dorsal aorta. This migration is regulated by the NRP1/SEMA3A and neuregulin/ERBB signaling. The differentiation towards the sympathetic phenotype is regulated by transcriptional factor networks, including ASCL1, PHOX2A/B, GATA3, HAND2, HIF1A and ISL1. Next, neurons migrate to the final paravertebral position, which is regulated by the BDNF/TRKB signaling. The final step in the development of cardiac sympathetic neurons is the axon growth and guidance towards the heart. This is regulated by the NGF/TRKA and NRP1/SEMA3A signaling. This thesis aims to map current knowledge of different regulation pathways involved in the cardiac sympathetic development (especially in the mouse model) with emphasis on transcriptional factors. This type of information should help us better understand the pathophysiology of some cardiovascular diseases associated with the dysfunctional sympathetic system, such as arrhythmias, congestive heart failure or myocardial infarction, which remain to be main causes of death worldwide.

Key words: heart, mouse model, neurons, signaling pathways, sympathetic system, transcriptional factors

Zkratky

ALK3	Activine receptor-like kinase	Aktivinovému receptoru podobná kináza
ANS	Autonomic nervous systém	Autonomní nervový systém
AP2B	Activator protein 2b	Aktivační protein 2b
ASCL1	Achaete-scute homologue 1	Homolog komplexu „achaete-scute“ u drozofily 1
AVN	Atrio-ventricular node	Atrioventrikulární uzel
BDNF	Brain derived nerotrophic factor 1	Mozkový neurotrofní faktor 1
BMP	Bone morphogenetic protein	Kostní morfogenetický protein
CREB	cAMP response element binding protein	Protein vážící se na cAMP responzivní element
DBH	Dopamine beta-hydroxylase	Dopamine beta-hydroxyláza
E	Embryonal day	Embryonální den
EDN1	Endothelin 1	Endotelin 1
EDNRA	Endothelin receptor A	Receptor endotelinu A
EKG	Electrocardiogram	Elektrokardiogram
ERBB2	Epidermal growth factor receptor 2	Receptor epidermálního růstového faktoru 2
ERBB3	Epidermal growth factor receptor 3	Receptor epidermálního růstového faktoru 3
GATA3	Gata-binding factor 3	Gata vazebný faktor 3

ICA	Intrinsic cardiac adrenergic cells	Srdci vlastní adrenergní buňky
ISL1	Insuline gene enhancer 1	Zesilovač genu pro insulin 1
INSM1	Insulinoma-associated protein 1	Protein spojený s nádorem beta buněk pankreatu 1
HAND2	Heart and neural-crest derivatives expressed protein 2	Protein exprimovaný srdcem a deriváty neurální lišty 2
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1	Hypoxií indukovaný faktor 1
MEF2C	Myocyte-specific enhancer 2c	Zesilovač specifický pro myocyty 2c
NET	Norepinephrine transporter	Norepinefrinový transportér
NGF	Nerve growth factor	Nervový růstový faktor
NRP1	Neuropilin 1	Neuropilin 1
NT3	Neurotrophin 3	Neurotrofin 3
mRNA	Messenger ribonucleic acid	Mediátorová ribonukleová kyselina
siRNA	Small interfering RNA	Malá interferující RNA
p75	p75 Neurotrophin receptor	Receptor neurotrofinu p75
PHOX2A	Paired-like homebox 2a	Transkripční faktor s párovou homeoboxovou doménou 2a
PHOX2B	Paired-like homebox 2b	Transkripční faktor s párovou homeoboxovou doménou 2b

PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase	Fenyletanolamin N-metyltransferáza
SAN	Sino-atrial node	Sinoatriální uzel
SEMA3A	Sempahorine 3a	Semaforin 3a
SMAD4	SMAD family member 4	Člen rodiny SMAD proteinů 4
SOX10	SRY-related HMG-box10	HMG-box příbuzný s pohlaví určující oblastí 10
TGF	Transforming growth factor	Transformující růstový faktor
TH	Tyrosine hydroxylase	Tyrosin hydroxyláza
TRKA	Tropomyosine receptor kinase A	Tropomyosinová receptorová kináza A
TRKB	Tropomyosine receptor kinase B	Tropomyosinová receptorová kináza B
TUBB3	Tubulin beta-3 chain	Řetězový beta-3 tubulin
VSCM	Vascular smooth muscle cells	Buňky vaskulární hladké svaloviny
WNT	Wingless/Integrated 1	Zkratka z názvu Wingless/Integrated 1

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Anatomie srdečního sympatiku.....	2
2.1	<i>Obecná anatomie sympatiku.....</i>	2
2.2	<i>Preganglionické neurony srdečního sympatiku.....</i>	4
2.3	<i>Postganglionické neurony srdečního sympatiku.....</i>	5
2.4	<i>Převodní systém srdeční.....</i>	5
3	Katecholaminy – jejich syntéza a role ve vývoji sympatiku	7
3.1	<i>Receptory katecholaminů.....</i>	8
3.2	<i>Katecholaminy syntetizující enzymy a jejich úloha v embryonálním vývoji</i>	8
3.3	<i>Syntéza katecholaminů v preinervačním období a srdci vlastní adrenergní buňky.....</i>	9
4	Obecný vývoj srdečního sympatiku	9
4.1	<i>Neurální lišta a sympatoadrenální linie</i>	9
4.1.1	<i>Migrace buněk budoucího sympatiku</i>	10
4.1.2	<i>Specifikace buněk sympatoadrenálního systému</i>	10
5	Molekulární podstata diferenciacce sympatických neuronů a role transkripčních faktorů	11
5.1	<i>Role trofických faktorů v migraci buněk neurální lišty.....</i>	13
5.2	<i>Kostní morfogenetický protein („bone morphogenetic protein“, BMP)</i>	14
5.3	<i>HMG-box příbuzný s pohlaví určující oblastí 10 („SRY-related HMG-box 10“, SOX10).....</i>	15
5.4	<i>Homolog komplexu „achaete-scute“ u drozofily 1 („achaete-scute homolog 1“, ASCL1).....</i>	16
5.5	<i>Transkripční faktory s párovou homeoboxovou doménou 2a/b („paired-like homeobox 2a/b“, PHOX2A/B)</i>	17
5.6	<i>GATA vazebné faktor 3 („GATA binding factor 3“, GATA3)</i>	20
5.7	<i>Protein exprimovaný srdcem a deriváty neurální lišty 2 („heart and neural crest derivatives-expressed protein 2“, HAND2).....</i>	21
6	Další transkripční faktory a možnosti regulace vývoje sympatiku	22
6.1	<i>Protein spojený s nádorem beta buněk pankreatu 1 („insulinoma-associated protein 1“, INSM1) ...</i>	22
6.2	<i>Zesilovač genu pro insulin 1 („insuline gene enhancer protein 1“, ISL1).....</i>	22
6.2.1	<i>Hypoxií indukovaný faktor 1alfa („hypoxia-inducible factor 1alfa“, HIF1-α).....</i>	23

6.3	<i>DICER1</i>	24
6.4	<i>Aktivační protein 2b</i> („ <i>activator protein 2b</i> “, <i>AP2B</i>).....	24
7	Migrace sympatických ganglií a navádění axonů k srdci	24
7.1	<i>Migrace primárních ganglií</i>	25
7.2	<i>Navádění axonů k srdci</i>	25
7.3	<i>Ustanovení srdeční inervace a přežívání neuronů</i>	26
7.3.1	Nervový růstový faktor („ <i>nerve growth factor</i> “, <i>NGF</i>) a neurotrofin 3 („ <i>neurotrophin 3</i> “, <i>NT3</i>). 26	
7.3.2	Semaforin 3a („ <i>semaphorin 3a</i> “, <i>SEMA3A</i>)	28
8	Patologie sympatického nervového systému	28
9	Závěr.....	30
10	Citace.....	32

1 Úvod

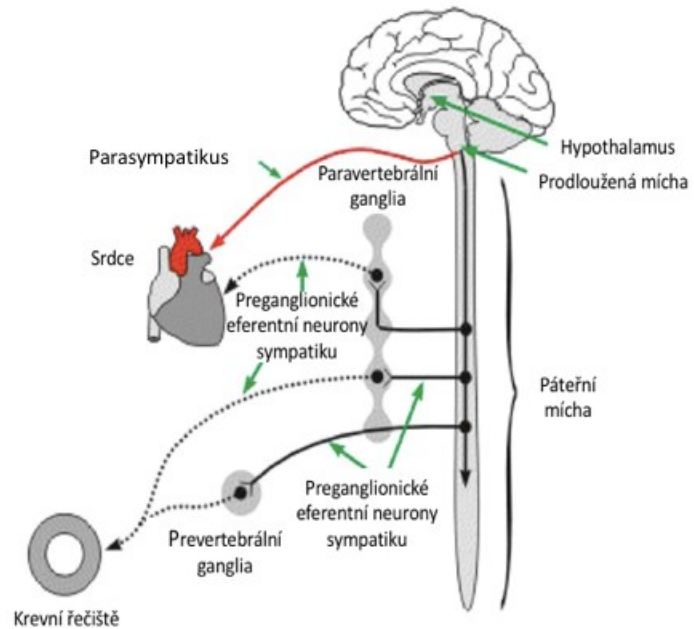
Sympatický nervový systém zodpovídá společně s parasympatickým za inervaci srdce a jeho fyziologickou funkci. Vznikne-li mezi sympatikem a parasympatikem nerovnováha nebo je narušen jejich vývoj, dochází k rozvoji fatálních onemocnění. Mezi ně patří např. arytmie, hypertenze, kongestivní srdeční selhání či infarkt myokardu, které mohou vést k náhlému srdečnímu úmrtí. Kardiovaskulárními chorobami celosvětově trpí 523 milionů lidí a v důsledku kardiovaskulárních onemocnění umírá každý rok 18,6 milionů lidí. Prevalence těchto onemocnění a ztracená léta života v důsledku nemoci nepřestávají růst. Nejčastější kardiovaskulární chorobou je ischemická choroba srdeční, která může vést k rozvoji infarktu myokardu či různých typů arytmií, mezi něž patří např. chvění síní a atriální fibrilace. Těmito onemocněními trpí celosvětově 59,7 milionů lidí a tento počet se neustále zvyšuje (Roth et al., 2020; Pius-Sadowska and Machaliński, 2021).

Pro pochopení vzniku patologií srdeční inervace v dospělosti je naprosto zásadní porozumět embryonálnímu vývoji srdečního sympatického systému. Molekulární a buněčné mechanismy, které za vývojem srdečního sympatiku stojí, mohou dát základ diagnostickým i terapeutickým metodám. Jako v případě mnoha jiných patologií by totiž i u vzniku a léčby kardiovaskulárních onemocnění mohlo jít alespoň částečně o působení podobných mechanismů jako v embryonálním vývoji. Poznatky o vývoji sympatiku by mohly být užitečné především ve vývoji léčby arytmií, které vznikají buď během vývoje nebo později v životě např. po infarktu myokardu. Tyto stavy mohou nejen snižovat kvalitu života jedince, ale mohou vést k náhlému srdečnímu úmrtí. V léčbě těchto onemocnění se uplatňují přístupy farmakologické (např. beta blokátory), inovativní molekulární terapie či neuromodulace. Zajímavým uplatněním poznatků o vývoji tohoto komplexního systému je i reinervace srdce po transplantaci, která hraje zásadní roli ve funkčnosti transplantovaného srdce, a má tedy velký vliv na kvalitu života pacienta. V této práci jsou shrnuty funkce transkripčních (např. ASCL1, PHOX2B, GATA3, HAND2, HIF1A, ISLA1) a trofických faktorů (NGF, SEMA3A), které hrají roli ve vývoji srdečního sympatiku, a vztahy mezi nimi.

2 Anatomie srdečního sympatiku

2.1 Obecná anatomie sympatiku

Autonomní nervový systém (dále jen ANS) zajišťuje inervaci vnitřních orgánů a tkání. Sestává ze dvou částí – sympatiku a parasympatiku (Obrázek 1). Rozdíl mezi oběma částmi je dán anatomickými odlišnostmi, jiným zastoupením neurotransmiterů a antagonistickým účinkem na cílové orgány. Zahrnuje jak neurony centrálního nervového systému (tj. mozku a míchy), tak neurony periferní. ANS zprostředkovává kontrolu nad řadou orgánů a tkání (hladká a srdeční svalovina, žlázy) s cílem udržet homeostazi v těle. ANS sestává z aferentních (dostředivých) a eferentních (odstředivých) neuronů a z interneuronů. Aferentní neurony

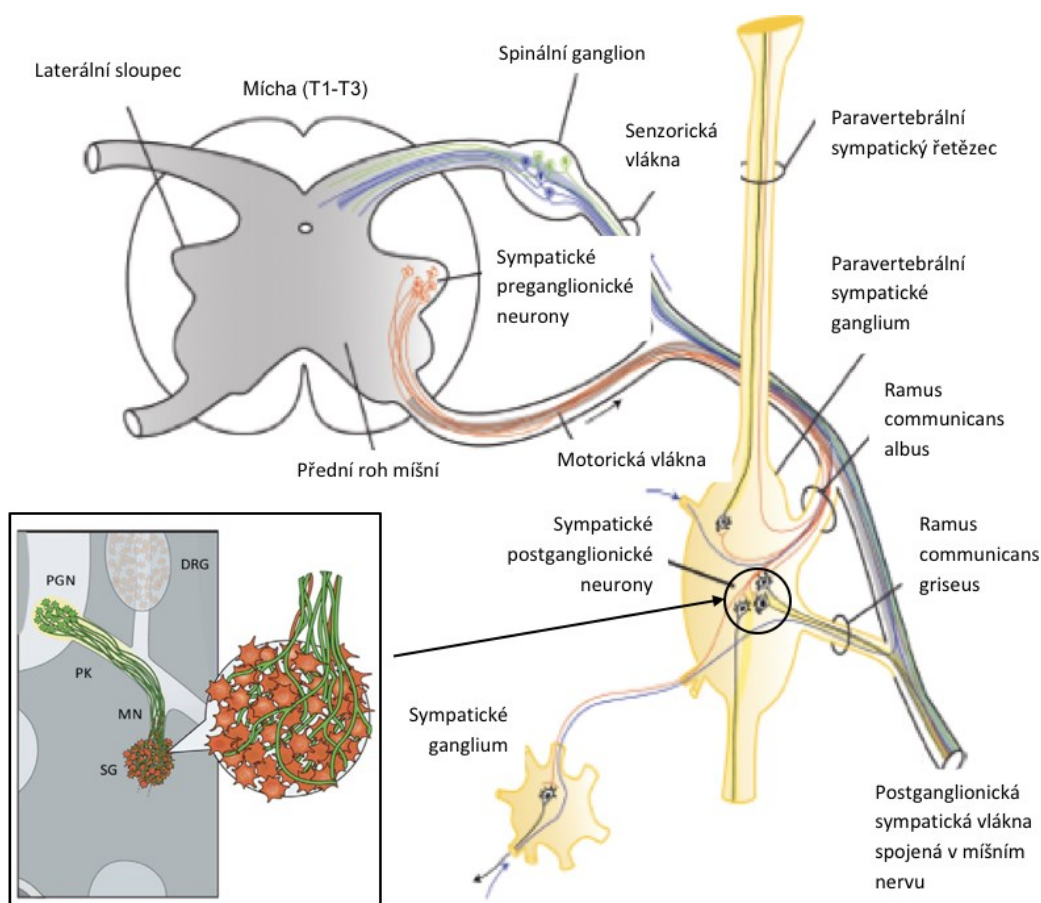


Obrázek 1. Autonomní nervový systém ANS se skládá ze systémů sympatiku a parasympatiku, jež mají antagonistickou funkci. Oba systémy zajišťují kontrolu nad orgány a tkáněmi za účelem zachování homeostaze. Upraveno podle (Klabunde, 2018).

vedou impulsy od viscerálních receptorů (receptory vnitřních orgánů a tkání) a přenáší je do centrálního nervového systému. Zde jsou impulsy zpracovány prostřednictvím interneuronů. Impuls je z centrální nervové soustavy veden eferentními neurony k cílovým orgánům (Snell, 2010). Níže popisovaná anatomie platí pro člověka, nebyly však prokázány významné rozdíly mezi základní anatomii sympatiku člověka a myši. Pokud není zmíněno jinak, dle dosavadních zdrojů je zde popisovaná anatomie platná pro oba druhy (Jobling, 2012; Laflamme et al., 2012).

Sympatikus, stejně jako parasympatikus, začíná v centrální nervové soustavě, neinervuje však cílové orgány a tkáně přímo. Sympatické neurony vystupují z centrální nervové soustavy jako neurony preganglionické, v gangliích tvoří synapse s postganglionickými neurony (Obrázek 2), které zajišťují inervaci cílových orgánů (Čihák, 2004b). Těla preganglionických neuronů se nacházejí v postranních rozích šedé kůry míšni.

