

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Radka Čerychová

MOLEKULÁRNÍ MECHANISMY V DIABETICKÉ
EMBRYOPATII

Molecular mechanisms in diabetic embryopathy

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Gabriela Pavlínková, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 2. 5. 2013

Podpis:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce RNDr. Gabriele Pavlíkové, Ph.D. za vynikající vedení a Ing. Romaně Bohuslavové za čas, který mi věnovala. Dále bych ráda poděkovala prof. MUDr. Davidovi Sedmerovi Ph.D., DrSc. za pomoc při zhodnocení kardiovaskulárních defektů.

Také bych chtěla poděkovat celému kolektivu Laboratoře molekulární patogenetiky za přátelskou pracovní atmosféru. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodičům za to, že mi umožnili studovat.

Abstract

Diabetic embryopathy is one of many serious complications associated with diabetes. It is known that maternal diabetes increases the frequency of congenital defects up to ten times. The most common defects are cardiovascular and neural tube defects. Molecular mechanisms of diabetic embryopathy are still not known. This work contributes to elucidation of molecular processes leading to development of cardiovascular defects in diabetic embryopathy. This study is based on observation that maternal diabetes affects transcriptional regulation of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in developing embryo. To study the influence of maternal diabetes on HIF-1 signaling pathway, we used mouse model heterozygous for "knock-out" of *Hif1 α* gene. Our analyses showed the negative combinational effects of maternal diabetes and *Hif1 α ^{+/-}* genotype on embryonic development and increased risk of diabetic embryopathy. Histological analysis demonstrated the increased incidence of cardiovascular defects, particularly defects of interventricular septum and hypoplastic compact left ventricular wall in embryonic day (E) 14,5 *Hif1 α ^{+/-}* embryos compared to *wt* littermates from the diabetic pregnancy. Using qPCR, we analyzed gene expression changes in the embryonic hearts at E9.5 and E10.5. We selected genes important for the development of heart, and direct or potential target genes of HIF-1 signaling. These analyses showed changes in the expression of genes important for overall development of heart (*Vegfa* and *Wt1*), genes important for differentiation of cardiomyocytes (*Nkx2.5* and *Mef2c*), genes important for chambers specification (*Hand1* and *Hand2*), genes important for septation (*Gata4*, *Tbx5* and *Bmp4*) and gene important for the specification of precursor cells and their migration to the heart (*Isl1*). Embryonic mRNA expression of *Vegfa*, *Hand2*, *Mef2c*, *Gata4*, *Bmp4* and *Tbx5* was deregulated due to maternal diabetes. The expression of *Hand2*, *Nkx2.5*, *Gata4*, *Vegfa* and *Isl1* was significantly affected by the combination of the global reduction of *Hif1 α* gene and maternal diabetes in the embryonic hearts. These results confirmed initial hypothesis that maternal diabetes deregulates transcriptional program in the embryonic heart and affects the expression of genes involved in the HIF-1 signaling in the developing embryos. Our analysis showed that partial HIF-1 α deficiency alters gene expression in the developing heart and increases susceptibility to congenital defects in a mouse model of diabetic pregnancy.

Key words: diabetic embryopathy, gene expression, *Hif1 α* , *Vegfa*, *Wt1*, *Hand1*, *Hand2*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Gata4*, *Bmp4*, *Tbx5*

Abstrakt

Diabetická embryopatie je jednou z vážných komplikací spojených s diabetem. Je známo, že maternální diabetes zvyšuje četnost vrozených defektů až desetkrát. Nejčastějšími defekty jsou kardiovaskulární defekty a defekty neurální trubice. Molekulární mechanismy vzniku diabetické embryopatie stále nejsou známy. Tato práce přispívá k objasnění molekulárních procesů vedoucích ke vzniku kardiovaskulárních defektů v diabetické embryopatii. Studie vychází ze zjištění, že maternální diabetes ovlivňuje transkripční regulaci hypoxií indukovaného faktoru 1 (HIF-1) ve vyvíjejícím se embryu. Pro studium vlivu maternálního diabetu na HIF-1 signální dráhu byl použit myší model heterozygotní pro „knock-out“ *Hif1α* genu. Analýzy ukázaly negativní vliv maternálního diabetu na vývoj embrya a vyšší riziko vzniku diabetické embryopatie u *Hif1α*^{+/-} mutantů v porovnání s *wt* embryi vystavenými diabetickému prostředí. Histologická analýza defektů srdcí v embryonálním dni (E) 14,5 potvrdila zvýšený výskyt kardiovaskulárních defektů, zejména defektů mezikomorového septa a hypoplasii kompaktní stěny levé komory u *Hif1α*^{+/-} embryi ve srovnání s *wt* embryi z diabetických těhotenství. Pro lepší porozumění molekulárních změn byly provedeny qPCR analýzy genové exprese v embryonálním srdci ve věku E9,5 a E10,5. Pro studium změn exprese byly vybrány geny důležité pro vývoj srdce, které jsou zároveň přímými nebo možnými cílovými geny HIF-1 signalizace. Tyto analýzy ukázaly změny v expresi genů důležitých pro celkový vývoj srdce (*Vegfa* a *Wt1*), genů důležitých pro diferenciaci kardiomyocytů (*Nkx2.5* a *Mef2c*), genů důležitých pro specifikaci komor (*Hand1* a *Hand2*), genů důležitých pro proces septace (*Gata4*, *Tbx5* a *Bmp4*) a u genu důležitého pro specifikaci prekurzorových buněk a jejich migraci do srdce (*Isl1*). Embryonální exprese mRNA *Vegfa*, *Hand2*, *Mef2c*, *Gata4*, *Bmp4* a *Tbx5* byla deregulována vlivem maternálního diabetu. Exprese *Hand2*, *Nkx2.5*, *Gata4*, *Vegfa* a *Isl1* byla významně ovlivněna kombinací diabetu a globální redukce *Hif1α* genu v *Hif1α*^{+/-} embryonálních srdcích v porovnání s *wt* sourozenci z diabetických těhotenství. Tyto výsledky potvrzují výchozí hypotézu, že maternální diabetes dereguluje transkripční program v embryonálním srdci a ovlivňuje expresi genů účastnících se HIF-1 signalizace ve vyvíjejícím se embryu. Tyto expresní změny představují molekulární mechanismus, kdy deregulace HIF-1 dráhy může zvyšovat riziko diabetické embryopatie.