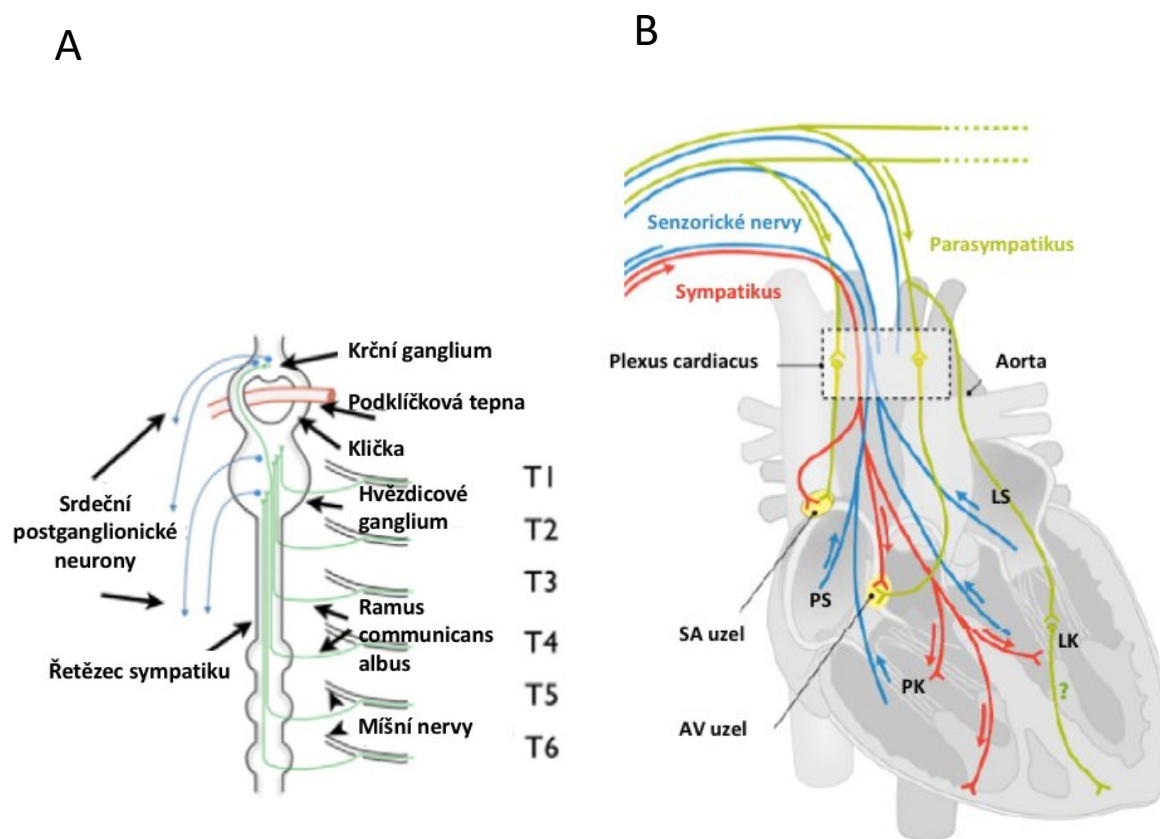
V případě sympatiku u člověka je to od hrudního obratle 1, po bederní obratel 3 (případně 2). Preganglionická vlákna opouštějí míchu společně s předními kořeny míšními jakožto eferentní neurony. Poté prochází skrze *rami communicantes albi* do paravertebrálních ganglií sympatického kmene (Obrázek 3). Zde tvoří synapse s postganglionickými neurony, které se buď se vrací jako *rami communicantes grisei* do míšních nervů a podél jejich větví míří do efektorového místa (hladká svalovina kůže a cév a potní žlázy) nebo odstupují přímo ze sympatického kmene a inervují cílové orgány (Čihák, 2004b). Sympatický kmen je párový provazec ganglií, který vede po obou stranách páteře. Během vývoje odpovídá počet obratlů počtu paravertebrálních ganglií, některá již během zárodečného vývoje však splývají, jejich konečný počet se tak snižuje (Čihák, 2004b; Snell, 2010).



Obrázek 2. Anatomie sympatiku v míše a přilehlých oblastech Těla preganglionických neuronů (PGN) leží v laterálních rozích šedé kůry míšni. Jejich neurony vystupují z míchy jako součást ventrálních provazců (MN), oddělují se od nich avytvářejí *ramus communicans albus*, skrze něj vstupují do paravertebrálních sympatických ganglií (SG). Zde tvoří synapse s neurony postganglionickými, případně inervují efektorový orgán přímo (chromafinní buňky v dřeni nadledvin). Postganglionické neurony opouští paravertebrální ganglia jako *ramus communicans grisei* a inervují cílové orgány. Upraveno podle (Kasemeier-Kulesa et al., 2015; Wehrwein et al., 2016). DRG = dorsální ganglion, T = hrudní obratle

2.2 Preganglionické neurony srdečního sympatiku

Srdeční sympatické preganglionické neurony leží u člověka v paravertebrální oblasti mezi prvním a šestým hrudním obratlem. Nejzásadnější je oblast prvního hrudního obratle a dále pak s klesajícím vlivem až po pátý hrudní obratel. Neurony z této oblasti se významně podílejí na sympatické kontrole srdeční aktivity (Randall and McNally, 1960). Jejich axony vedou do hvězdicového ganglia (*ganglion stellatum*), z něhož vystupují sympatické neurony inervující srdce. Toto ganglium leží poblíž příčného výběžku sedmého krčního obratle na rozhraní krční a hrudní oblasti páteře a na inervaci srdce se podílí s dalšími ganglii z krční oblasti (Čihák, 2004a). Preganglionické neurony do něj vstupují ze 7. a 8. krčního míšního nervu a z 1. a 2. hrudního míšního nervu, v menší míře ze 3. (Kawashima, 2005). V případě myšního modelu se jedná spíše o nervy ze střední oblast hrudní míchy (Obrázek 3A) (Jobling, 2012).



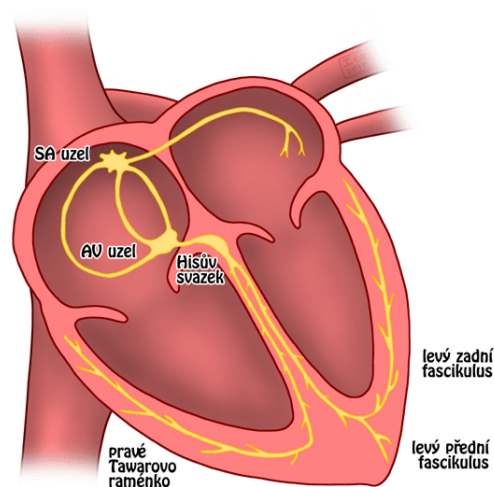
Obrázek 3. Inervace srdce Srdce je inervováno autonomním nervovým systémem. A) Naprostá většina postganglionických neuronů vychází z hrudních obratlů (T), hlavně hvězdicového ganglia, část ale i z ganglií krčních. B) Postganglionické neurony sympatiku se podílejí na inervaci sinoatriálního (SA) uzlu, v menší míře inervují i atrioventrikulární (AV) uzel. Parasympatická inervace je z velké části zajištěna skrze *nervus vagus*. Aferentní neurony přivádí informace z pravé i levé komory (PK a LK), stejně jako z pravé a levé síně (PS a LS). Impulsy mohou přicházet i z baroreceptorů, které se nachází na aortě. Upraveno podle (Coote and Chauhan, 2016; Végh et al., 2016).

2.3 Postganglionické neurony srdečního sympatiku

Postganglionické neurony, významně se podílející na inervaci srdce, která je znázorněna na Obrázku 3B, vystupují z hvězdicového ganglia jako *nervus cardiacus cervicalis inferior* do oblasti *plexus cardiacus*, což je nervová pleteň obsahující jak sympatické, tak parasympatické neurony. Do této oblasti vstupují i nervy z horního krčního ganglia (*ganglion cervicale superius*) a středního krčního ganglia (*ganglion cervicale medium*), v menší míře i z hrudních ganglií. Poté prochází skrze *plexus cardiacus* do sinoatriálního a atrioventrikulárního uzlu, myokardu a koronárních tepen. Vzniklé synapse zprostředkovávají kontrakce myokardu a dilataci koronárních tepen (Schünke et al., 2006).

2.4 Převodní systém srdeční

Převodní systém srdeční je specializovaná skupina kardiomyocytů, která je schopna vytvářet a vést nervový vzruch. Tento systém zajišťuje autonomii srdce a je inervován skrze ANS sympatikem i parasympatikem. Inervace autonomním systémem je nerovnoměrná – její hustota klesá od sinoatriálního uzlu směrem k apexu srdce. Inervace je proměnlivá i v čase – zatímco po narození dominuje sympatikus, v dospělosti se přidává zastoupení parasympatiku. Na potkaním modelu bylo dokázáno, že inervace oběma systémy ve stáří klesá (Chow et al., 2001). Sympatická zakončení inervují vrstvu zvanou subepikard. Jedná se o nejspodnější část epikardu, vývojově nejmladší srdeční vrstvy, která pokrývá myokard tvořený kardiomyocyty. Pod myokardem se nachází endokard tvořený buňkami endotelu, jejich vývoj je úzce propojen a začíná již v raném embryonálním stádiu (Kawano et al., 2003; Savolainen et al., 2009).



Obrázek 4. Převodní systém srdeční Autonomie srdce je zprostředkována specializovanými kardiomyocyty, které utvářejí převodní systém srdeční. Roli primárního pacemakeru zajišťuje SA uzel. Vzruch je poté přenášen k AV uzlu, z něj je potom veden směrem k apexu srdce pomocí Hisova svazku, který se dělí na Tawarova raménka. Z nich vychází Purkyňova vlákna zajišťující vedení vzruchu do komor. Upraveno podle (Icewalker, 2010).

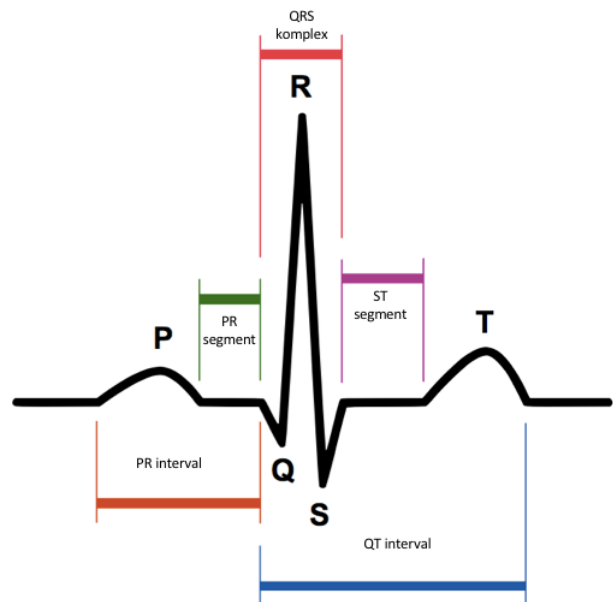
Sinoatriální uzel (SAN) je u člověka 1-2 cm velký svazek kardiomyocytů tvaru srpku, který se nachází v subepikardiální oblasti posteriorní části pravé komory (Obrázek 4). Udává rytmus stahům myokardu komor (tzv. primární pacemaker). Jsou to impulsy o frekvenci 60-70 stahů/min. Inervace SAN je z celého

převodního systému srdečního nejhustší (Schünke et al., 2006; Murphy and Lazzara, 2016). V případě myši leží SAN nad stykem pravé komory s horní dutou žílou spíše než přímo v komoře (Doevendans et al., 1998).

Atrioventrikulární uzel (AVN) leží v přepážce, která odděluje síně. Velikost AVN se u člověka pohybuje kolem 5 mm. Jeho hlavní úloha spočívá ve zpomalení vedení nervového impulsu do síní. Stejně jako SAN má schopnost generovat nervové impulsy, avšak s nižší frekvencí, neslouží tedy již jako primární pacemaker (Schünke et al., 2006).

Hisův svazek, jehož délka činí u člověka 2 cm, leží v subendokardiální oblasti v pravé síni, odkud vstupuje do přepážky, která odděluje komory. Zde se rozděluje na pravé a levé *Tawarovo raménko*. Levé Tawarovo raménko se z Hisova svazku odpojuje směrem vlevo, kde se dále rozděluje na tři hlavní svazky. Pravé Tawarovo raménko pokračuje skrze srdeční přepážku až k apexu srdce. V tomto místě se rozptyluje podél stěny komor za vzniku *Purkyňových vláken*, která se stáčí a míří zpět k síním (Schünke et al., 2006). V případě myši jsou tyto struktury anatomicky méně jasně definované (Laflamme et al., 2012).

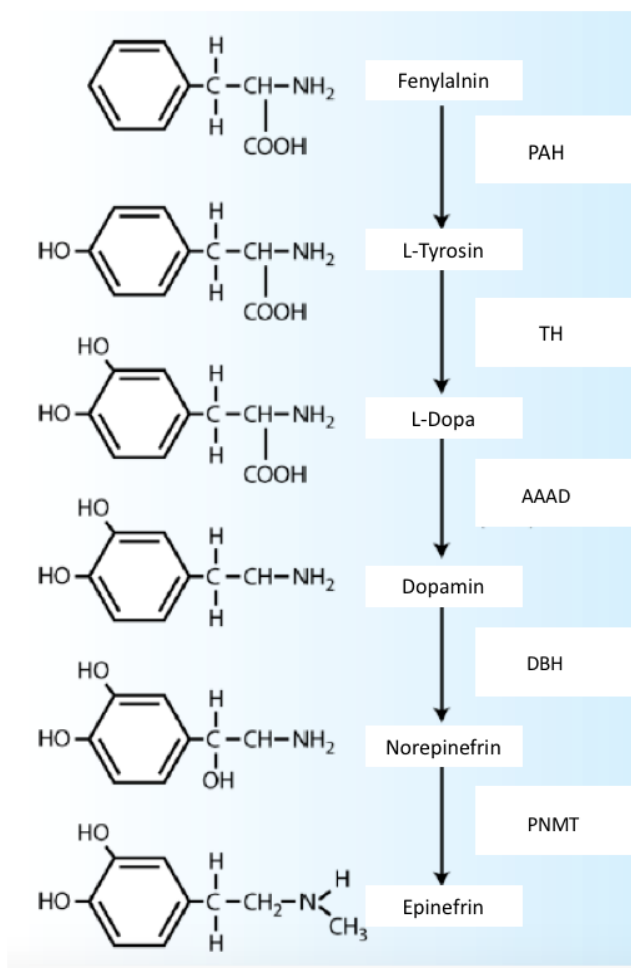
Převodní systém srdeční je zodpovědný za vedení nervového vzruchu srdcem a jeho depolarizaci, tedy i jeho stah. Tento proces se nazývá srdeční revoluce. Vedení začíná v primárním „pacemakeru“, tedy v SAN, a šíří se do pravé i levé síně. Tehdy jsou síně v relaxovaném stavu – diastole. Kompletní depolarizace síní vyvolaná elektrickým vzruchem, je na elektrokardiogramu (EKG) znázorněna jako P vlna (Obrázek 5). Vlna postupuje přes AVN, kde je vedení zpomalené a dává tak čas síním k mechanickému stahu – systole. Na EKG je toto znázorněno jako PR interval. Poté dochází k depolarizaci septa a vlna prochází Hisovým svazkem a Purkyňovými vlákny. Tím dochází k depolarizaci komor, která je velmi rychlá a na EKG odpovídá QRS segmentu, následně dochází k jejich systole. Na konci jednoho cyklu jsou síně i komory v diastole a dochází k repolarizaci celého srdce. Vzniknou-li anomálie v srdeční revoluci, může dojít k rozvoji arytmií a poruch srdečního rytmu (Kaye et al., 2010).



Obrázek 5. Srdeční revoluce na EKG Srdeční revoluci lze zobrazit na elektrokardiogramu. P vlna odpovídá depolarizaci síní, PR segment odpovídá jejich systole. QRS komplex představuje depolarizaci komor, po které následuje jejich systola a v závěru diastola. Diastola síní je překryta QRS komplexem (Atkielski, 2009).

3 Katecholaminy – jejich syntéza a role ve vývoji sympatiku

Katecholaminy (např. epinefrin či norepinefrin) jsou biomolekuly, které jsou syntetizovány především ve dřeni nadledvin a v menší míře i v nervových zakončeních (Obrázek 6). V postganglionických neuronech sympatiku fungují jako hlavní neurotransmitery, zatímco v preganglionických neuronech je hlavním neurotransmiterem acetylcholin (Snell, 2010). Sympatické neurony jsou rozděleny na subpopulace podle toho, který neurotransmitter majoritně syntetizují. V klasickém pojetí se sympatickým neuronům přisuzuje jako typický neurotransmitter norepinefrin, nové experimenty ale ukazují, že sympatické neurony lze dělit do sedmi podtypů podle toho, jaké biomolekuly (neurotransmitery, přenašeče) syntetizují. Pět z nich syntetizuje norepinefrin, zbylé dva syntetizují acetylcholin (Furlan et al., 2016). Když dojde k vylíčení norepinefrinu do synaptické šterbiny, je úlohou norepinefrinového přenašeče přečerpát ho zpět do presynaptického neuronu. Tím dojde k ukončení nervového přenosu. V srdci je toto hlavní způsob odbourávání norepinefrinu (Goldstein et al., 1988).



Obrázek 6. Syntéza katecholaminů Syntéza epinefrinu i norepinefrinu je regulována katecholamin syntetizujícími enzymy. Syntéza katecholaminů začíná konverzí fenylalaninu za účasti fenylalanin hydroxylázy (PAH) na L-tyrosin. Zásadní enzym tyrosin hydroxyláza (TH) přeměňuje L-tyrosin na L-dopamin. Působením dekarboxylázy aromatických L-aminokyselin (AAAD) dochází k syntéze dopaminu, jenž je pomocí dopamin β -hydroxylázy (DBH) konvertován na norepinefrin. Adici metylové skupiny zprostředkovává fenyletanolamin N-metyltransferáza (PNMT). Vzniká epinefrin. Upraveno podle (Végh et al., 2016).

3.1 Receptory katecholaminů

Katecholaminy jsou hlavní modulatory srdeční aktivity. Jejich účinek je zprostředkován především β_1 a β_2 adrenergními receptory, které patří do nadrodiny receptorů spřažených s G-proteiny. Tyto receptory jsou citlivé především na epinefrin, v menší míře i na norepinefrin. Pro vývoj adrenergních receptorů v srdci je důležitá vrstva epikardu, která exprimuje neuronální marker řetězový beta-3 tubulin („tubulin beta-3 chain“, TUBB3) v období od E10,5 (embryonální den 10,5) do E13,5 embryonálního vývoje myši. Je-li inhibován růst epikardu, dochází k narušení odpovědi na epinefrin. V období E11,5 je totiž v epikardu v oblasti atrioventrikulárního a interventrikulárního žlábků exprimován TUBB3 společně s β_2 adrenergními receptory. Zároveň až do období E12,5 nebyla detekována exprese β_1 adrenergních receptorů, což naznačuje, že β_2 receptory se vyvíjejí dříve (Kelder et al., 2015). β_1 adrenergní receptory jsou dominantní v dospělosti, během embryonálního vývoje však hrají nezastupitelnou roli v reakci na hypoxii – zvyšují srdeční tep (Chandra et al., 2006).

3.2 Katecholaminy syntetizující enzymy a jejich úloha v embryonálním vývoji

Funkce a syntéza katecholaminů je naprosto nezbytná pro srdeční vývoj, jak bylo ukázáno na myších modelech. Myší embrya s globální delecí v obou alelách pro tyrosin hydroxylázu (TH) nepřežívají z důvodů narušené syntézy L-dopaminu. 90 % $Th^{-/-}$ delečních mutantů umírá během embryonálního vývoje v rozmezí E11,5 až E15,5 (největší mortalita je v E13,5); pravděpodobně v důsledku selhání kardiovaskulárního systému. Norepinefrin je totiž do E15 jediným významným neurotransmiterem a během raného vývoje jsou jeho hlavním zdrojem právě sympatické neurony, chromafinní buňky nadledvin se totiž vyvíjí až později (Thomas et al., 1995). Obdobná situace nastává i při globální delecí genu pro dopamin beta-hydroxylázu (DBH). V tomto případě dochází k narušení syntézy norepinefrinu a hromadění dopaminu. Embrya jsou na norepinefrinu závislá ve věku od E9,5 do E13,5; u $Dbh^{-/-}$ delečních mutantů naprostá většina embryí umírá v tomto věku, více než polovina z nich však již v E11,5 (zda je jejich vývoj na katecholaminech závislý i později je nutné ověřit dalšími experimenty). Úloha norepinefrinu spočívá pravděpodobně v aktivaci adrenergních receptorů. Pokud je dráha syntézy katecholaminů funkční, v období E13,5 významně stoupá syntéza epinefrinu. Narušení jeho syntézy pomocí delecí genu pro fenyletanolamin N-metyltransferázu (PNMT) nemá žádný vliv na fenotyp ani letalitu embryí (Thomas et al., 1995; Zhou et al., 1995; Ebert et al., 2004). Z těchto dat lze vyvodit, že embryo je závislé na norepinefrinu, který je zřejmě schopen kompenzovat nedostatek epinefrinu. Vzhledem k histologickým změnám v srdci $Th^{-/-}$ a $Dbh^{-/-}$ delečních myších mutantů je možno usoudit, že za letalitou těchto embryí stojí srdeční selhání (Thomas et al., 1995; Zhou et al., 1995).

3.3 Syntéza katecholaminů v preinervačním období a srdci vlastní adrenergní buňky

Výše zmíněné pokusy ukazují, že v srdci dochází k produkci katecholaminů ještě před vývojem sympatických neuronů a chromafinních buněk ve dřeni nadledvin. PNMT začíná být exprimována v myším srdci již ve věku E8,5 (Ebert et al., 2008), ještě před tím než buňky neurální lišty, které dávají vzniknout srdečním sympatickým neuronům, domigrují k srdci v E9,5 (Serbedzija et al., 1990). Toto ukazuje na přítomnost buněk, které zřejmě nepatří do sympatoadrenální linie, ale jsou přesto schopny syntetizovat katecholaminy. Jedná se o srdci vlastní adrenergní buňky („intrinsic cardiac adrenergic cells“, ICA). Nejhojněji se vyskytují ve svalové vrstvě stěn komor a síní. ICA jsou zásadní pro vývoj a funkci převodního systému srdečního, jelikož zvýšená produkce katecholaminů těmito buňkami koreluje časem i umístěním s vývojem jednotlivých jeho složek (Ebert and Thompson, 2001). Rozmístění těchto buněk se však vůbec nepodobá distribuci buněk neurální lišty a vzhledem k tomu, že jejich přítomnost v srdci nekoreluje s výskytem buněk neurální lišty ani časově, není pravděpodobné, že by byly jejími buněčnými deriváty (Ebert et al., 2008).

4 Obecný vývoj srdečního sympatiku

V raných vývojových stádiích v tzv. preinervační fázi jsou kontrakce srdce a proudění krve zajištěny peristaltickými pohyby srdce. K prvním kontrakcím dochází v E8,0 u myši. Tento pohyb je nejdříve nesynchronizovaný, spontánní – pravá a levá polovina srdce se stahují v jiném tempu, poté přechází do pohybu peristaltického. V období E9,25 je tento pohyb nahrazen vysoce koordinovaným, jednosměrným pohybem. Je velmi pravděpodobné, že k této změně dochází v souvislosti s vývojem převodního systému srdečního (Nishii and Shibata, 2006). Poté začíná vývoj sympatické inervace srdce, který je detailně popsán v následujících kapitolách.

4.1 Neurální lišta a sympatoadrenální linie

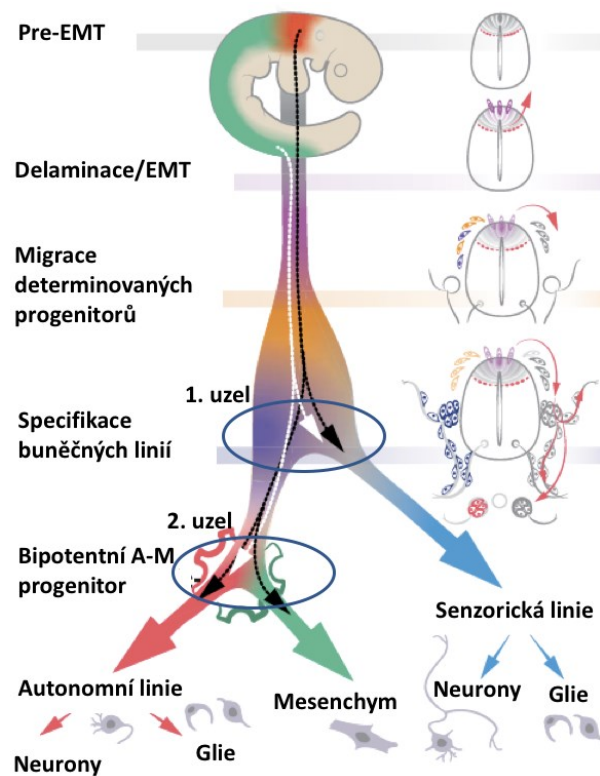
Neurální lišta je specializovaná oblast neuroektodermu, která se během uzavírání nervové trubice odštěpuje a tvoří unikátní multipotentní buněčnou populaci. Tyto buňky jsou schopné migrace a tvorby různých struktur (především neuronů, gliových buněk, melanocytů, chromafinních buněk a vybraných struktur srdce). Neurální lišta se dělí na část kaudální a část spjatou s oblastí trupu. Kaudální neurální lišta dává vzniknout mesenchymu hlavy, parasympatickým strukturám a mesenchymu srdce. Neurální lišta v oblasti trupu je zdrojem progenitorových buněk sympatoadrenálního systému, který se skládá z buněk sympatiku a chromafinních buněk nadledvin (Ishii et al., 2012; Baggiolini et al., 2015).

4.1.1 Migrace buněk budoucího sympatiku

Hlavní trasy migrace buněk neurální lišty v oblasti trupu jsou dvě – dorsolaterální a ventrální, jež je stěžejní pro formaci sympatických ganglií a dřeně nadledvin. Ventrální migrace, která vede skrze rostrální část somitu, je rozdělena do dvou vln. Během první vlny, která nastává před E9 a trvá do E9,5, dochází k oddělení populace buněk od neurální ploténky a ventrální migraci skrze rostrální sklerotom směrem k místu vzniku sympatických ganglií a dorsální aortě. V druhé vlně mezi E9,5 a E10,5 dochází k migraci populace buněk podél nervové trubice, z nichž vznikají dorsální ganglia. V rané části této vlny však migrují i buňky budoucího sympatiku. Určitá část buněk, jejichž dráha také kopíruje nervovou trubici, ukončuje migraci v pupenech končetin a vznikají z nich zřejmě Schwannovy buňky (Serbedzija et al., 1990; Schwarz et al., 2009).

4.1.2 Specifikace buněk sympatoadrenálního systému

Naprostá většina premigratorních i migrujících buněk neurální lišty je multipotentní (Baggiolini et al., 2015). Identita buněk neurální lišty je prvotně určena již během delaminace prostřednictvím vnější signalizace a vlastním stavem buňky. Během migrace buňky prochází řadou „uzlů“, v nichž dochází k rozdělení jejich osudu (Obrázek 7). V průběhu premigratorní fáze je koaktivováno více programů genové exprese časných genů. Ve chvíli, kdy buňka vstupuje do prvního uzlu, je žádaný program „up-regulován“, naopak druhý program je potlačen. V pozdějších fázích specifikace však ke koaktivaci nedochází. Buňka je již predeterminována k jednomu z buněčných osudů, je tedy aktivován pouze žádaný program genové exprese. To je funkce právě transkripčních faktorů, které regulují vznik sympatoadrenální linie a vedou k její plné diferenciaci.



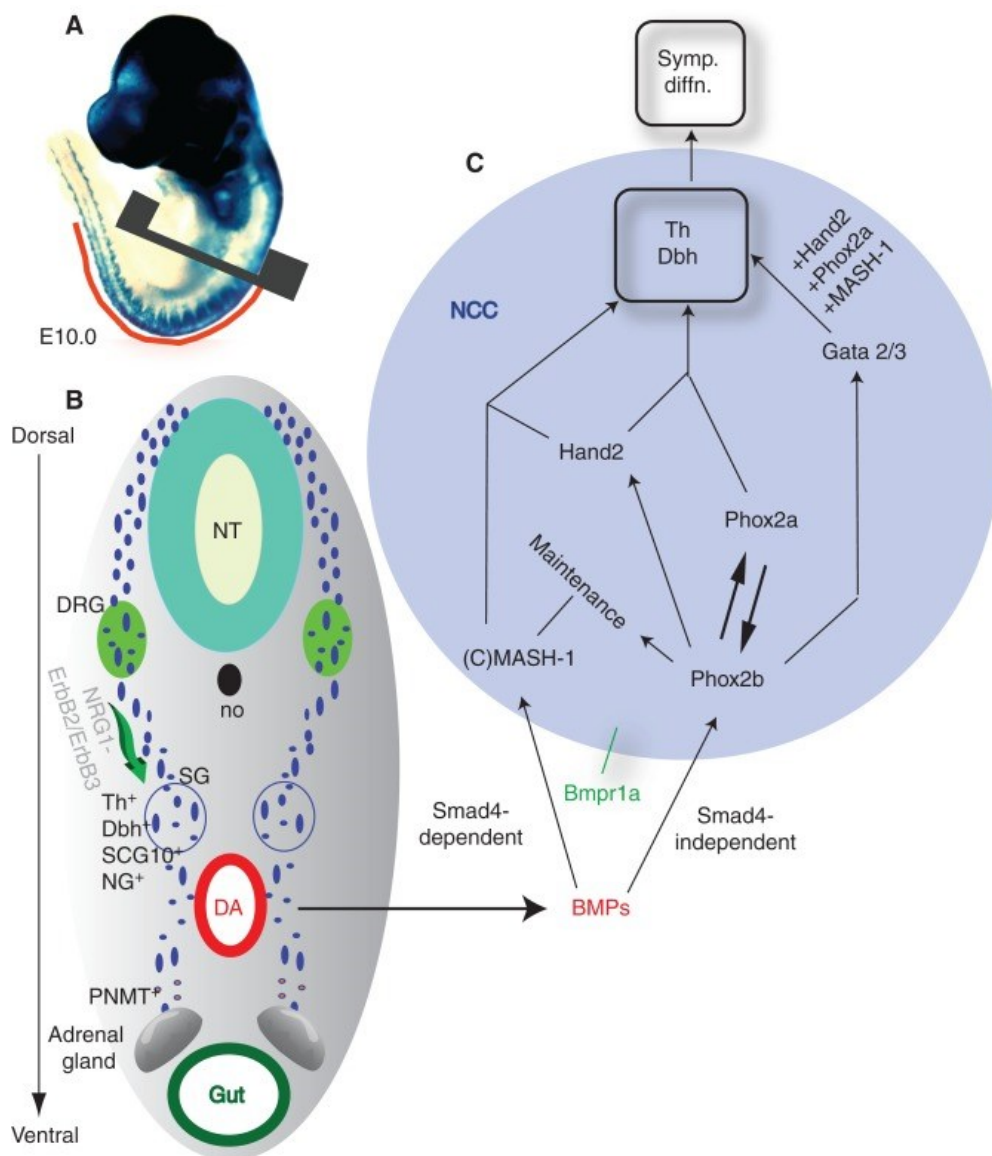
Obrázek 7. Specifikace NCC Buňky neurální lišty nejprve projdou epiteliálně-mesenchymální tranzicí (EMT). Následuje delaminace, během které je determinována příslušnost ke konkrétní buněčné linii. Prvním, pro sympatikus zásadním, uzlem, je oddělení bipotentní autonomně-mesenchymální linie od linie senzorické. V dalším kroku se odštěpuje větev autonomní od větve mesenchymální. Upraveno podle (Soldatov et al., 2019).

Buňky neurální lišty jsou ke svému osudu determinovány podle své rostro-kaudální polohy (Obrázek 7). Zatímco buňky situované kaudálně mají ekto-mesenchymální potenciál, buňky v oblasti trupu dávají vzniknout neuronální linii. V prvním uzlu dochází k oddělení sensorické linie od společného progenitoru pro autonomní a mesenchymální linii. V druhém uzlu dochází k oddělení mesenchymální linie od autonomní (Soldatov et al., 2019). Autonomní linie prochází další specifikací směřující k oddělení sympatoadrenální a parasympatické buněčné linie.

5 Molekulární podstata diferenciacce sympatických neuronů a role transkripčních faktorů

Vývoj srdečního sympatického nervového systému je řízen regulačními drahami, které jsou nejčastěji zkoumány na myším a kuřecím modelu. Pro přehlednost a nejspolehlivější extrapolaci na lidský vývoj jsou v této práci uváděny především výsledky z výzkumů na myších modelech, v případě nedostatku dat i na buněčných kulturách.

Srdeční sympatikus vzniká z buněk neurální lišty, které za účasti trofických faktorů migrují směrem k dorsální aortě, kde se shlukují a je zahájena jejich diferenciacce pomocí signální dráhy kostního morfogenetického proteinu („bone morphogenic protein“, BMP). Tyto buňky jsou před dosažením aorty predeterminovány jako buňky zárodečné linie, část těchto buněk tedy prochází odlišnou diferenciací a vznikají z nich chromafinní buňky nadledvin. Expresce genů potřebných pro propagaci sympatického fenotypu je regulována transkripčními faktory, mezi které patří transkripční faktory s párovou homeoboxovou doménou 2a a 2b („paired-like homeobox 2a and 2b“, PHOX2A, PHOX2B), homolog komplexu „achaete-scute“ u drozofily („achaete-scute homolog 1“, ASCL1, také používán název MASH1 čili mammalian achaete-scute homolog 1), GATA vazebný faktor 3 („GATA-binding factor 3“, GATA3). Vznikají tak sympatická primární ganglia, která poté migrují do jejich cílové oblasti, a pomocí chemorepelenů a chemoatraktantů prodlužují své axony směrem k srdci, které inervují (shrnuto v (Végh et al., 2016)).



Obrázek 8. Role trofických a transkripčních faktorů ve vývoji sympatického nervového systému
 A) migrace buněk sympatiku probíhá v transverzální rovině embrya. B) Sympatikus vzniká z buněk neurální lišty, které za účasti trofických faktorů migrují do místa určení. V případě prekursorů sympatických ganglií dochází k migraci ventrálním směrem (cca od E9) k dorsální aortě (DA) pomocí neuropilin-1/SEMA3 signalizace a následně neuregulin/ErbB signalizace. C) U dorsální aorty dochází k navázání BMP na BMPR1A (ALK3) receptor a spuštění kaskády závislé či nezávislé na SMAD4, které aktivují ASCL1, respektive PHOX2B. PHOX2B je zásadní molekulou ve vývoji sympatiku, která přímo reguluje PHOX2A, GATA3 (GATA2 u kuřat) a HAND2 a hraje roli v udržení exprese ASCL1. Kombinace aktivit těchto faktorů vede k aktivaci TH a DBH, enzymů stěžejních pro ustanovení noradrenergního fenotypu a syntézu norepinefrinu. Upraveno podle (Bhatt et al., 2013). NT = nervová trubice, no = notochord, DRG = dorsální ganglia, SG = sympatická ganglia, DA = dorsální aorta

5.1 Role trofických faktorů v migraci buněk neurální lišty

Navádění buněk neurální lišty do finálního místa určení je velmi komplikovaný proces, v němž hrají ústřední roli trofické faktory, které působí na buňky buď jako atraktanty, nebo jako repelenty. Migrace je založena na expresi konkrétního receptoru danou buněčnou linií neurální lišty, jehož ligandem je právě daný trofický faktor. V této kapitole jsou prezentovány principy migrace především na myším modelu (Obrázek 8), pokud není uvedeno jinak.