Klíčová slova: diabetická embryopatie, exprese genů, *Hif1α*, *Vegfa*, *Wt1*, *Hand1*, *Hand2*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Gata4*, *Bmp4*, *Tbx5*

Obsah

1.	Seznam zkratek	7
2.	Úvod	8
3.	Přehled literatury	9
3.1	Diabetes mellitus	9
3.1.1	Diabetes 1. typu	9
3.1.2	Diabetes 2. typu	9
3.1.3	Gestační diabetes	10
3.1.4	Ostatní specifické typy diabetu	10
3.2	Diabetická embryopatie	10
3.3	Hypoxií indukovaný faktor 1	11
3.4	Morfologie srdce	13
3.5	Vývoj srdce	14
3.6	Geny důležité pro vývoj srdce	16
3.6.1	<i>Gata4</i>	16
3.6.2	<i>Nkx2.5</i>	17
3.6.3	<i>Bmp4</i>	17
3.6.4	<i>Isl1</i>	18
3.6.5	<i>Mef2c</i>	19
3.6.6	<i>Tbx1</i>	19
3.6.7	<i>Tbx5</i>	20
3.6.8	<i>Hand1</i> a <i>Hand2</i>	20
3.6.9	<i>Wt1</i>	22
3.6.10	<i>Vegfa</i>	22
4.	Cíle práce	24
5.	Materiál a metody	25
5.1	Materiál	25
5.1.1	Komerční soupravy	25
5.1.2	Primery	25
5.1.3	Chemikálie	25
5.1.4	Enzymy	26
5.1.5	Složení použitých roztoků	26
5.1.6	Počítačové programy	26
5.1.7	Modelový organismus myš domácí	28

5.2	Metody	30
5.2.1	Indukce diabetu	30
5.2.2	Izolace embryí ve věku E9,5 a E10,5	30
5.2.3	Izolace DNA a genotypizace	30
5.2.4	Izolace RNA	32
5.2.5	Reverzní transkripce	33
5.2.6	Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase	34
5.2.7	Statistické vyhodnocení	35
5.2.8	Histologická analýza	36
6.	Výsledky	38
6.1	Izolovaná embrya	38
6.2	Izolovaná srdce	42
6.3	Histologická analýza srdcí E14,5	43
6.4	Relativní exprese vybraných kandidátních genů	46
7.	Diskuze	55
8.	Souhrn	61
9.	Seznam použité literatury	62

1. Seznam zkratek

AVS	Síňokomorové septum
<i>Bmp4</i>	Bone morphogenetic protein 4
E	Embryonální den
EMT	Epiteliálně-mezenchymální tranzice
<i>Gata4</i>	GATA binding protein 4
<i>Hand1</i>	Heart and neural crest derivatives expressed transcript 1
<i>Hand2</i>	Heart and neural crest derivatives expressed transcript 2
<i>Hif1</i>	Hypoxý indukovaný faktor 1
<i>Hprt1</i>	Hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase 1
IAS	Mezisíňové septum
<i>Isl1</i>	Islet 1
IVS	Mezikomorové septum
<i>Mef2c</i>	Myocyte-specific enhancer factor 2 c
<i>Nkx2.5</i>	NK class homeodomain protein
OFT	Odtoková část komor
PHF	Primární srdeční políčko
qPCR	Kvantitativní real-time PCR
RT – PCR	Reverzní transkripce
SHF	Sekundární srdeční políčko
STZ	Streptozotocin
<i>Tbx1</i>	T-box 1
<i>Tbx5</i>	T-box 5
<i>Vegfa</i>	Vascular endothelial growth factor A
wt	Divoký typ, „wild type“
<i>Wt1</i>	Wilms tumor 1 homolog

2. Úvod

Diabetes mellitus je jednou z nejrozšířenějších civilizačních chorob. Existuje několik druhů diabetu, které se navzájem liší svou etiologií. Všechny druhy negativně ovlivňují metabolismus cukrů. Diabetická embryopatie představuje jednu z vážných komplikací, které jsou s diabetem spojeny. Její vznik nesouvisí s typem diabetu, kterým těhotná žena trpí. Maternální diabetes, bez ohledu na typ, zvyšuje riziko výskytu malformací až desetkrát. Diabetická embryopatie postihuje všechny tělesné systémy, mezi nejčastější poškození patří kardiovaskulární defekty a defekty nervové trubice. Pro vznik defektů je kritické období prvního trimestru. I při plánovaném těhotenství a optimální těhotenské péči je riziko vzniku defektů dvakrát vyšší u diabetických těhotenství než u těhotenství bez vlivu diabetu. Teratogenní působení maternálního diabetu je připisováno změnám v metabolismu, zvýšené hypoxii a změnám v expresi genů. Jedním z genů se změněnou expresí je transkripční faktor *Hif1α*, který patří mezi hlavní regulátory odpovědi na hypoxii. HIF-1α je kyslíkem regulovanou součástí dimeru hypoxií indukovaného faktoru 1 (HIF-1), který reguluje transkripci mnoha genů. Mezi cílové geny HIF-1 transkripčního faktoru patří také geny účastníci se kardiogeneze.

V této práci byl studován myší model diabetické embryopatie se zaměřením na molekulární změny ve vyvíjejícím se embryonálním srdci. Pro studium signální dráhy HIF-1 byl použit mutant s heterozygotní delecí genu *Hif1α*. Dále byly vybrány geny, které se významným způsobem podílejí na vývoji srdce a jsou přímými nebo možnými cílovými geny HIF-1 regulace. Změny v expresi vybraných genů byly sledovány pomocí relativní kvantitativní polymerázové řetězové reakce („polymerase chain reaction“, qPCR) u embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí. Byly analyzovány dva embryonální věky: embryonální den 9,5 a 10,5 (E9,5 a E10,5), které odpovídají prvnímu trimestru těhotenství u člověka, tedy období, kdy se vrozené vývojové vady zakládají.

3. Přehled literatury

3.1 Diabetes mellitus

Základním rysem této etiopatogeneticky heterogenní skupiny chronických onemocnění je hyperglykemie (Bartoš a kol. 2003). Hyperglykemie vzniká při absolutním nebo relativním nedostatku inzulínu. Jako diagnostická hodnota pro diabetes je stanovena hladina glukózy v celkové krvi na lačno $6,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ a vyšší. Onemocnění je provázeno komplexní poruchou metabolismu cukrů, tuků a bílkovin. Klinický obraz diabetu je pestrým souborem příznaků, které odrážejí průběh a stupeň závažnosti choroby, ale také přítomnost komplikací.

Podle Světové zdravotnické organizace byla v roce 1999 zavedena nová klasifikace, která zohledňuje etiologii onemocnění (WHO 1999). Diabetes mellitus je rozdělován na diabetes 1. typu, diabetes 2. typu, gestační diabetes a ostatní specifické typy diabetu.

3.1.1 Diabetes 1. typu

Tento typ diabetu je způsobován destrukcí β buněk v Langerhansových ostrůvcích pankreatu, která často vede k úplné inzulínové deficienci a plné závislosti na externím podávání inzulínu. Jedná se o autoimunitně podmíněný diabetes, zničení β buněk tedy probíhá na základě autoimunitního procesu. Projevy onemocnění závisí na jeho agresivitě. Při rychlém zničení β buněk se diabetes projevuje v dětství a v dospívání. Proces může probíhat velmi pomalu, takže zbytková sekrece inzulínu brání až několik let rozvoji ketoacidózy. V tomto případě je manifestace typická v dospělosti a onemocnění je někdy nazýváno LADA (z anglického „latent autoimmune diabetes of adults“).

3.1.2 Diabetes 2. typu

Nemocní nejsou životně závislí na externím podávání inzulínu, protože jejich inzulínová deficeience je spíše relativní než absolutní. Toto onemocnění se projevuje v pozdějším věku, nejčastěji po dosažení 40 let, a jeho nástup je pozvolný, bez typických příznaků diabetu. Není jasné, zda je primární poruchou sekrece inzulínu

(hyperinzulinemie či nedostatečná sekrece) nebo inzulinová rezistence. Pro manifestaci diabetu 2. typu jsou nutné obě tyto poruchy, které se navzájem potencují.

3.1.3 Gestační diabetes

Gestační diabetes vzniká, nebo je rozpoznáný, v průběhu těhotenství. Plně se rozvíjí nejčastěji po 20. týdnu těhotenství a po porodu dochází k úpravě metabolismu na normální úroveň. Gestační diabetes má společné znaky s diabetem 2. typu. Projevuje se normálním množstvím inzulinu, případně hyperinzulinemií, a inzulinovou rezistencí. Inzulinová rezistence během těhotenství stoupá, v době manifestace onemocnění dosahuje maxima. Většinou se nejedná o závažnou poruchu, avšak z hlediska příznivého vývoje plodu je nutné sledovat hladinu glukózy a včas zahájit dietu.