Migrace buněk zárodečné lišty z hrudní oblasti, které dávají vzniknout sympatiku, probíhá ve dvou vlnách – časné a střední. Buňky v časné vlně migrují podél intersomitického a perisomitického krevního řečiště k dorsální aortě, takto putuje však pouze malé množství buněk. Tyto buňky exprimují p75 neurotrofinový receptor. Zásadnější je prostřední vlna, ve které migruje většina buněk budoucího sympatiku spolu s budoucími senzoryckými neurony. Dochází k odklonu od trasy buněk první vlny a buňky prochází skrze anteriorní sklerotom. V této vlně je migrace buněk správnou trasou založena na neuropilin-1/semaforin 3 (NRP1/SEMA3A) signalizaci. Migrující buňky budoucího sympatiku exprimují receptor NRP1 a SEMA3, které mají odpuzující účinky a jsou komplementárně exprimovány posteriorním sklerotomem a dermomyotomem. Jak bylo dokázáno u *Sema3A^{-/-}* a *Nrp1^{-/-}* embryí s podmíněnou delecí v buňkách zárodečné lišty pod kontrolou *Wnt* (zkratka vzniklá z anglického „Wingless/Int1“) promotoru, dojde-li k narušení NRP1/SEMA3A signalizace, jsou buňky neurální lišty ektopicky umístěny, tudíž dochází k chybnému uspořádání sympatických ganglií jak v anterioposteriorní, tak v dorsoventrální ose. NRP1 zajišťuje migraci prekurzorů sympatiku, je však společně s NRP2 exprimován i prekurzory senzoryckých neuronů. To naznačuje, že neuropiliny hrají roli ve specifikaci obou těchto linií (Schwarz et al., 2009; Lumb et al., 2014).

Na pozdější fázi migrace se podílí signalizace neuregulinu a receptoru epidermálního růstového faktoru („epithelial growth like factor“, ERBB), v níž figurují tyrosin kinázové receptory ERBB3 a ERBB2 a jejich ligand neuregulin-1. Jedná se o chemoatraktanty a funkce této signalizace spočívá v udržení mobility migrujících buněk neurální lišty a jejich orientaci směrem k dorsální aortě. Úzká oblast mesenchymu obklopujícího dorsální aortu produkuje neuregulin-1 v E9, naopak buňky determinované k sympatoadrenálnímu osudu produkují receptory ERBB2 a ERBB3, což umožňuje cílenou migraci těchto buněk. V případě delece těchto receptorů či ligandů dochází kvůli snížené pohyblivosti ke kumulaci buněk na dorsální straně embrya poblíž dorsálních ganglií. Buňky budoucího sympatiku jsou zadrženy v ektopickém umístění a dochází k redukci velikosti sympatických ganglií (Britsch et al., 1998).

5.2 Kostní morfogenetický protein („bone morphogenetic protein“, BMP)

V diferenciaci sympatických neuronů hrají zásadní roli růstové faktory z nadrodiny TGF- β (transformující růstový faktor beta) proteinů – BMP. Jedná se o proteiny, které mají úlohu v regulaci proliferace, diferenciace a apoptózy během ontogenetického vývoje. Jejich receptorem je receptorová serin/threonin kináza. Signalizace je zprostředkována členem rodiny SMAD proteinů 4 (akronym pro název genu SMA u hád'átka a MAD u drozofily), který je translokován do jádra, kde působí jako transkripční faktor (Ross and Hill, 2008).

U myšího modelu bylo prokázáno, že vývoj sympatoadrenální linie je závislý na BMP-2 a BMP-4, které jsou produkovány dorsální aortou. Kanonická signální transdukce probíhá přes heteromerní komplex BMP receptorů I. a II. typu. V *in vitro* tkáňových kulturách bylo ukázáno, že v případě vývoje sympatiku je stěžejní receptor I. typu – aktivinovému receptoru podobná kináza 3 („activin-like kinase 3“, ALK3). Po navázání ligandu (tedy BMP-2, BMP-4) receptor II. typu fosforyluje receptor I. typu ALK3. Ten zajišťuje přenos signálu pomocí fosforylace SMAD proteinů (R-SMAD), které formují homomerní komplexy mezi sebou a heteromerní komplexy se SMAD4 („common mediator“). Tento heteromerní komplex je poté translokován do jádra, kde funguje jako regulátor transkripce. Signalizace nemusí probíhat pouze kanonickou cestou přes SMAD4, existují i dráhy nekanonické (Shah et al., 1996; Ross and Hill, 2008; Morikawa et al., 2009).

BMP signalizace má hned několik zásadních funkcí ve vývoji sympatiku. Jednou z nich je formace sympatických ganglií. Bylo dokázáno, že u myší s podmíněnou delecí *Alk3* v buňkách neurální lišty pod kontrolou *Wnt* promotoru sice dochází k migraci buněk neurální lišty k dorsální aortě v E9,5; tedy stejně jako u „wild type“ (tj. nemutantních) myších embryí, nedochází však k jejich agregaci v E10. Ve věku E10,5 se v oblasti, kde u „wild type“ embryí dochází ke vzniku sympatických ganglií, u *Alk3* mutantů nenachází žádné buňky. To dokazuje, že BMP signalizace hraje významnou roli v přežívání sympatických prekurzorů. K úbytku těchto buněk dochází v důsledku apoptické smrti. V přežívání sympatických prekurzorů má důležitou roli také transkripční faktor PHOX2B, který je regulován právě BMP signalizací. V předchozích mechanismech se také uplatňuje nekanonická BMP signalizace bez účasti SMAD4 (Morikawa et al., 2009). Dodnes nebyl popsán mechanismus nekanonické signální dráhy zodpovědné za formaci sympatických ganglií.

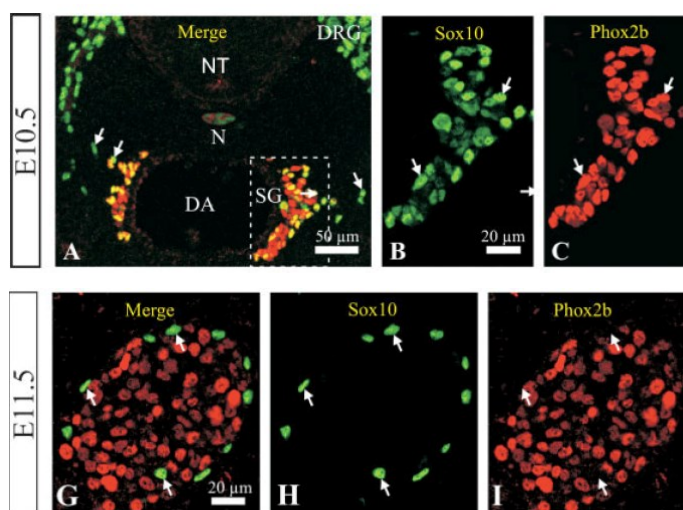
V proliferaci sympatických prekurzorů se však uplatňuje právě kanonická BMP signalizace za účasti SMAD4. V případě inaktivace genu pro *Smad4* v buňkách neurální lišty dochází ke snížené proliferaci na všech úrovních vývoje. Kanonická BMP signalizace reguluje i noradrenergní diferenciaci buněk neurální

lišty. Buňky embryí s podmíněnou delecí genu pro *Smad4* v buňkách zárodečné lišty pod kontrolou *Wnt*promotoru vykazovaly o 50 % nižší produkci TH než buňky „wild type“ embryí. Kanonická BMP dráha má tedy vliv na produkci embryonálního norepinefrinu. Na regulaci noradrenergní diferenciace se podílejí i transkripční faktory GATA3, a protein exprimovaný srdcem a deriváty neurální lišty 2 („heart and neural-crest expressed derivatives protein 2“, HAND2), PHOX2A, PHOX2B, jež jsou ale regulovány nekanonickou BMP signalizací (Morikawa et al., 2009).

Kanonická BMP dráha se podílí i na regulaci exprese transkripčního faktoru ASCL1, který urychluje vývoj sympatických ganglií. V období E10,5 je *Ascl1* exprimován jak u kontrolních embryí, tak i u embryí s podmíněně deletovaným genem pro *Smad4*. Od věku E11,5 však dochází k významnému poklesu produkce *Ascl1* u *Smad4*^{-/-} delečních mutantů. Fenotyp je velmi podobný jako v případě *Ascl1*^{-/-} delečních mutantů, kdy dochází ke zmenšení velikosti sympatických ganglií (Pattyn et al., 2006; Morikawa et al., 2009).

5.3 HMG-box příbuzný s pohlaví určující oblastí 10 („SRY-related HMG-box 10“, SOX10)

Před migrací k dorsální aortě se buňky budoucího sympatiku udržují v multipotentním stavu a probíhá u nich buněčný cyklus. Za udržení buněk v buněčném cyklu je zodpovědný transkripční faktor SOX10, jehož koncentrace postupně klesá (cca od E9,5) se vzrůstající koncentrací neurálních „markerů“ (Kim et al., 2003). V E10,5 buňky v hvězdicovém gangliu, které je stěžejní pro inervaci srdce, s postupující diferenciací z buněčného cyklu vystupují a exprese *Sox10* významně klesá. O den později však buňky znovu zahajují proliferaci. Toto je u neuronů velice neobvyklé, vyskytuje se to pouze u sympatických neuronů, které tedy proliferují nejen jako prekursori, ale i jako částečně diferencované neurony (Gonsalvez et al., 2013). Způsob, jakým je exprese transkripčního faktoru SOX10 regulována není



Obrázek 9. Koexprese *Sox10* a *Phox2b* Migrující buňky exprimují *Sox10*, který zajišťuje jejich udržení v multipotentním stavu. V raném vývoji je *Sox10* koexprimován spolu s *Phox2b*, postupně se však jeho exprese ztrácí (Callahan et al). NT = nervová trubice, DA= dorsální aorta, N = notochord, DRG = dorsální ganglia

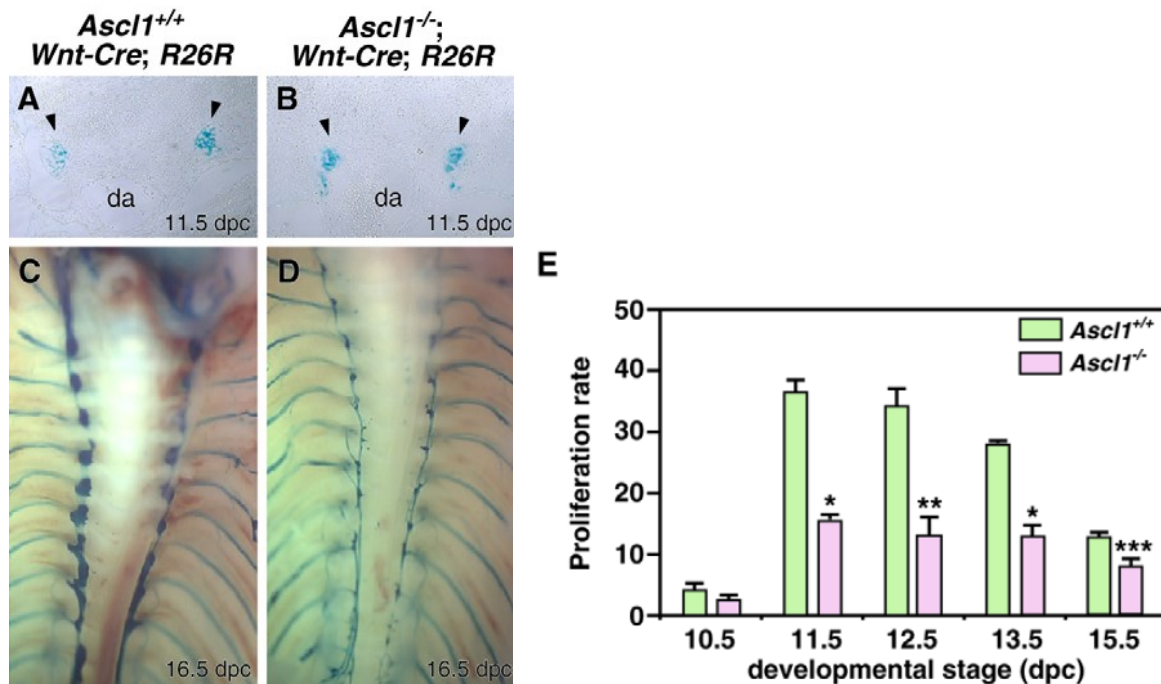
dosud plně objasněn. Zhruba do věku E10,5 je *Sox10* exprimován spolu s *Phox2b* a *Ascl1* (Obrázek 9), pak jeho hladina u naprosté většiny vyvíjejících se neuronů významně klesá. Je tedy vhodné uvážit jeho regulaci právě těmito transkripčními faktory. *In vitro* pokusy nicméně ukazují, že ačkoliv by za touto regulací stát mohly, nebudou její hlavní komponentou (Kim et al., 2003; Callahan et al., 2008; Gonsalvez et al., 2013). Vzhledem k ojedinělosti tohoto fenoménu, kdy jsou neurony schopny vstoupit znovu do buněčného cyklu, je důležité získat znalosti o roli SOX10 v diferenciaci sympatických neuronů, jeho „downregulaci“ (snížené expresi) a vztahu k PHOX2B a ASCL1.

5.4 Homolog komplexu „achaete-scute“ u drozofily 1 („achaete-scute homolog 1“, ASCL1)

ASCL1 je transkripční faktor, který patří do rodiny bazických proteinů se strukturou šroubovice-smyčka-šroubovice a reguluje neurální vývoj. Tento protein je aktivován BMP2 v oblasti dorsální aorty prostřednictvím kanonické BMP signální transdukce (Shah et al., 1996; Morikawa et al., 2009). *In vitro* experimenty poukázaly na nezbytnou úlohu ASCL1 v diferenciaci sympatických neuronů i v expresi pan-neurálních markerů (Sommer et al., 1995), v *in vivo* experimentech toto však bylo vyvráceno. ASCL1 má funkci v růstu sympatických ganglií a jeho ztráta vede k jejich hypoplázii v důsledku snížené proliferace, což ukazuje Obrázek 10, není ale nezbytný pro neurální ani noradrenergní diferenciaci (Morikawa et al., 2009).

Exprese *Ascl1* je omezena pouze na prekursory nervového systému. *Ascl1* začíná být v myších embryích transkribován již ve věku E8,5 v míše, pro vývoj sympatiku je ale významný věk E9,5; kdy je RNA tohoto genu detekovatelná v oblasti dorsální aorty, kde později vznikají sympatická ganglia (Guillemot and Joyner, 1993). Exprese v sympatiku je ukončena v E13,5 (Tsarovina et al., 2010). V E10 dochází k agregaci buněk neurální lišty v oblasti dorsální aorty u kontrolních i *Ascl1*^{-/-} embryí s podmíněnou delecí v buňkách zárodečné lišty pod *Wnt* promotorem. Problémy s migrací při ztrátě genu tedy nenastávají. Ve stádiu E10,5 se utváří kompaktní útvary, z nichž vznikají sympatická ganglia (Morikawa et al., 2009). V případě mutantů však vzniká více disperzní útvar (Pattyn et al., 2006). Do E11,5 jsou velikost i tvar ganglií stejné u kontrol i *Ascl1*^{-/-} delečních mutantů. Během pozdějšího vývoje je ale růst zbrzděn a v E16,5 je patrná značně redukovaná velikost ganglií u delečních mutantů oproti kontrolám. Bylo ukázáno, že tento rozdíl vzniká v důsledku snížení proliferace (nikoliv v důsledku apoptózy), ke kterému dochází právě v E11,5; což dokazuje, že ASCL1 je stěžejní pro proliferaci sympatických neuronů, nikoliv pro jejich viabilitu (Morikawa et al., 2009). Diferenciace sympatických neuronů není narušena, ale je oddálena oproti kontrolám. Zatímco u kontrolních embryí v E10,5 lze detekovat neurální „markery“ specifické pro sympatikus (*Phox2a*, *dHAND*, *Gata3*, *Dbh*) i markery pan-neurální (TUBB3, „superior cervical ganglion

10⁴), u *Ascl1*^{-/-} globálně delečních mutantů je plný sympatoadrenální fenotyp patrný až v E12,5. Opožděný vznik sympatického fenotypu naznačuje přítomnost jiného faktoru ze stejné rodiny, k jehož expresi dochází později ve vývoji a je schopen absenci exprese *Ascl1* částečně kompenzovat. ASCL1 stojí společně s PHOX2B „upstream“ vůči PHOX2A (Pattyn et al., 2006).