3.1.4 Ostatní specifické typy diabetu

Tyto neobvyklé formy diabetu jsou charakterizovány trvalou nebo přechodnou hyperglykemií, která není způsobena diabetem 1. a 2. typu a gestačním diabetem. Mezi nejčastější příčiny vzniku těchto typů diabetu patří chronické choroby exokrinního pankreatu a dále geneticky podmíněné defekty β buněk, abnormality inzulinových receptorů a autozomálně dominantně dědičné defekty glukokinázy.

3.2 Diabetická embryopatie

Je známo, že diabetes v těhotenství má negativní vliv na vývoj plodu, ať už jde o přímé teratogenní účinky, nebo zvýšené riziko onemocnění diabetem v dospělosti (Hod a kol. 2008). Maternální diabetes, bez ohledu na typ, zvyšuje riziko výskytu malformací až desetkrát (Casson a kol. 1997). Za kritické období pro vznik defektů je považován první trimestr. Mezi nejčastější poškození plodu patří kardiovaskulární malformace, defekty nervové trubice a syndrom kaudální regrese. Předchozí studie na myším modelu ukázala jako nejčastější defekty septální defekty, perzistující aortální kmen a defekty endokardiálních polštářků, tedy vývoje chlopní (Kumar a kol. 2007). Mechanismus teratogenního působení stále není přesně znám (Hod a kol. 2008). Za nejvýznamnější spouštěcí činitele jsou považovány hyperglykemie a ketonemie. Teratogenní procesy v embryonální tkáni zahrnují změny v signálních drahách, jako je metabolismus inositolu, sorbitolu, arachidonové kyseliny, reaktivních kyslíkových radikálů, stejně

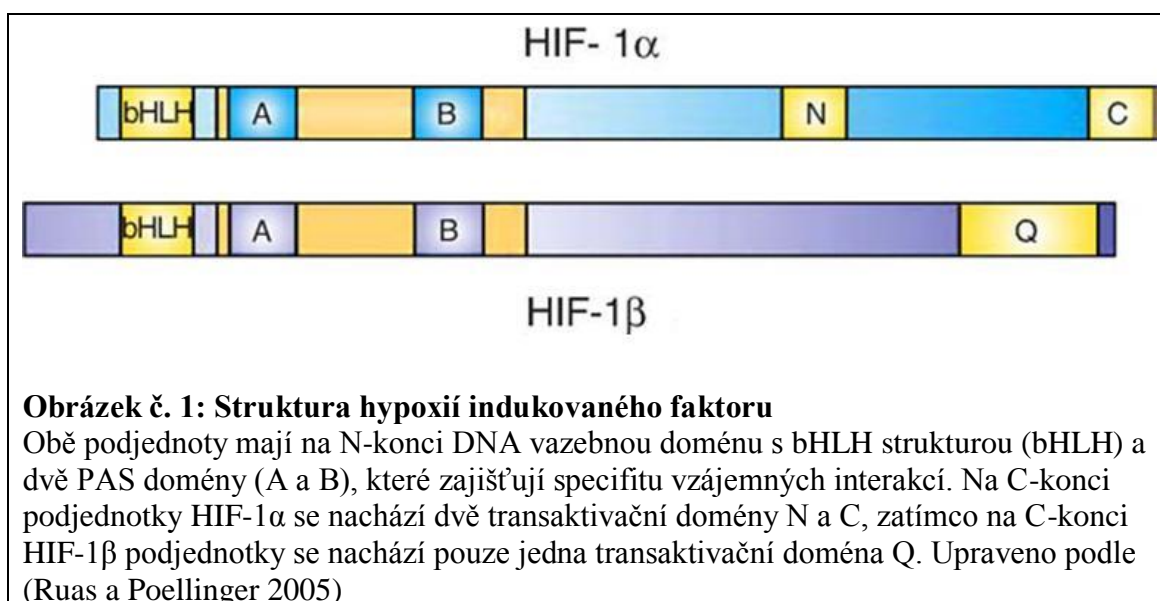
jako změny v aktivaci izoforem proteinkinázy C. Zvýšený metabolismus glukózy způsobuje hypoxii, která sama o sobě může být příčinou stejného typu defektů, které jsou spojovány s diabetickou embryopatií (Li a kol. 2005). Také bylo zjištěno, že maternální diabetes ovlivňuje expresi genů důležitých pro vývoj embrya (Pavlinkova a kol. 2009). Mezi deregulované geny patří *Hif1α* kódující transkripční faktor.

3.3 Hypoxií indukovaný faktor 1

Hypoxií indukovaný faktor 1 (hypoxia inducible factor 1, HIF-1) je heterodimer s funkcí transkripčního faktoru (Wang a kol. 1995). Skládá se z podjednotek HIF-1 α a HIF-1 β . Obě podjednotky mají podobnou strukturu, jak je ukázáno na obrázku č. 1. Každá obsahuje na N-konci DNA vazebnou doménu se základní helix smyčka helix („basic helix loop helix“, bHLH) strukturou a dvě PAS domény, které zajišťují interakci dimerizačních partnerů. Na C-konci podjednotky HIF-1 α se nachází 2 transaktivační domény, zatímco C-konec HIF-1 β podjednotky obsahuje pouze 1 transaktivační doménu. Tyto domény se účastní transkripční regulace. Sestavení heterodimeru je regulováno množstvím kyslíku v buňce (Dunwoodie 2009). Obě podjednotky jsou exprimovány konstitutivně, ale podjednotka HIF-1 α je v přítomnosti normální koncentrace kyslíku (5 %) hydroxylována proteiny s prolyl hydroxylázovou doménou v oblastech N-terminálních a C-terminálních degradačních boxů (Bruick a McKnight 2001). Hydroxylace prolinových zbytků je nezbytná pro vytvoření komplexu s von Hippel-Lindau tumor supresorovým proteinem. Von Hippel-Lindau supresorový protein je komponenta rozpoznávaná E3 ubiquitin ligázou, která zajišťuje ubiquitinylaci HIF-1 α podjednotky a její proteazomální degradaci. Pokud klesne koncentrace kyslíku v buňce pod 5 %, klesá úroveň hydroxylace, dochází k akumulaci HIF-1 α a tvorbě heterodimeru. Ke spojování podjednotek dochází po jejich translokaci do jádra, kde se může heterodimer vázat na DNA.

U savců hraje HIF-1 transkripční systém významnou roli nejen při reakci na fyziologickou a patologickou hypoxii, ale je také nezbytný pro embryonální vývoj (Okazaki a Maltepe 2006). Myší embrya homozygotní pro delecii *Hif1α* nejsou životaschopná v důsledku kardiovaskulárních defektů a defektů nervové trubice se dožívají maximálně věku E11 (Iyer a kol. 1998a; Kotch a kol. 1999; Compennolle a kol. 2003). Tyto studie ukázaly, že HIF-1 α je nezbytný pro vytvoření srdeční kličky a pro migraci a přežití buněk neurální lišty (Iyer a kol. 1998a; Kotch a kol. 1999). Následně

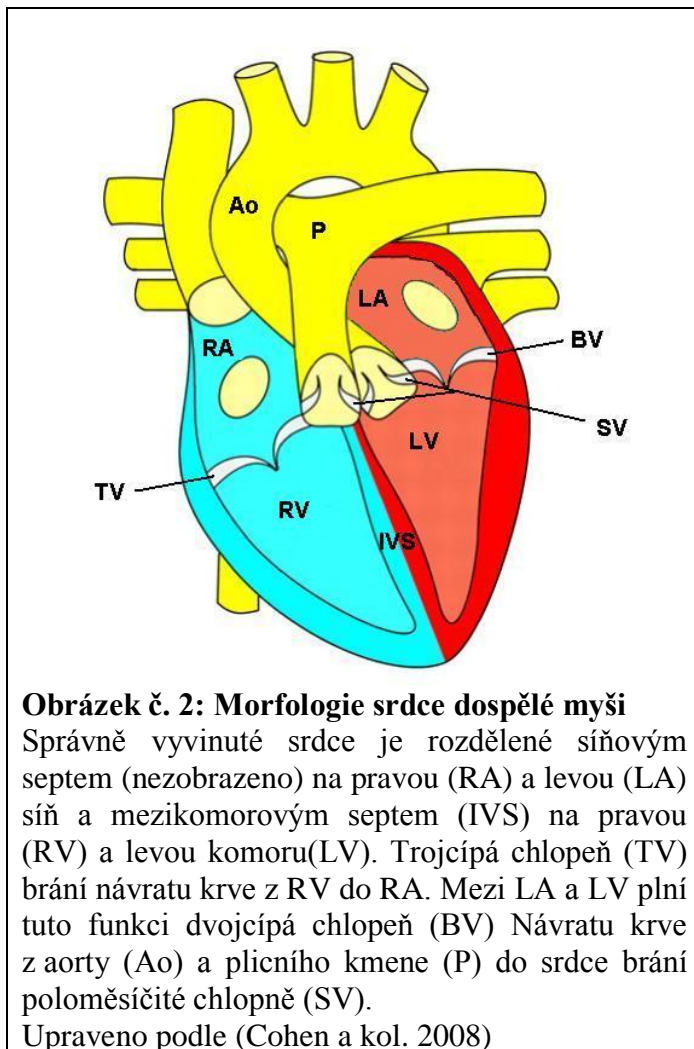
studie na myších embryích s kombinací homozygotní delece *Hif1 α* v kardiomyocytech a globalní heterozygotní delece *Hif1 α* ukázaly, že se srdce vyvíjí abnormálním způsobem a tato embrya umírají ve věku E11,5 v důsledku kontraktilní dysfunkce (Krishnan a kol. 2008). Několik dalších prací potvrdilo, že HIF-1 transkripčně reguluje geny důležité pro kardiovaskulární vývoj. Mezi přímo interagující partnery patří MEF2C, TBX5 (Krishnan a kol. 2008), WT1 (Wagner a kol. 2003) a VEGFA (Manalo a kol. 2005), které jsou regulovány pozitivně. Pravděpodobným cílovým genem HIF-1 regulace je také *Bmp4* (Lenox a kol. 2005). NKX2.5 je také pozitivně ovlivňován HIF-1 (Krishnan a kol. 2008), přímá interakce však dosud prokázána nebyla. Dalším faktorem pozitivně ovlivněným expresí HIF-1 je HAND1 (Compernelle a kol. 2003). Tyto studie jasně ukázaly, že HIF-1 ovlivňuje geny účastnící se kardiogeneze a je nezbytný pro kardiovaskulární vývoj.