Obrázek 10. Hypoplázičká sympatická ganglia ASL1 je transkripční faktor mající úlohu v proliferaci a růstu sympatických ganglií. Ve věku E11,5 jsou velikosti sympatických ganglií kontrol (A) a delečních *Ascl1* mutantů (B) srovnatelné. V E16,5 (D) jsou ganglia atrofovaná v porovnání s ganglii kontrol (C). K atrofii dochází v důsledku snížení úrovně proliferace (E) (Morikawa et al., 2009). da = dorsální aorta, dpc = days post coitum

5.5 Transkripční faktory s párovou homeoboxovou doménou 2a/b („paired-like homeobox 2a/b“, PHOX2A/B)

PHOX2 transkripční faktory jsou klíčové pro vývoj a specifikaci noradrenergního fenotypu sympatických neuronů a v této souvislosti byla jejich funkce popsána jako první. Jsou exprimovány výhradně v nervových buňkách. V oblasti sympatických primordií je jejich exprese detekována v E10,5 (Tiveron et al., 1996). Prvotní detekce ve spojitosti s budoucím sympatikem je však patrná už v E9,5 ventrálním směrem vůči dorsální aortě (Pattyn et al., 1997). Fungují jako transkripční faktory, které se váží na promotor *Dbh* a na promotor genu pro adhezní molekulu neurálních buněk (Valarché et al., 1993; Yang et al., 1998). Podílí se na vývoji celého autonomního systému a částečně i na vývoji centrální nervové soustavy. Jedná se o transkripční faktory s homeodoménou. PHOX2B je zásadní pro udržení exprese *Ascl1* a indukci exprese

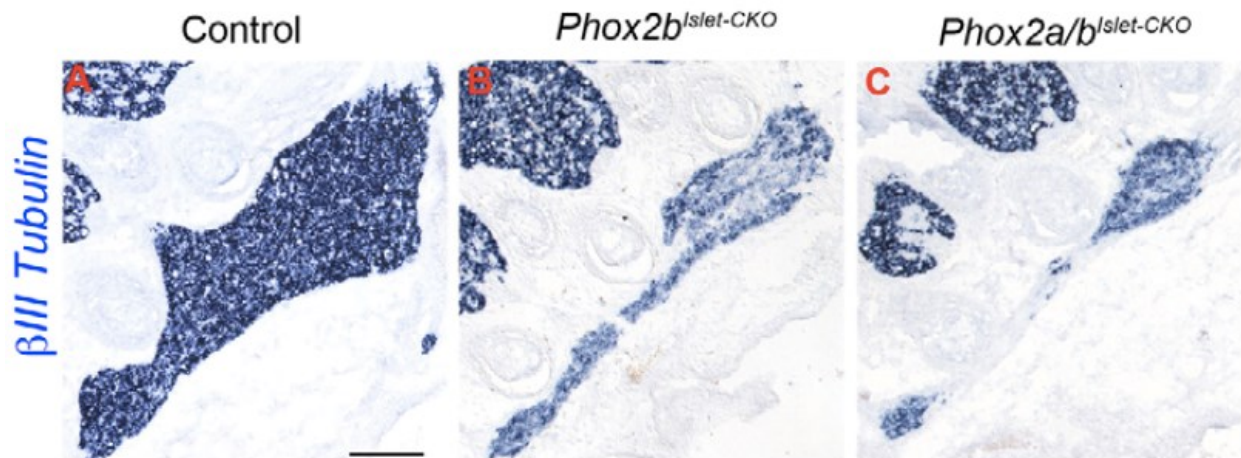
genů pro enzymy účastníci se syntézy katecholaminů (konkrétně DBH a TH) a genu pro podjednotku neurotrofického faktoru gliových buněk, což je receptorová kináza. Experimenty poukazují na naprosto klíčovou roli PHOX2B v ustanovení noradrenergního fenotypu. U *Phox2b*^{-/-} mutantů s globální delecí nedochází k expresi TH a DBH v sympatických neuronech, ani v hlavním noradrenergním centru centrální nervové soustavy *locus coeruleus* (Pattyn et al., 2000). *Phox2b*^{-/-} mutanti s globální delecí umírají během embryonálního vývoje (nedožívají se E18,5) v důsledku porušené syntézy norepinefrinu. Přidáním agonistů norepinefrinu do vody, kterou pijí jejich matky (toto je běžná praxe pro prokázání letality v důsledku narušení syntézy norepinefrinu), je možné tyto mutanty zachránit (Pattyn et al., 2000). *In vitro* bylo ukázáno, že zatímco syntéza TH je aktivována skrze další transkripční faktory, které jsou regulovány pomocí PHOX2B, syntéza DBH může být aktivována přímo pomocí vazby PHOX2B do promotorové oblasti *Dbh* (Yang et al., 1998; Adachi et al., 2000). *In vitro* byl také prokázán vliv PHOX2B na expresi norepinefrinového transporteru, ačkoliv způsob působení není znám (Fan et al., 2009). PHOX2B stojí „upstream“ vůči transkripčním faktorům PHOX2A, GATA3 a HAND2, které regulují specifikaci sympatiku (Pattyn et al., 1999; Pattyn et al., 2000; Tsarovina et al., 2004; Morikawa et al., 2009). Exprese *Ascl1* je u mutantních embryí zahájena normálně, ale již brzy během vývoje je významně „downregulována“ (Pattyn et al., 1999).

Phox2a je gen, který je zřejmě regulován ASCL1 a PHOX2B. Výzkumy ukazují, že exprese *Phox2a* je pravděpodobně aktivována přímo vazbou PHOX2B do jeho promotorové oblasti, pro ASCL1 však přímá interakce prokázána zatím nebyla. Důvodem mohou být *in vitro* podmínky, ve kterých chybí určitý kofaktor (Hong et al., 2001). Transkripční faktor PHOX2A je strukturně velmi podobný transkripčnímu faktoru PHOX2B. Jedná se o paralogické geny. Jejich homeodoména, která zprostředkovává vazbu DNA je zcela identická, u N-terminální domény byla prokázána 57% podobnost. Tato doména je důležitá pro transaktivaci genu *Dbh* transkripčním faktorem PHOX2A, podobnou roli tedy nejspíš hraje i u aktivace pomocí transkripčního faktoru PHOX2B. Zásadní odlišnosti byly nalezeny u C-koncové domény (Pattyn et al., 1997; Adachi et al., 2000). *Phox2a* exprese je u *Ascl*^{-/-} globálně delečních embryí opožděna – normálně je gen exprimován v E10,5, zatímco u těchto delečních mutantů je jeho exprese detekována až v E11,5; a to pouze velmi slabě. To naznačuje částečnou závislost indukce exprese tohoto genu na ASCL1 (Hirsch et al., 1998; Pattyn et al., 2006). Ztráta funkčnosti genu *Phox2a* nevede k narušení syntézy katecholaminů, nicméně v *in vitro* kulturách lidských buněk byla ukázáno, že PHOX2A je schopen se vázat do oblasti DNA, která váže homeodoménu („HD-binding site“) a indukovat expresi *Dbh* v DBH^{-/-} buňkách a tím částečně kompenzovat PHOX2B. Tato oblast se nachází v promotoru *Dbh* a jedná se o cis element stěžejní pro noradrenergní diferenciaci (Yang et al., 1998). U *Phox2a*^{-/-} globálně delečních mutantů dochází pouze k drobným morfologickým změnám vybraných sympatických ganglií, které jsou způsobeny nedostatečnou

migraci rostrálním směrem. Tento transkripční faktor tedy není esenciální pro propagaci noradrenergního fenotypu, pokusy ale ukazují, že je zcela nezbytný pro vývoj noradrenergního centra mozku *locus coeruleus*. Homozygotní mutanti umírají při porodu (Morin et al., 1997).

Oba transkripční faktory nejsou potřebné pouze v raných vývojových stádiích pro zahájení specifikace, ale na myším modelu bylo ukázáno, že jsou důležité i později pro udržení noradrenergního fenotypu. Jsou-li předčasně umlčeny, dochází k „downregulaci“ mnoha genů, včetně genů kódujících transkripční faktory hrající úlohu ve vývoji sympatiku, které leží „downstream“ vůči *Phox2*, a to *Gata3* a *Hand2*. Snížená exprese byla i „markerů“ noradrenergního fenotypu, exprese *Th* a *Dbh* byla téměř nedetekovatelná. Zajímavé je, že při umlčení genu *Phox2b* v E10,5 je exprese *Phox2a* v E13,5 na normální úrovni, což ukazuje, že v pozdějších vývojových stádiích může být *Phox2a* exprimován nezávisle na PHOX2B (Coppola et al., 2010).

PHOX2A je schopen alespoň částečně kompenzovat PHOX2B (Obrázek 11), jehož gen je podmíněně deletován v buňkách sympatiku (pod kontrolou *Isl1*). V obou případech dochází k atrofii hvězdicového ganglia, ale pokud je exprimován *Phox2a* není atrofie natolik výrazná (Coppola et al., 2010). Vzhledem k tomu, že PHOX2A není schopen zajistit noradrenergní specifikaci, alespoň částečná zaměnitelnost PHOX2A a PHOX2B je tedy možná pouze v pozdějším vývoji (Coppola et al., 2005).



Obrázek 11. Atrofické hvězdicové ganglion Ganglion bylo detekováno pomocí *in situ* hybridizace s beta-3 tubulinem v E16,5. V případě *Phox2b^{Isl1-CKO}* dochází ke zmenšení plochy ganglií na 37 %, v případě *Phox2a/b^{Isl1-CKO}* na 25 %. PHOX2A je tedy částečně schopen kompenzovat ztrátu PHOX2B během pozdějšího vývoje (Coppola et al., 2010).

5.6 GATA vazebné faktor 3 („GATA binding factor 3“, GATA3)

GATA jsou transkripční faktory s vazebnou doménou v podobě zinkových prstů. GATA3 transaktivuje transkripci *Th* i *Dbh* a jsou důležité pro udržení noradrenergního fenotypu sympatických neuronů u myši. Stojí na konci BMP signální kaskády a je regulována transkripčním faktorem PHOX2B. Její úloha však zdaleka není limitována pouze na vývoj sympatiku, GATA3 byla detekována napříč celým nervovým systémem (Tsarovina et al., 2004). GATA3 má úlohu i ve vývoji imunitního systému, konkrétně v diferenciaci lymfoidních buněk (Zhong et al., 2020).

Pokusy na myších modelech ukazují, že GATA3 je zásadní pro expresi *Th* i *Dbh*. U mutantů s *Gata3* podmíněnou delecí v noradrenergních (pod kontrolou *Dbh*) buňkách dochází k narušení syntézy katecholaminů a poruchám ve vývoji srdce, což společně vede ke smrti embrya. Změny jsou detekovány i na ledvinách, které jsou hypoplázické, nicméně jejich postižení není důvodem embryonální letality. U těchto mutantů je také narušen vývoj ucha, příštítných tělísek, brzlíku a čelistí a je snížen počet chromafinních buněk nadledvin (Lim et al., 2000; Moriguchi et al., 2006). V E11,5 dochází k výraznému zmenšení sympatických ganglií v rostrální části embrya (která je důležitá pro inervaci srdce), v kaudální části jsou ganglia redukována méně. Významná redukce je tedy patrná u hvězdicového ganglia i horního krčního ganglia, tedy u obou ganglií zásadních pro sympatickou inervaci srdce. K redukci dochází v důsledku apoptózy a snížené proliferace (Tsarovina et al., 2004; Tsarovina et al., 2010).

U *Gata3*^{-/-} globálně delečních embryí je exprese *Th* téměř nedetekovatelná již na počátku specifikace v E10,5; exprese *Dbh* je výrazně snížena (Tsarovina et al., 2004). To znamená, že GATA3 tyto geny reguluje. V *in vitro* pokusech bylo ukázáno, že v případě *Th* regulace se jedná o protein-proteinové interakce GATA3 s cAMP responsivním elementem (CREB) (Hong et al., 2006), *in vivo* toto však potvrzeno nebylo. Při použití myšího modelu nedošlo u mutantů s podmíněnou delecí CREB v noradrenergních buňkách ke snížení exprese sympatických markerů ani ke zmenšení celkové plochy ganglií (podobně jako u globální delece), pouze k mírnému porušení migrace rostrálním směrem (Parlato et al., 2007; Rüdiger et al., 2009). Ačkoliv role CREB ve vývoji sympatiku je nesporná, úlohu CREB v regulaci za účasti GATA3 je třeba podrobit dalšímu zkoumání. GATA3 pomocí interakcí s dalšími transkripčními faktory reguluje i promotor *Dbh*, jak bylo ukázáno v *in vitro* experimentech, *in vivo* data zatím nejsou k dispozici (Hong et al., 2008a).

Z časového uspořádání exprese genů *Phox2b*, *Ascl1* a *Hand2* vyplývá, že *Gata3* je v regulaci „downstream“ od těchto transkripčních faktorů, jak bylo ukázáno na *Phox2b*^{-/-} mutantech (Tsarovina et al., 2004), pozdější experimenty předesílají, že je součástí zpětnovazebné smyčky a ovlivňuje „upstream“ ležící geny. V případě *Gata3*^{-/-} embryí s podmíněnou delecí v sympatoadrenální linii (pod kontrolou *Dbh*) dochází v E13,5

k dramatickému snížení exprese *Phox2b* ve většině neuronů hrudních sympatických ganglií, což naznačuje, že GATA3 je schopna regulovat expresi *Phox2b*. Další výzkumy ukázaly, že obdobně klesá hladina dalších transkripčních faktorů – ASCL1 a HAND2. Je tedy otázka, zda ke snížení exprese dochází kvůli zpětnému ovlivnění „upstream“ stojících faktorů, či kvůli snížení počtu neuronů v nepřítomnosti GATA3. GATA3 není nutná pro prvotní fáze diferenciaci, nicméně je důležitá pro udržení exprese noradrenergických markerů v embryonálním vývoji a k přežívání sympatických neuronů od raného embryonálního vývoje až do dospělosti (Moriguchi et al., 2006; Tsarovina et al., 2010).

5.7 Protein exprimovaný srdcem a deriváty neurální lišty 2 („heart and neural crest derivatives-expressed protein 2“, HAND2)

HAND2 patří do rodiny bazických proteinů se strukturou šroubovice-smyčka-šroubovice a je nezbytný k neurogenezi a udržení noradrenergického fenotypu sympatických neuronů. Jeho role ve vývoji je však mnohem širší. Zásadně se podílí na vývoji různých komponent srdce, např. kardiomyocytů a odtokového traktu. Má zásadní vliv na udržení syntézy norepinefrinu chromafinními buňkami v pozdějších vývojových stádiích (Morikawa and Cserjesi, 2008). Jeho exprese začíná v E10 krátce po zahájení exprese *Phox2b*. Kromě časového uspořádání poukazují i pokusy s *Phox2b*^{-/-} globálními mutanty na „downstream“ pozici *Hand2* vůči *Phox2b*, jelikož u těchto mutantů je syntéza HAND2 zcela přerušena. *In vitro* pokusy poukazují i na možnost zpětné regulace exprese *Phox2b*. *Hand2* je zřejmě „upstream“ vůči genům *Phox2a* a *Gata3*, ačkoliv starší výzkumy toto nepotvrdily (Liu et al., 2005; Morikawa et al., 2005; Hendershot et al., 2008). *In vivo* pokusy ukazují, že exprese *Hand2* není závislá na ASCL1 a neplatí ani opačný vztah, ačkoliv *in vitro* pokusy předesílají schopnost HAND2 aktivovat expresi *Ascl1* pomocí histon acetyltransferázy a indukovat tak program vedoucí ke vzniku autonomních neuronů (Morikawa et al., 2005; Hendershot et al., 2008; Hashimoto et al., 2011). *In vitro* experimenty ukázaly potřebu koexprese *Hand2* s *Phox2a* pro aktivaci exprese *Dbh* (Xu et al., 2003; Liu et al., 2005). Je nutné, aby výsledky *in vitro* studií byly potvrzeny i *in vivo*, protože tato data staví HAND2 do unikátní centrální pozice v regulaci vývoje sympatického nervového systému, a tedy i jeho patologií.

HAND2 se podílí na neurogenezi i na udržení noradrenergického fenotypu. U mutantů s podmíněnou delecí *Hand2* v derivátech buněk zárodečné lišty dochází k redukci počtu proliferujících prekurzorových Sox10⁺ buněk, ze kterých vznikají sympatická primordia. Je významně snížena hladina DBH i TH, diferenciaci ale narušena není. Nehraje tedy roli v prvotní noradrenergické diferenciaci. Ačkoliv exprese *Hand2* přetrvává až do dospělosti, ukazuje se, že již není nutná pro expresi jak pan-neurálních, tak noradrenergických markerů. Pravděpodobně se podílí na regulaci exprese receptorů pro norepinefrin, má tedy vliv na propagaci

funkčního noradrenergního fenotypu, ale jiným způsobem než během vývoje (Hendershot et al., 2008; Stanzel et al., 2016).