3.4 Morfologie srdce

Srdce dospělé myši váží přibližně 0,2 g a má tepovou frekvenci okolo 500 – 600 úderů za minutu (Wessels a Sedmera 2003). Hlavními funkčními buňkami jsou kardiomyocyty, nicméně pro správnou funkci jsou nutné také buňky hladké svaloviny, endotelové buňky koronárních cév a endokardu, fibroblasty a další buňky pojivových tkání a buňky spojené s imunitním systémem (Tirziu a kol. 2010). Srdce se skládá ze tří vrstev: vnitřního endokardu, středního myokardu a vnějšího epikardu (Fox 2007). Epikard představuje tenkou vláknitou vrstvu, která obsahuje malé krevní a lymfatické cévy. Myokardiální vrstva je tvořena kardiomyocyty s centrálně uloženým jádrem. Je bohatě zásobena krví díky tenkostěnným arteriolám, venulám a dobře organizované kapilární síti. Z vnitřní strany je myokard lemován endotelem.

Srdce leží v hrudní dutině a je obklopeno perikardem. Skládá se ze 4 oddílů: 2 síní oddělených svalovým mezisíňovým septem (*septum interatrialis*, IAS) a 2 komor



Obrázek č. 2: Morfologie srdce dospělé myši

Správně vyvinuté srdce je rozdělené síňovým septem (nezobrazeno) na pravou (RA) a levou (LA) síň a mezikomorovým septem (IVS) na pravou (RV) a levou komoru (LV). Trojcípá chlopeč (TV) brání návratu krve z RV do RA. Mezi LA a LV plní tuto funkci dvojcípá chlopeč (BV). Návratu krve z aorty (Ao) a plicního kmene (P) do srdce brání poloměsíčitá chlopeč (SV).

Upraveno podle (Cohen a kol. 2008)

oddělených svalovým mezikomorovým septem (*septum interventricularis*, IVS), jak ukazuje obrázek č. 2. Síňokomorové septum (*septum atrioventricularis*, AVS), které je v lidském srdci patrné jako vazivová membrána, se u myši skládá převážně ze svalové tkáně. AVS se svou větší částí nachází v IAS a odděluje pravou síň od odtokové části levé komory. Síně a komory jsou odděleny cípatými chlopečmi, které brání návratu krve do síní. Mezi pravou síní a pravou komorou se nachází trojcípá chlopeč, mezi levou síní a levou komorou se nachází dvojcípá (mitrální) chlopeč. Proti

cípům chlopní jsou v srdeční stěně umístěny papilární svaly, které za pomoci šlašinek drží cípy chlopní ve správné poloze. V lidském srdci jsou tyto struktury výraznější než v myším srdci (Wessels a Sedmera 2003). Každá komora je rozdělena na část vtokovou a výtokovou. Na vnitřní straně srdeční stěny komor jsou svalové trámce zvané trabekuly, které jsou součástí převodního systému srdečního. V myším srdci se narozdíl od lidského neliší morfologie trabekul pravé a levé komory. Na výstupu z komor se nachází poloměsíčitá chlopně. Pravá poloměsíčitá chlopeň odděluje odtokovou část pravé komory a plicní kmen, levá poloměsíčitá chlopeň odděluje odtokovou část levé komory a aortální kmen. Každá se skládá ze tří poloměsíčitých kapes tvaru vlaštovčího hnízda a brání návratu krve do srdce při roztažení komor.

3.5 Vývoj srdce

Srdce je první funkční orgán ve vyvíjejícím se embryu. Pochází z buněk mezodermálního zárodečného listu (Zaffran a Frasch 2002). Vývoj srdce probíhá v pěti fázích:

1. specifikace prekursorových kardiogenních buněk
2. migrace srdečních prekursorových buněk a fúze krevních ostrůvků
3. rotace srdeční trubice
4. formace srdečních síní a komor
5. septace a formace chlopní

Jako první krok ve vývoji srdce probíhá tvorba prekardiálního mezodermu. Mezodermální buňky vytvořené v rané fázi gastrulace migrují anterolaterálně do dvou bilaterálních kardiogenních oblastí (Lough a Sugi 2000). Diferenciací prekardiogenních mezodermálních buněk se tvoří myokardiální a endokardiální progenitory. V kardiogenní zóně se u myšího embrya tvoří dvě bilaterální oblasti tvaru podkovy, které splynou ve věku E7,5 do útvaru zvaného srdeční srpek. Buňky srdečního srpku tvoří primární srdeční políčko (primary heart field, PHF) a sekundární srdeční políčko (secondary heart field, SHF), které k PHF těsně přiléhá (Harvey a Rosenthal 1999). Z PHF se vytváří levá komora. Ze SHF pochází buňky pravé komory, výtokový trakt (outflow tract, OFT) a buňky, ze kterých se následně vyvíjejí síně.