6 Další transkripční faktory a možnosti regulace vývoje sympatiku

6.1 Protein spojený s nádorem beta buněk pankreatu 1 („insulinoma-associated protein 1“, INSM1)

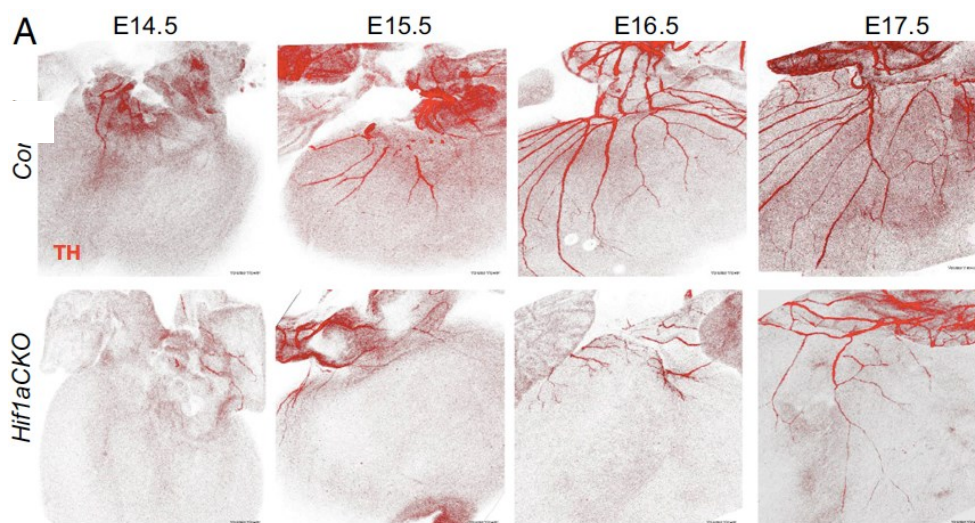
INSM1 je transkripční faktor s doménou zinkových prstů, jenž je detekován v neuronech napříč celým nervovým systémem. Jedná se o transkripční faktor, který v signalizaci stojí „downstream“ vůči ASCL1 i PHOX2B a „upstream“ vůči GATA3 a HAND2. Mutanti s *Ascl1* a *Insm1* globální delecí mají velmi podobný fenotyp, což naznačuje, že INSM1 funguje jako mediátor efektu ASCL1. U obou dochází k výraznému zmenšení velikosti rostrálně položených ganglií. Je opožděna exprese noradrenergických markerů a dalších „downstream“ ležících genů, později během vývoje je však obnovena a neurony diferencují normálně (Wildner et al., 2008).

6.2 Zesilovač genu pro insulin 1 („insuline gene enhancer protein 1“, ISL1)

ISL1 je transkripční faktor s LIM-homeodoménou, který má důležitou funkci ve vývoji nervového systému i dalších orgánových soustav. U mutantů s podmíněnou delecí *Isl1* v derivátech buněk zárodečné lišty (pod kontrolou *Wnt* promotoru) je již od E11,5 patrné zmenšení velikosti sympatických ganglií v důsledku snížené proliferace, a naopak zvýšené apoptózy u těchto mutantů. Ke snížené proliferaci pravděpodobně dochází v důsledku „downregulace“ exprese genů, jejichž produkty jsou nutné pro správné fungování buněčného cyklu a sympatického vývoje. Naopak dochází ke zvýšení exprese genů spojených s neurální lištou a vývojem gliových buněk, ISL1 má tedy zřejmě funkci v „upregulaci“ těchto genů. V období mezi E14,5 a E17,5 u *Isl1* mutantů s podmíněnou delecí téměř zcela chybí sympatická inervace srdce nejen v důsledku sníženého počtu neuronů v sympatických gangliích, ale i kvůli narušené morfogenezi neuronů. ISL1 má také důležitou úlohu v syntéze neurotransmiterů a v oddělení cholinergních a adrenergických subpopulací neuronů sympatiku. U mutantů s delecí *Isl1* je také přerušena exprese tropomyosinové receptorové kinázy A („tropomyosine receptor kinase A“, TRKA), což má vliv na přežívání neuronů pomocí NGF signalizace. ISL1 funguje „downstream“ vůči PHOX2B, ale „upstream“ vůči GATA3 a INSM1, a stojí paralelně vůči HAND2 (Huber et al., 2013; Zhang et al., 2018). ISL1 je jednoznačně vhodným kandidátem na další zkoumání, jelikož jeho úloha ve vývoji srdečního sympatiku je velmi komplexní a zdá se, že naprosto zásadní.

6.2.1 Hypoxií indukovaný faktor 1alfa („hypoxia-inducible factor 1alfa“, HIF1- α)

HIF1- α je transkripční faktor, který má klíčovou roli ve fyziologické odpovědi organismu na hypoxii a mimo jiné reguluje sympatickou inervaci a funkci srdce. Myši s globální delecí *Hif1a* umírají během vývoje v důsledku srdečních i nervových vývojových defektů. U myši s podmíněnou delecí *Hif1a* (pod kontrolou *Isl1*) dochází k výraznému zmenšení sekundárních sympatických ganglií. Konkrétně u tohoto mutantu se jedná o zmenšení v důsledku zvýšené apoptózy preganglionických neuronů a snížené proliferace prekurzorů sympatických ganglií (Obrázek 12). Svazky axonů vycházející ze sympatických ganglií mutantů jsou také tenčí než u kontrol. V E14,5 byla detekována snížená exprese *Th* v srdci pravděpodobně kvůli snížené inervaci sympatikem, která byla u mutantů detekována poprvé ve věku E14,5; nejspíše kvůli „downregulaci“ nervového růstového faktoru („nerve growth factor“, NGF), který je nutný pro inervaci cílových částí srdce. V E16,5; kdy bylo zjištěno významné snížení hustoty inervace srdce u *Hif1a* mutantů, byla také oproti kontrolám výrazně méně hustě a organizovaně inervována oblast kolem SAN, což by mohlo mít za následek vznik arytmií. U mutantů byla změněná kontraktilita levé síně oproti kontrolám, což může též vést ke vzniku arytmií či náhlému srdečnímu selhání (Bohuslavova et al., 2019).



Obrázek 12. Snížení inervace sympatických neuronů HIF1- α je transkripční faktor, který reguluje sympatickou inervaci srdce. Pokud je *Hif1a* deletován, dochází k výrazné redukci sympatické inervace, již ve věku E14,5. Ani v pozdějších vývojových stádiích není inervace mutantů (horní panel) a kontrol (dolní panel) vyrovnána. TH byla obarvena imunohistochemicky a na fotografiích je znázorněna posteriorní část srdce (Bohuslavova et al., 2019).

6.3 DICER1

Dicer1 je endoribonukleáza, která má funkci ve zpracovávání mikro-RNA. Nejedná se tedy o transkripční faktor. Mikro-RNA se váží do 3' nepřekládané oblasti mediátorové ribonukleové kyseliny („messenger ribonucleic acid“, mRNA), případně způsobují nestabilitu mRNA a znemožňují či pozměňují tak její expresi (Zehir et al., 2010). DICER1 má funkci v rozdělení sympatoadrenální linie na neurony a chromafinní buňky. Je-li gen pro DICER1 podmíněně deletován v buňkách neurální lišty a noradrenergických neuroblastech, dochází k výraznému zmenšování sympatických ganglií zhruba od věku E16,5 až do dospělosti. DICER1 není stěžejní pro prvotní diferenciaci sympatických neuronů, ale je potřebný v jejich pozdější diferenciaci do různých subtypů. Pokud je deletován, dochází ke zvýšení exprese cholinergních markerů a navýšení počtu cholinergních neuronů na úkor neuronů noradrenergických. Pravděpodobně k tomu alespoň částečně v pozdějším věku dochází v důsledku narušení signálních drah, do kterých je zapojena TRKA, receptor pro NGF. Tato signalizace hraje naprosto klíčovou roli v přežívání sympatických neuronů (Zehir et al., 2010; Stubbusch et al., 2015).

6.4 Aktivační protein 2b („activator protein 2b“, AP2B)

AP2B patří do rodiny bazických transkripčních faktorů se strukturou šroubovice-oblouk-šroubovice. Je exprimován v migrujících buňkách neurální lišty a zůstává aktivní i v pozdějším vývoji noradrenergických neuronů centrální nervové soustavy, tedy v *locus coeruleus*, i v periferní nervové soustavě v neuronech sympatiku. V embryích s *Ap2b* globální delecí dochází už v E10,5 k významnému paralelnímu snížení exprese *Dbh*, *Th*, *GATA3*, *Phox2b* i *Phox2a* v hvězdicovém gangliu oproti kontrolám, nejspíš v důsledku redukce velikosti sympatických ganglií. K redukci dochází kvůli zvýšené apoptóze u migrujících buněk neurální lišty, ale v premigratorních buňkách a buňkách primárních ganglií apoptóza zvýšená není. U části (cca 60 %) buněčné populace lze nahradit funkci AP2B funkcí AP2A. Oba transkripční faktory jsou potřebné i pro přežívání neuronů později ve vývoji (Hong et al., 2008b; Schmidt et al., 2011).

7 Migrace sympatických ganglií a navádění axonů k srdci

Poté, co buňky neurální lišty docestují k ventrální části dorsální aorty, vznikají v důsledku BMP signalizace a aktivity transkripčních faktorů v této oblasti primární ganglia a prekurzory chromafinních buněk. Ty poté migrují do finální destinace, tj. sekundárních ganglií, ze kterých inervují cílové orgány, resp. směrem k nadledvinám, kde dávají vzniknout chromafinním buňkám (Kasemeier-Kulesa et al., 2015; Lumb et al., 2018).

7.1 Migrace primárních ganglií

O migraci neuronů primárních sympatických ganglií a o sloučeninách, které za tímto procesem stojí, není příliš mnoho známo. Významného pokroku bylo prozatím dosaženo pouze na kuřecím modelu. Vzhledem k důležitosti tohoto fenoménu je v této kapitole výjimečně uvedena studie prováděna na tomto modelovém organismu. Nejprve dochází k elongaci několika málo axonů primárních sympatických ganglií ventrálně od dorsální aorty směrem k předním kořenům míšním. Ostatní neurony prodlužují své výběžky neorganizovaně všemi směry, ale později dochází ke shodné elongaci axonů všech neuronů opět směrem k předním kořenům míšním. Následně velmi volně spojené neurony koordinovaně migrují do konečných cílových oblastí. Po tom, co buňky docestují do cílových pozic, dochází ke změně tvaru i rozmístění jednotlivých buněk, což vede k vytvoření pevnějšího a kompaktnějšího shluku. Pro finální umístění ganglií je zásadní i interakce mezi primárními ganglii a axony preganglionických neuronů. Z primárních sympatických ganglií se tak stávají sekundární sympatická ganglia, která inervují cílové orgány. Molekulární migrace spočívá v produkci mozkového nervového faktoru („brain-derived nerve factor“, BDNF), který je produkován hlavně předními kořeny míšními, v nichž leží preganglionické neurony sympatiku, a ventrální částí neurální trubice. Primární ganglia produkují tropomyosinovou receptorovou kinázu B (TRKB), jejímž ligandem je právě BDNF a funguje jako chemoatraktant (Kasemeier-Kulesa et al., 2015). Zda se podobný mechanismus uplatňuje i u myši, potažmo u člověka, stále není jasné. Starší výzkumy ukazují, že v případě delece *Bdnf* dochází k chybnému formování synapsí mezi preganglionickými a postganglionickými neurony. Mechanismus není dosud znám, ačkoliv by se nabízelo podobné vysvětlení jako u kuřecího modelu. BDNF je však podle tohoto výzkumu exprimován primárními ganglii a TRKB naopak preganglionickými neurony (Causing et al., 1997). U člověka bylo navíc ukázáno, že na ustanovení finální pozice sekundárních sympatických ganglií se mimo výše zmíněné faktory podílí i regionální rozdíly v rychlosti růstu obratlů (Kruepunga et al., 2021).

7.2 Navádění axonů k srdci

Poté, co sekundární ganglia dosáhnou svých konečných pozic, začínají se jejich axony prodlužovat směrem k srdci. Trasa je určena krevním řečištěm a sloučeninami, které jsou produkovány hladkou svalovinou žil a tepen. Srdeční sympatikus je specifický tím, že jeho neurony se k srdci dostávají podél žil, nikoliv podél tepen, jak je typické pro sympatikus ve zbytku celého těla. Hlavním zdrojem axonů v srdci jsou hvězdicová ganglia, částečně však i horní krční ganglia. Obě ganglia jsou párová a laterálně symetrická (podél páteře), inervace srdce ale symetrická není – pravé a levé hvězdicové ganglium inervují oblasti s různou funkcí. Srdce je velmi hustě inervováno na dorsální straně, ventrální strana je inervována výrazně méně. Z pravého hvězdicového ganglia v E14 sestupují axony dorsálním směrem podél pravé horní duté žíly (*vena*

brachiocephalica sinistra) a *sinus venosus*. V místě, kde se horní dutá žíla napojuje na *sinus venosus*, dochází k rozvětvení svazku; první větev elonguje směrem k SAN a k pravé komoře a síni. Druhá větev inervuje hlavně levou komoru. Levé hvězdicové ganglium zajišťuje především inervaci dorsální strany komor. Konečná podoba inervace je ustanovena v E17,5. Na molekulární úrovni za navádění axonů zodpovídají endotelin 1 („endothelin 1“, EDN1) a jeho receptor A („endothelin receptor A“, EDNRA). EDN1 je exprimován v E14,5 endotelem pravé i levé horní žíly, *sinus venosus* a okolním kapilárním řečištěm, dále pak epikardem a myocyty. EDNRA je naopak exprimován axony hvězdicového ganglia. U myši s podmíněnou delecí *Edn1* ve vaskulárním endotelu (pod kontrolou genu pro receptor angiopoietin) a u mutantů s podmíněnou delecí *Endra* v sympatických neuronech (pod kontrolou *Th*) byla detekována neorganizovanost axonů, jejichž svazky byly zároveň výrazně tenčí než u kontrol. Množství axonů inervujících dorsální stranu srdce bylo významně eliminováno. *In vitro* bylo ukázáno, že EDN1 představuje signál potřebný k růstu axonů hvězdicového ganglia. U dospělých jedinců se stejnou podmíněnou delecí genu *Ednra* nebo *Edn1* sympatická dysfunkce přetrvává i v dospělosti, není zde tedy uplatněn žádný pozdější kompenzační mechanismus (Manousiouthakis et al., 2014; Poltavski et al., 2019). Následující výzkumy ukázaly, že v případě obou typů mutantů axony elongují podél tepen místo žil a inervují ektopické cíle. Kromě toho, že chybí signalizace regulovaná END1, dochází k přerušení exprese dalšího receptoru, který slouží k navádění axonů, plexinu A4 (PLXNA4). Jeho exprese je zahájena zesilovačem specifickým pro myocyty („myocyte-specific enhancer 2c“, MEF2C), který je aktivovaný EDN1. Jeho ligandem je SEMA3, který je produkován tepnami a na axony má repulzivní efekt. Jako koreceptor slouží pravděpodobně NRP1, je tedy zajímavé, že v navádění axonů se uplatňuje stejná signalizace jako u migrace buněk neurální lišty (Poltavski et al., 2019).

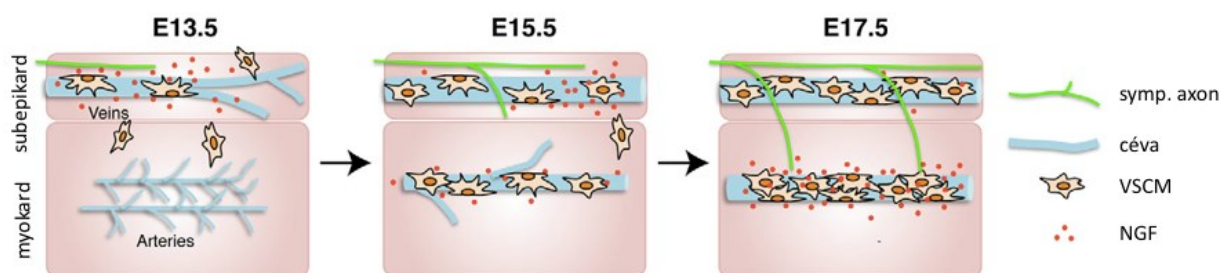
7.3 Ustanovení srdeční inervace a přežívání neuronů

7.3.1 Nervový růstový faktor („nerve growth factor“, NGF) a neurotrofin 3 („neurotrophin 3“, NT3)

Po ustanovení přibližného umístění neuronů, jež inervují srdce, ve věku E13 začínají sympatické axony inervovat subepikard, ve kterém se vyvíjejí velké koronární žíly. Axony jsou naváděny pomocí trofického faktoru NGF, který je produkován buňkami vaskulární hladké svaloviny (VSCM) ve stěnách koronárních žil, které v tomto období procházejí remodelací. Následně v E16,5 naváděcí roli přebírají koronární tepny, které se vyvíjí v myokardu (Obrázek 13), a dochází k finální inervaci srdce (Nam et al., 2013). Na růstu axonů se podílí i neurotrofin 3 (NT3), který je produkován VSCM koronárních žil. NT3 signalizace umožňuje růst axonů podél daného cíle, nespouští však signály vedoucí k přežívání neuronů. Naopak retrogradní signalizace NGF začíná v axonu a je, stejně jako působení NT3, zprostředkována receptorem

TRKA, který je následně internalizován v endozomu do těla neuronu, kde podporuje jeho přežívání kanonickou signální kaskádou receptorové tyrosin kinázy. Zároveň působením NGF signalizace dochází k retrogradní „upregulaci“ p75, receptoru neurotrofinů, což naopak vede ke snížení NT3 signalizace. Tato signalizace zaručuje, že neurony, jejichž axony nedorostou až do finální destinace, zemřou v důsledku absence NGF signalizace. Zároveň axony, které již inervují svůj cíl, by se díky vypnutí NT3 signalizace neměly být schopny dále prodlužovat. Důležitost p75 v inervaci srdce dokazuje i fakt, že při globální delecii p75 je myší srdce v E16,5 inervováno výrazně méně než u kontrol. Tento poměrně složitý způsob regulace zajišťuje velmi specifickou inervaci cílového orgánu, tzv. „system matching“ (Kuruvilla et al., 2004).