V myším embryu starém 8 dní materiál srdečního srpku splývá, luminizuje a vytvoří tak ve věku E8,5 bijící lineární srdeční trubici (Zaffran a Frasch 2002).

V lidském embryu tento děj začíná probíhat ve 20. dni vývoje (Čihák a kol. 2004). Porovnání časového průběhu vývoje srdce myši a člověka uvádí tabulka č. 1. Srdeční trubice je tvořena dvěma epiteliálními vrstvami – vnitřním endokardem a vnějším myokardem, mezi nimi je vrstva extracelulární matrix. Kraniální část srdeční trubice je arteriální, kaudální část je venózní. Trubice se v E8,5 – E10,5 esovitě stáčí doprava tak, že z ní nerovnoměrným růstem a lokálními změnami tvaru buněk vzniká srdeční klička. Průběh ohýbání srdeční trubice ukazuje obrázek č. 3. Ve věku E8,5 je srdeční trubice již rozdělena na 3 oblasti: *bulbus cordis* (budoucí pravá komora), primitivní levá komora a síňový oddíl (Savolainen a kol. 2009). V myším organismu je srdce brzy po utvoření lineární trubice osídleno mezenchymálními buňkami, což vede k tvorbě OFT a atrioventrikulárních endokardiálních polštářků, dorzálního mezokardu a základům síňového septa (Kruithof a kol. 2003). OFT se objevuje ve věku E9,5 a vznikají v něm endokardiální polštářky. Endokardiální polštářky se v tomto věku zakládají také v atrioventrikulárním kanálu, který odděluje síňovou a komorovou část srdeční kličky. Endokardiální polštářky tvoří základy septa a chlopní. Ve věku E9,5 je možné rozlišit několik částí: *sinus venosus*, síňovou část a primitivní levou komoru spojenou bulboventrikulárním kanálem s primitivní pravou komorou. Ve věku E10,5 dochází k rozlišení budoucí pravé a levé síně. Proces tvorby myokardu z mezenchymálních buněk začíná ve věku E12. Růst septa a chlopní z endokardiálních polštářků se děje epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT) (Snarr a kol. 2008), tedy procesem, při kterém jsou endoteliální buňky uvolňovány do extracelulární matrix a je měněn jejich transkripční program a tím i fenotyp (Radisky 2005). Septace srdce je dokončena ve věku E14,5.

Tabulka č. 1: Porovnání časového průběhu vývoje člověka a myši ve vybraných stádiích

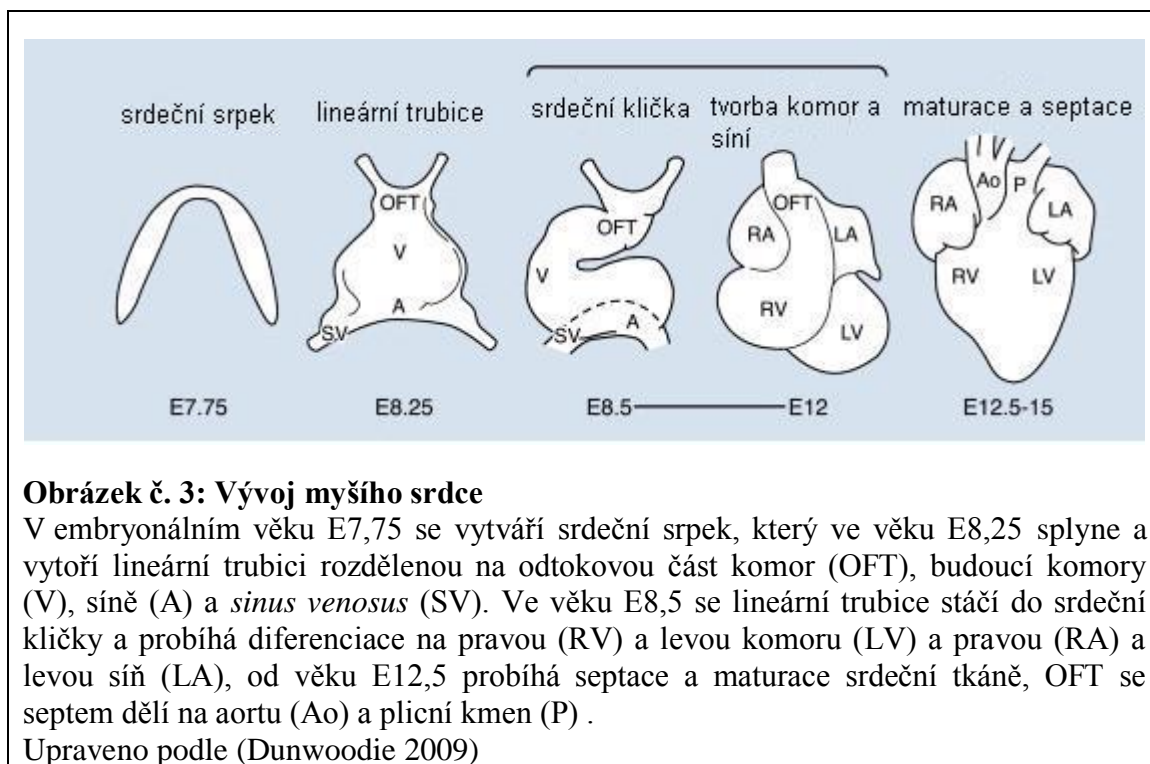
V tabulce jsou uvedena vybraná Carnegieho vývojová stádia a jim odpovídající věk ve dnech od početí. Ve stádiu 8 se tvoří lineární srdeční trubice, ve stádiu 20 je dokončena septace srdce.