NGF, TRKA a p75 receptor jsou také důležité pro přežívání neuronů. Cílový orgán produkuje NGF, který v inervujícím axonu zvyšuje produkci TRKA. Je tedy spuštěna signalizace, která zajišťuje přežívání neuronu. Současně díky působení NGF dochází k aktivaci exprese BDNF a neurotrofinu 4 („neurotrophin 4“, NT4). V případě, že je signalizace NGF/TRKA na nízké úrovni, dochází naopak k aktivaci vnitřní apoptické dráhy zprostředkované p75 receptorem („mitochondriální“ apoptická dráha), jehož ligandy jsou právě NGF a TRKA. Tento systém zajišťuje, že cílová tkáň nebude hyperinervována – přežijí pouze neurony, v nichž je vysoká koncentrace TRKA, naopak neurony s nízkou koncentrací umírají (Deppmann et al., 2008). Zajímavou roli v regulaci přežívání sympatických neuronů hraje i způsob, jakým je NGF produkován. *In vitro* pokusy ukazují, že je syntetizován ve formě proneurotrofinu pro-NGF a poté je extracelulárně štěpen metaloproteinázami do maturované formy NGF. Pro-NGF má vyšší afinitu k p75 než k TRKA, což vede ke spuštění signální kaskády vedoucí ke smrti neuronu. Přežívání neuronů tedy závisí na poměru pro-NGF a NGF (Lee et al., 2001).



Obrázek 13. Role NGF v inervaci srdce NGF je nejprve produkován buňkami vaskulární hladké svaloviny (VSCM). Axony sympatických neuronů se na cestě k srdci nejprve orientují podél žil, které procházejí remodelací. Zhruba od věku E16,5 začíná být NGF produkován VSCM tepen, naopak v žilách jeho exprese klesá. Upraveno podle (Nam et al., 2013).

7.3.2 Semaforin 3a („semaphorin 3a“, SEMA3A)

SEMA3A je neuronální chemorepellent, který je zodpovědný za vytvoření nervového gradientu v srdci – nejhustěji je inervována báze (tj. SAN, AVN a Hisův svazek), naopak nejméně je inervován apex (tj. Purkyňova vlákna). Zároveň by mohl být zodpovědný za transmuralní gradient, kdy je nejhustěji inervován subepikard, nejméně pak subendokard. Oba gradienty jsou nutné pro správnou repolarizaci a jejich narušení může vést k arytmiím. Receptorem SEMA3A je NRP1. Expresí *Sema3a* je inverzní vůči sympatické inervaci. Inervace srdce je tedy závislá na rozmístění a rovnováze mezi NGF, jenž funguje jako chemoatraktant, a SEMA3A. U *Sema3a*^{-/-} mutantů s podmíněnou delecí v kardiomyocytech (pod kontrolou *Wnt*) dochází k chybné agregaci sympatických neuronů, ganglia jsou navíc dislokována a axony z ganglií vystupují netypicky do středové oblasti mezi oběma sympatickými provazci. Tento stav přetrvává až do dospělosti, neexistuje tedy pravděpodobně žádný jiný ligand, který by ztrátu *Sema3a* vykompenzoval. K chybné agregaci a ektopickému umístění sekundárních ganglií pravděpodobně dochází v důsledku narušené migrace buněk neurální lišty. K atypickým projekcím axonů nejspíše dochází až během migrace neuronů primárních ganglií. U *Sema3a*^{-/-} mutantů s globální delecí byla zjištěna sinusová bradykardie, u mutantů se zvýšenou expresí *Sema3a*^{-/-} také dochází ke vzniku komorových arytmií, jedná se tedy o medicínsky významný gen. Stejný fenotyp jako u mutantů se *Sema3a* delecí je detekován i v případě podmíněné delece *Nrpl* v buňkách zárodečné lišty (Ieda et al., 2007; Maden et al., 2012). Nedávno bylo navíc ukázáno, že účinek SEMA3A může být taktéž proapoptotický. K apoptóze dochází zřejmě v důsledku retrogradní SEMA3A/NRP-1-plexin 3 signalizace, která aktivuje kaspázy, a je tedy odlišná od signalizace za účasti plexinu 4, která zodpovídá za repulzivní efekt. Další výzkum musí objasnit vztah biomolekul SEMA3A a NGF v apoptóze (Wehner et al., 2016).

8 Patologie sympatického nervového systému

V důsledku narušené rovnováhy mezi srdečním sympatikem a parasympatikem může docházet k rozvoji různých typů dysautonomií, které se projevují např. arytmií, hypertenzí, kongestivním srdečním selháním, a nakonec i náhlým srdečním úmrtím. Zmapování a pochopení regulačních drah uplatňujících se ve vývoji sympatické srdeční inervace může být cenným nástrojem pro vývoj metod léčby výše zmíněných onemocnění (Cao et al., 2000).

Se změnou sympatické inervace se nejčastěji spojuje ventrikulární tachykardie a atriální fibrilace. Jedná se o onemocnění ze skupiny arytmií, kdy dochází ke změnám v srdečním cyklu. Významným onemocněním, při kterém dochází ke změnám v sympatické inervaci, je infarkt myokardu. Pokusy na psech ukazují, že se zřejmě nejedná pouze o změny inervace v rámci srdce, ale i v rámci hvězdicového ganglia

samotného (Han et al., 2012). Jeho velmi častou komplikací jsou právě různé typy arytmií, které vznikají v důsledku změn hustoty inervace srdce. V místě poranění po infarktu dochází k lokální „up-regulaci“ NGF, který je produkován především makrofágy. Ty jsou aktivované norepinefrinem, který je produkován nervovými zakončeními sympatických neuronů, skrze jejich β_1 adrenergní receptory (Lyu et al., 2020). Úloha NGF v srdci po infarktu je reinervace ischemických oblastí, obvykle však dochází k hyperinervaci. Ta má zřejmě zajistit dostatečnou kontraktilitu komor, bohužel ale často vede ke vzniku arytmií a náhlému srdečnímu úmrtí. Vzhledem k tomu, že NGF vzniká z pro-NGF, jehož signalizace vede k apoptóze, můžou naopak vzniknout denervované oblasti, což v některých případech vede ke kongestivnímu (městnavému) srdečnímu selhání. Nicméně role NGF v infarktu myokardu není pouze negativní, má i protektivní účinky např. proti oxidativnímu stresu a při regeneraci myokardu (Pius-Sadowska and Machaliński, 2021). NGF je tedy adeptem na molekulární terapeutikum po infarktu myokardu, jelikož by mohl zabránit následným komplikacím. Na potkaním modelu byla aplikována terapie pomocí malé interferující RNA, která sice úspěšně snížila hustotu sympatické inervace srdce, nicméně vzhledem k pleiotropnímu účinku NGF snížila účinnost dalších regeneračních změn po infarktu. Tato problematika tedy vyžaduje další výzkum (Hu et al., 2014). Potkaní model ukazuje, že dalším proteinem, který by mohl představovat potenciální cíl léčby, je SEMA3A. Vzhledem k tomu, že jeho účinek je opačný než u NGF (jedná se o chemorepellent), po infarktu dochází k rozvoji ventrikulární tachykardie při nízkých koncentracích toho proteinu. Výzkum ukázal, že exogenní zdroj SEMA3A způsobil snížení hustoty sympatické inervace i výskyt ventrikulárních arytmií. Ostatní srdeční funkce zůstaly nezměněné. SEMA3A by tedy mohla být vhodnějším proteinem v léčbě komplikací při infarktu než NGF (Hu et al., 2016).

9 Závěr

Vývoj srdečního sympatiku je složitý proces, který se skládá ze čtyř hlavních fází. Ačkoliv bylo objeveno poměrně velké množství regulačních faktorů, které se účastní diferenciace i migrace buněk tohoto systému, vztahy mezi nimi nejsou zcela objasněny. Obzvláště migrace primárních sympatických ganglií a inervace cílových orgánů, v tomto případě srdce, vyžaduje provedení dalších experimentů na savčích modelech, které by mohly pomoci pochopit podstatu vzniku kardiovaskulárních chorob a dysautonomií u člověka. Zároveň by další výzkum mohl směřovat k určení vhodných proteinů pro léčby arytmií, náhlých srdečních selhání či pro zmírnění následků infarktu myokardu.

V první části vývoje sympatiku dochází k migraci buněk neurální lišty k dorsální aortě. Migrace je koordinována pomocí NRP1/SEMA3A signalizace. NRP1 je exprimován migrujícími buňkami. Naopak SEMA3 jsou komplementárně exprimovány posteriorním sklerotomem a dermomyotomem a migrující buňky tak odpuzují, jelikož SEMA3 funguje jako chemorepellent. Později naváděcí úlohu přebírá neuregulin/ERBB signalizace, která má za úkol udržení buněk v migratorním stavu a jejich navedení k dorsální aortě.

Po tom, co buňky neurální lišty domigrují k dorsální aortě, je zahájena druhá fáze jejich vývoje – diferenciace. Dorsální aorta produkuje BMP-2 a BMP-4, které patří do nadrodiny TGF- β proteinů a spouští buď nekanonickou signalizaci, nebo kanonickou signalizaci přes transkripční faktor SMAD. BMP signalizace reguluje expresi transkripčních faktorů PHOX2B a ASCL1. Oba transkripční faktory jsou koexprimovány v raném vývoji společně se *Sox10*, jehož úloha spočívá v udržení buněk neurální lišty v nediferencovaném stavu. Expres SOX10 je postupně snižována, a naopak exprese PHOX2B a ASCL1 se navyšuje. ASCL1 nemá významnou úlohu v neuronální či noradrenergní diferenciaci, jeho funkce je proproliferační. PHOX2B, patřící do rodiny transkripčních faktorů s homeodoménou, je naopak „master gen“, který je naprosto esenciální pro vývoj sympatiku. Jeho role spočívá v udržení exprese ASCL1, a především v indukcii exprese genů nezbytných pro syntézu katecholaminů, tj. *Dbh* a *Th*. K tomu dochází skrze další geny, které leží vůči *Phox2b* „downstream“. Jedná se např. o *Phox2a*, *Gata3* a *Hand2*. PHOX2A není zásadní pro propagaci noradrenergního fenotypu, je ale schopen částečně kompenzovat ztrátu či narušení PHOX2B. GATA3 podporuje jak proliferaci, tak i přežívání neuronů. Zároveň jsou nezbytné pro ustanovení noradrenergního fenotypu, regulují expresi *Th* i *Dbh*. Navíc jsou pravděpodobně součástí zpětnovazebné smyčky a ovlivňují tak expresi „upstream“ stojících genů. HAND2 má funkci v přežívání proliferujících prekurzorových SOX10⁺ buněk, ze kterých vznikají sympatická primordia. V dospělosti se podílí na regulaci exprese receptoru pro norepinefrin. Mezi další transkripční faktory, které ovlivňují

vývoj sympatiku, patří např. INSM1, ISL1, HIF1A, či AP2B. Pokud je jakákoliv komponenta této regulační dráhy narušena, může docházet k vývojovým vadám sympatiku a v důsledku toho k chybné inervaci srdce.

Ve třetí fázi vývoje dochází k migraci primárních sympatických ganglií od dorsální aorty směrem k páteři, do paravertebrálního umístění. Tento proces není u savců příliš prozkoumán, dá se ale předpokládat, že podobně jako u kuřecího modelu by proces mohl být regulován BDNF/TRKB signalizací. Následně, ve čtvrté fázi, dochází k prodlužování axonů z hvězdicového a horního cervikálního ganglia směrem k srdci. To je regulováno EDN1, který je produkován endotelem horní duté žíly, axony komplementárně exprimují jeho receptor EDNRA. V srdci naváděcí funkci přebírá NT-3, NGF a jejich receptor TRKA. Zatímco NT-3 zajišťuje elongaci axonů podél koronárních žil, NGF reguluje finální inervaci myokardu. Spolu s p75 receptorem a ligandy BDNF a NT-4 se podílí na složitém systému, který zajišťuje přežívání pouze vybraných neuronů. Pokusy nicméně ukazují, že toto nejsou zdaleka jediné proteiny, které regulují navádění a přežívání neuronů. Dá se tedy očekávat, že výzkum této problematiky bude v příštích letech tomuto oboru dominovat.

10 Citace

1. Adachi M, Browne D, Lewis EJ (2000) Paired-like homeodomain proteins Phox2a/Arix and Phox2b/NBPhox have similar genetic organization and independently regulate dopamine beta-hydroxylase gene transcription. *DNA Cell Biol* 19, pp. 539-554.
2. Atkielski A (2009) EKG křivka. Dostupné na: [https://www.wikiskripta.eu/w/EKG_\(pediatrie\)#/media/File:ECG-PQRST%2Bpopis.svg](https://www.wikiskripta.eu/w/EKG_(pediatrie)#/media/File:ECG-PQRST%2Bpopis.svg) [Datum přístupu: 14. 4. 2021].
3. Baggiolini A, Varum S, Mateos JM, Bettosini D, John N, Bonalli M, Ziegler U, Dimou L, Clevers H, Furrer R, Sommer L (2015) Premigratory and migratory neural crest cells are multipotent in vivo. *Cell Stem Cell* 16, pp. 314-322.
4. Bhatt S, Diaz R, Trainor PA (2013) Signals and switches in Mammalian neural crest cell differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5.
5. Bohuslavova R, Cerychova R, Papousek F, Olejnickova V, Bartos M, Görlach A, Kolar F, Sedmera D, Semenza GL, Pavlinkova G (2019) HIF-1 α is required for development of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, pp. 13414-13423.
6. Britsch S, Li L, Kirchhoff S, Theuring F, Brinkmann V, Birchmeier C, Riethmacher D (1998) The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system. *Genes Dev* 12, pp. 1825-1836.
7. Callahan T, Young HM, Anderson RB, Enomoto H, Anderson CR (2008) Development of satellite glia in mouse sympathetic ganglia: GDNF and GFR alpha 1 are not essential. *Glia* 56, pp. 1428-1437.
8. Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, Czer L, Wolf PL, Denton TA, Shintaku IP, Chen PS, Chen LS (2000) Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia. *Circulation* 101, pp. 1960-1969.
9. Causing CG, Gloster A, Aloyz R, Bamji SX, Chang E, Fawcett J, Kuchel G, Miller FD (1997) Synaptic innervation density is regulated by neuron-derived BDNF. *Neuron* 18, pp. 257-267.
10. Coote JH, Chauhan RA (2016) The sympathetic innervation of the heart: Important new insights. *Auton Neurosci* 199, pp. 17-23.
11. Coppola E, d'Autréaux F, Rijli FM, Brunet J-F (2010) Ongoing roles of Phox2 homeodomain transcription factors during neuronal differentiation. *Development* 137, pp. 4211-4220.
12. Coppola E, Pattyn A, Guthrie SC, Goridis C, Studer M (2005) Reciprocal gene replacements reveal unique functions for Phox2 genes during neural differentiation. *EMBO J* 24, pp. 4392-4403.
13. *Čihák R (2004a) Systema nervosum autonomicum – autonomní nervový systém. In: *Anatomie 3, Pars sympathica (systematis nervosi autonomici)*, pp. 551-554. Praha: Grada.

14. *Čihák R (2004b) Systema nervosum autonomicum – autonomní nervový systém. In: *Anatomie 3*, Uspořádání autonomního nervového systému a rozdíly mezi sympatikem a parasympatikem, pp. 546-549. Praha: Grada.
15. Deppmann CD, Mihalas S, Sharma N, Lonze BE, Niebur E, Ginty DD (2008) A model for neuronal competition during development. *Science* 320, pp. 369-373.
16. Doevendans PA, J. Daemen M, de Muinck ED, Smits JF (1998) Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research* 39, pp. 34-49.
17. Ebert SN, Thompson RP (2001) Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 88, pp. 117-124.
18. Ebert SN, Rong Q, Boe S, Pfeifer K (2008) Catecholamine-synthesizing cells in the embryonic mouse heart. *Ann N Y Acad Sci* 1148, pp. 317-324.
19. Ebert SN, Rong Q, Boe S, Thompson RP, Grinberg A, Pfeifer K (2004) Targeted insertion of the Cre-recombinase gene at the phenylethanolamine n-methyltransferase locus: a new model for studying the developmental distribution of adrenergic cells. *Dev Dyn* 231, pp. 849-858.
20. Fan Y, Huang J, Kieran N, Zhu MY (2009) Effects of transcription factors Phox2 on expression of norepinephrine transporter and dopamine beta-hydroxylase in SK-N-BE(2)C cells. *J Neurochem* 110, pp. 1502-1513.
21. Furlan A, La Manno G, Lübke M, Häring M, Abdo H, Hochgerner H, Kupari J, Usoskin D, Airaksinen MS, Oliver G, Linnarsson S, Ernfors P (2016) Visceral motor neuron diversity delineates a cellular basis for nipple- and pilo-erection muscle control. *Nat Neurosci* 19, pp. 1331-1340.
22. Goldstein DS, Brush JE, Jr., Eisenhofer G, Stull R, Esler M (1988) In vivo measurement of neuronal uptake of norepinephrine in the human heart. *Circulation* 78, pp. 41-48.
23. Gonsalvez DG, Cane KN, Landman KA, Enomoto H, Young HM, Anderson CR (2013) Proliferation and cell cycle dynamics in the developing stellate ganglion. *J Neurosci* 33, pp. 5969-5979.
24. Guillemot F, Joyner AL (1993) Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system. *Mech Dev* 42, pp. 171-185.
25. Han S, Kobayashi K, Joung B, Piccirillo G, Maruyama M, Vinters HV, March K, Lin SF, Shen C, Fishbein MC, Chen PS, Chen LS (2012) Electroanatomic remodeling of the left stellate ganglion after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 59, pp. 954-961.
26. Hashimoto Y, Tsutsumi M, Myojin R, Maruta K, Onoda F, Tashiro F, Ohtsu M, Murakami Y (2011) Interaction of Hand2 and E2a is important for transcription of Phox2b in sympathetic nervous system neuron differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 408, pp. 38-44.

27. Hendershot TJ, Liu H, Clouthier DE, Shepherd IT, Coppola E, Studer M, Firulli AB, Pittman DL, Howard MJ (2008) Conditional deletion of *Hand2* reveals critical functions in neurogenesis and cell type-specific gene expression for development of neural crest-derived noradrenergic sympathetic ganglion neurons. *Dev Biol* 319, pp. 179-191.
28. Hirsch MR, Tiveron MC, Guillemot F, Brunet JF, Goridis C (1998) Control of noradrenergic differentiation and *Phox2a* expression by *MASH1* in the central and peripheral nervous system. *Development* 125, pp. 599-608.
29. Hong SJ, Kim CH, Kim KS (2001) Structural and functional characterization of the 5' upstream promoter of the human *Phox2a* gene: possible direct transactivation by transcription factor *Phox2b*. *J Neurochem* 79, pp. 1225-1236.
30. Hong SJ, Huh Y, Chae H, Hong S, Lardaro T, Kim KS (2006) GATA-3 regulates the transcriptional activity of tyrosine hydroxylase by interacting with CREB. *J Neurochem* 98, pp. 773-781.
31. Hong SJ, Choi HJ, Hong S, Huh Y, Chae H, Kim KS (2008a) Transcription factor GATA-3 regulates the transcriptional activity of dopamine beta-hydroxylase by interacting with Sp1 and AP4. *Neurochem Res* 33, pp. 1821-1831.
32. Hong SJ, Lardaro T, Oh MS, Huh Y, Ding Y, Kang UJ, Kirfel J, Buettner R, Kim KS (2008b) Regulation of the noradrenaline neurotransmitter phenotype by the transcription factor AP-2beta. *J Biol Chem* 283, pp. 16860-16867.
33. Hu H, Xuan Y, Wang Y, Xue M, Suo F, Li X, Cheng W, Li X, Yin J, Liu J, Yan S (2014) Targeted NGF siRNA delivery attenuates sympathetic nerve sprouting and deteriorates cardiac dysfunction in rats with myocardial infarction. *PLoS One* 9.
34. Hu H, Xuan Y, Xue M, Cheng W, Wang Y, Li X, Yin J, Li X, Yang N, Shi Y, Yan S (2016) Semaphorin 3A attenuates cardiac autonomic disorders and reduces inducible ventricular arrhythmias in rats with experimental myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 16.
35. Huber K, Narasimhan P, Shtukmaster S, Pfeifer D, Evans SM, Sun Y (2013) The LIM-Homeodomain transcription factor *Islet-1* is required for the development of sympathetic neurons and adrenal chromaffin cells. *Dev Biol* 380, pp. 286-298.
36. Chandra R, Portbury AL, Ray A, Ream M, Groelle M, Chikaraishi DM (2006) Beta1-adrenergic receptors maintain fetal heart rate and survival. *Biol Neonate* 89, pp. 147-158.
37. Chow LT, Chow SS, Anderson RH, Gosling JA (2001) Autonomic innervation of the human cardiac conduction system: changes from infancy to senility--an immunohistochemical and histochemical analysis. *Anat Rec* 264, pp. 169-182.
38. Icewalker (2010) Převodní systém srdeční. Dostupné na: https://www.wikiskripta.eu/images/e/e5/Srdce_prevodni_system.png [Datum přístupu: 3. 11. 2020].

39. Ieda M, Kanazawa H, Kimura K, Hattori F, Ieda Y, Taniguchi M, Lee JK, Matsumura K, Tomita Y, Miyoshi S, Shimoda K, Makino S, Sano M, Kodama I, Ogawa S, Fukuda K (2007) *Sema3a* maintains normal heart rhythm through sympathetic innervation patterning. *Nat Med* 13, pp. 604-612.
40. Ishii M, Arias AC, Liu L, Chen YB, Bronner ME, Maxson RE (2012) A stable cranial neural crest cell line from mouse. *Stem Cells Dev* 21, pp. 3069-3080.
41. *Jobling P (2012) Visceral Motoneurons. In: *The Mouse Nervous System*, Chapter 17, pp. 499-519. San Diego: Academic Press.
42. Kasemeier-Kulesa JC, Morrison JA, Lefcort F, Kulesa PM (2015) *TrkB*/BDNF signalling patterns the sympathetic nervous system. *Nat Commun* 6, pp. 1-10.
43. Kawano H, Okada R, Yano K (2003) Histological study on the distribution of autonomic nerves in the human heart. *Heart Vessels* 18, pp. 32-39.
44. Kawashima T (2005) The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)* 209, pp. 425-438.
45. *Kaye G, Lemery R, Furniss S (2010) Cardiac Arrhythmias. In: *Fast Facts*, Conduction within the heart, pp. 7-9. Abingdon: Health Press Limited.
46. Kelder TP, Duim SN, Vicente-Steijn R, Végh AM, Kruithof BP, Smits AM, van Bavel TC, Bax NA, Schalij MJ, Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Goumans MJ, Jongbloed MR (2015) The epicardium as modulator of the cardiac autonomic response during early development. *J Mol Cell Cardiol* 89, pp. 251-259.
47. Kim J, Lo L, Dormand E, Anderson DJ (2003) *SOX10* maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron* 38, pp. 17-31.
48. Klabunde RE (2018) Autonomic Ganglia. In:
49. Kruepunga N, Hikspoors J, Hülsman CJM, Mommen GMC, Köhler SE, Lamers WH (2021) Development of the sympathetic trunks in human embryos. *J Anat.*
50. Kuruvilla R, Zweifel LS, Glebova NO, Lonze BE, Valdez G, Ye H, Ginty DD (2004) A neurotrophin signaling cascade coordinates sympathetic neuron development through differential control of *TrkA* trafficking and retrograde signaling. *Cell* 118, pp. 243-255.
51. *Laflamme MA, Sebastian MM, Buetow BS (2012) Cardiovascular. In: *Comparative Anatomy and Histology*, Chapter 10, pp. 135-153. San Diego: Academic Press.
52. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, pp. 1945-1948.
53. Lim KC, Lakshmanan G, Crawford SE, Gu Y, Grosveld F, Engel JD (2000) *Gata3* loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nat Genet* 25, pp. 209-212.

54. Liu H, Margiotta JF, Howard MJ (2005) BMP4 supports noradrenergic differentiation by a PKA-dependent mechanism. *Dev Biol* 286, pp. 521-536.
55. Lumb R, Wiszniak S, Kabbara S, Scherer M, Harvey N, Schwarz Q (2014) Neuropilins define distinct populations of neural crest cells. *Neural Dev* 9, pp. 24.
56. Lumb R, Tata M, Xu X, Joyce A, Marchant C, Harvey N, Ruhrberg C, Schwarz Q (2018) Neuropilins guide preganglionic sympathetic axons and chromaffin cell precursors to establish the adrenal medulla. *Development* 145, pp. dev162552.
57. Lyu J, Wang M, Kang X, Xu H, Cao Z, Yu T, Huang K, Wu J, Wei X, Lei Q (2020) Macrophage-mediated regulation of catecholamines in sympathetic neural remodeling after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 115, pp. 56.
58. Maden CH, Gomes J, Schwarz Q, Davidson K, Tinker A, Ruhrberg C (2012) NRP1 and NRP2 cooperate to regulate gangliogenesis, axon guidance and target innervation in the sympathetic nervous system. *Dev Biol* 369, pp. 277-285.
59. Manousiouthakis E, Mendez M, Garner MC, Exertier P, Makita T (2014) Venous endothelin guides sympathetic innervation of the developing mouse heart. *Nat Commun* 5.
60. Moriguchi T, Takako N, Hamada M, Maeda A, Fujioka Y, Kuroha T, Huber RE, Hasegawa SL, Rao A, Yamamoto M, Takahashi S, Lim KC, Engel JD (2006) Gata3 participates in a complex transcriptional feedback network to regulate sympathoadrenal differentiation. *Development* 133, pp. 3871-3881.
61. Morikawa Y, Cserjesi P (2008) Cardiac neural crest expression of Hand2 regulates outflow and second heart field development. *Circ Res* 103, pp. 1422-1429.
62. Morikawa Y, Dai YS, Hao J, Bonin C, Hwang S, Cserjesi P (2005) The basic helix-loop-helix factor Hand 2 regulates autonomic nervous system development. *Dev Dyn* 234, pp. 613-621.
63. Morikawa Y, Zehir A, Maska E, Deng C, Schneider MD, Mishina Y, Cserjesi P (2009) BMP signaling regulates sympathetic nervous system development through Smad4-dependent and -independent pathways. *Development* 136, pp. 3575-3584.
64. Morin X, Cremer H, Hirsch MR, Kapur RP, Golidis C, Brunet JF (1997) Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a. *Neuron* 18, pp. 411-423.
65. Murphy C, Lazzara R (2016) Current concepts of anatomy and electrophysiology of the sinus node. *J Interv Card Electrophysiol* 46, pp. 9-18.
66. Nam J, Onitsuka I, Hatch J, Uchida Y, Ray S, Huang S, Li W, Zang H, Ruiz-Lozano P, Mukoyama YS (2013) Coronary veins determine the pattern of sympathetic innervation in the developing heart. *Development* 140, pp. 1475-1485.

67. Nishii K, Shibata Y (2006) Mode and determination of the initial contraction stage in the mouse embryo heart. *Anat Embryol (Berl)* 211, pp. 95-100.
68. Parlato R, Otto C, Begus Y, Stotz S, Schütz G (2007) Specific ablation of the transcription factor CREB in sympathetic neurons surprisingly protects against developmentally regulated apoptosis. *Development* 134, pp. 1663-1670.
69. Pattyn A, Goridis C, Brunet JF (2000) Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene *Phox2b*. *Mol Cell Neurosci* 15, pp. 235-243.
70. Pattyn A, Guillemot F, Brunet JF (2006) Delays in neuronal differentiation in *Mash1/Ascl1* mutants. *Dev Biol* 295, pp. 67-75.
71. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1997) Expression and interactions of the two closely related homeobox genes *Phox2a* and *Phox2b* during neurogenesis. *Development* 124, pp. 4065-4075.
72. Pattyn A, Morin X, Cremer H, Goridis C, Brunet JF (1999) The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399, pp. 366-370.
73. *Pius-Sadowska E, Machaliński B (2021) Pleiotropic activity of nerve growth factor in regulating cardiac functions and counteracting pathogenesis. *ESC Heart Fail* 8, pp. 974-987.
74. Poltavski DM, Colombier P, Hu J, Duron A, Black BL, Makita T (2019) Venous endothelin modulates responsiveness of cardiac sympathetic axons to arterial semaphorin. *Elife* 8, pp. e42528.
75. Randall WC, McNally H (1960) Augmentor action of the sympathetic cardiac nerves in man. *Journal of Applied Physiology* 15, pp. 629-631.
76. *Ross S, Hill CS (2008) How the Smads regulate transcription. *Int J Biochem Cell Biol* 40, pp. 383-408.
77. Roth GA et al. (2020) Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 76, pp. 2982-3021.
78. Rüdiger R, Binder E, Tsarovina K, Schmidt M, Reiff T, Stubbusch J, Rohrer H (2009) In vivo role for CREB signaling in the noradrenergic differentiation of sympathetic neurons. *Mol Cell Neurosci* 42, pp. 142-151.
79. Savolainen SM, Foley JF, Elmore SA (2009) Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on E11.5 to E18.5. *Toxicol Pathol* 37, pp. 395-414.
80. Serbedzija GN, Fraser SE, Bronner-Fraser M (1990) Pathways of trunk neural crest cell migration in the mouse embryo as revealed by vital dye labelling. *Development* 108, pp. 605-612.
81. Shah NM, Groves AK, Anderson DJ (1996) Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell* 85, pp. 331-343.

82. Schmidt M, Huber L, Majdazari A, Schütz G, Williams T, Rohrer H (2011) The transcription factors AP-2 β and AP-2 α are required for survival of sympathetic progenitors and differentiated sympathetic neurons. *Dev Biol* 355, pp. 89-100.
83. *Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Ross LM, Lamperti ED (2006) Thieme atlas of anatomy: Neck and internal organs. In: *Heart: Impulse formation and Conduction system*, Thorax, pp. 110-145. New York: Thieme.
84. Schwarz Q, Maden CH, Davidson K, Ruhrberg C (2009) Neuropilin-mediated neural crest cell guidance is essential to organise sensory neurons into segmented dorsal root ganglia. *Development* 136, pp. 1785-1789.
85. *Snell RS (2010) Organization of the Autonomic Nervous System. In: *Clinical neuroanatomy*, The Autonomic Nervous System, pp. 396-398. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.
86. Soldatov R et al. (2019) Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science* 364, pp. eaas9536.
87. Sommer L, Shah N, Rao M, Anderson DJ (1995) The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis. *Neuron* 15, pp. 1245-1258.
88. Stanzel S, Stubbusch J, Pataskar A, Howard MJ, Deller T, Ernsberger U, Tiwari VK, Rohrer H, Tsarovina K (2016) Distinct roles of hand2 in developing and adult autonomic neurons. *Dev Neurobiol* 76, pp. 1111-1124.
89. Stubbusch J, Narasimhan P, Hennchen M, Huber K, Unsicker K, Ernsberger U, Rohrer H (2015) Lineage and stage specific requirement for Dicer1 in sympathetic ganglia and adrenal medulla formation and maintenance. *Dev Biol* 400, pp. 210-223.
90. Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD (1995) Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* 374, pp. 643-646.
91. Tiveron MC, Hirsch MR, Brunet JF (1996) The expression pattern of the transcription factor Phox2 delineates synaptic pathways of the autonomic nervous system. *J Neurosci* 16, pp. 7649-7660.
92. Tsarovina K, Pattyn A, Stubbusch J, Müller F, van der Wees J, Schneider C, Brunet JF, Rohrer H (2004) Essential role of Gata transcription factors in sympathetic neuron development. *Development* 131, pp. 4775-4786.
93. Tsarovina K, Reiff T, Stubbusch J, Kurek D, Grosveld FG, Parlato R, Schütz G, Rohrer H (2010) The Gata3 transcription factor is required for the survival of embryonic and adult sympathetic neurons. *J Neurosci* 30, pp. 10833-10843.
94. Valarché I, Tissier-Seta JP, Hirsch MR, Martinez S, Goridis C, Brunet JF (1993) The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* 119, pp. 881-896.

95. *Végh AMD, Duim SN, Smits AM, Poelmann RE, Ten Harkel ADJ, DeRuiter MC, Goumans MJ, Jongbloed MRM (2016) Part and Parcel of the Cardiac Autonomic Nerve System: Unravelling Its Cellular Building Blocks during Development. *J Cardiovasc Dev Dis* 3.
96. Wehner AB, Abdesselem H, Dickendesher TL, Imai F, Yoshida Y, Giger RJ, Pierchala BA (2016) Semaphorin 3A is a retrograde cell death signal in developing sympathetic neurons. *Development* 143, pp. 1560-1570.
97. Wehrwein EA, Orer HS, Barman SM (2016) Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol* 6, pp. 1239-1278.
98. Wildner H, Gierl MS, Strehle M, Pla P, Birchmeier C (2008) Insm1 (IA-1) is a crucial component of the transcriptional network that controls differentiation of the sympatho-adrenal lineage. *Development* 135, pp. 473-481.
99. Xu H, Firulli AB, Zhang X, Howard MJ (2003) HAND2 synergistically enhances transcription of dopamine-beta-hydroxylase in the presence of Phox2a. *Dev Biol* 262, pp. 183-193.
100. Yang C, Kim HS, Seo H, Kim CH, Brunet JF, Kim KS (1998) Paired-like homeodomain proteins, Phox2a and Phox2b, are responsible for noradrenergic cell-specific transcription of the dopamine beta-hydroxylase gene. *J Neurochem* 71, pp. 1813-1826.
101. Zehir A, Hua LL, Maska EL, Morikawa Y, Cserjesi P (2010) Dicer is required for survival of differentiating neural crest cells. *Dev Biol* 340, pp. 459-467.
102. Zhang Q, Huang R, Ye Y, Guo X, Lu J, Zhu F, Gong X, Zhang Q, Yan J, Luo L, Zhuang S, Chen Y, Zhao X, Evans SM, Jiang C, Liang X, Sun Y (2018) Temporal requirements for ISL1 in sympathetic neuron proliferation, differentiation, and diversification. *Cell Death Dis* 9.
103. Zhong C, Zheng M, Cui K, Martins AJ, Hu G, Li D, Tessarollo L, Kozlov S, Keller JR, Tsang JS, Zhao K, Zhu J (2020) Differential Expression of the Transcription Factor GATA3 Specifies Lineage and Functions of Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 52, pp. 83-95.e84.
104. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD (1995) Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 374, pp. 640-643.

*sekundární citace