Převzato

z

http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Mouse_Timeline_Detailed

stádium	7	8	10	12	14	16	18	20
člověk	15 - 17	17 - 19	22	28	33	40	44	52
myš	7	8	9,5	10,5	11,5	12,5	13,5	14,5



Obrázek č. 3: Vývoj myšního srdce

V embryonálním věku E7,75 se vytváří srdeční srpek, který ve věku E8,25 splyne a vytvoří lineární trubici rozdělenou na odtokovou část komor (OFT), budoucí komory (V), síně (A) a *sinus venosus* (SV). Ve věku E8,5 se lineární trubice stáčí do srdeční kličky a probíhá diferenciaci na pravou (RV) a levou komoru (LV) a pravou (RA) a levou síň (LA), od věku E12,5 probíhá septace a maturace srdeční tkáně, OFT se septem dělí na aortu (Ao) a plicní kmen (P).

Upraveno podle (Dunwoodie 2009)

3.6 Geny důležité pro vývoj srdce

3.6.1 *Gata4*

Pravděpodobně nejdříve exprimovaným markerem prekurzorů srdečních buněk je transkripční faktor „GATA binding protein 4“ (*Gata4*). (Molkentin 2000). GATA4 patří do rodiny proteinů s DNA vazebnou doménou skládající se ze dvou motivů zinkového prstu, jejíž cílové místo má nukleotidovou sekvenci (A/T)GATA(A/G). Expresi mediátorové RNA (mRNA) *Gata4* během embryonálního vývoje byla pozorována v srdci, proximálním a distálním trávicím traktu, varlatech, vaječnicích, játrech, viscerálním endodermu a parietálním endodermu. U myších embryí homozygotních pro delecí genu *Gata4* se nevytvářela lineární srdeční trubice a embrya umírala krátce po E8,5 (Kuo a kol. 1997). Pokusy s buněčnými kulturami *in vitro* ukázaly, že zvýšená exprese GATA4 urychluje diferenciaci buněk v kardiomyocyty a také zvyšuje proliferaci buněk (Grepin a kol. 1997). GATA4 však není nezbytný pro specifikaci kardiomyocytů (Molkentin a kol. 1997). Myší embrya se specifickou delecí *Gata4* v buňkách odvozených z endotelu měla defekty chlopní a septace, protože neprobíhala EMT (Rivera-Feliciano a kol. 2006). Defekty septace a chlopní měla v heterozygotním stavu za následek také záměna aminokyseliny glycinu na pozici 296

za serin, vedoucí ke snížení transkripční aktivity GATA4 (Misra a kol. 2012). V homozygotním stavu se mutace projevila embryonální letalitou v E11,5. Embrya měla tenčí stěnu komor a byla u nich detekována snížená proliferace kardiomyocytů. Tyto výsledky naznačují, že GATA4 se při vývoji srdce účastní EMT a ovlivňuje proliferaci buněk.

3.6.2 *Nkx2.5*

Dalším z raně exprimovaných genů je homeoboxový gen „NK class homeodomain protein“ (*Nkx2.5*). Transkripty *Nkx2.5* byly detekovány v tkáních myších plodů i dospělých jedinců (Lints a kol. 1993). Prvními pozorovanými buňkami exprimujícími NKX2.5 byly prekurzory kardiomyocytů ve věku E7,5. Tato exprese o několik hodin předcházela myogenní markery a je tedy pravděpodobné, že gen *Nkx2.5* předurčuje vývoj a/nebo diferenciaci buněk myokardiální linie. Pokusy s *in vitro* kultivací buněk, které v srdci exprimovaly NKX2.5, ukázaly jeho možnou úlohu při určení osudu prekurzorů myocytů (Wu a kol. 2006). Buňky izolované ze srdce embryí E9,5 se během následné kultivace *in vitro* diferencovaly v buňky srdeční svaloviny nebo v buňky hladké svaloviny. Delece *Nkx2.5* však ukázaly, že tento gen není nezbytný pro vývoj buněčné linie kardiomyocytů (Tanaka a kol. 1999). Myší embrya heterozygotní pro kompletní delecí *Nkx2.5* se vyvíjela normálně, v homozygotním stavu se delece projevila zastavením vývoje srdce a embryonální letalitou do věku E10,5. Bylo pozorováno, že exprese NKX2.5 je nutná pro iniciaci ohýbání srdeční trubice a tvorbu endokardiálních polštářků (Lyons a kol. 1995). Delece *Nkx2.5* výrazně snížila expresi lehkého myosinového řetězce 2v, který je u *wt* embryí exprimován v oblasti komor. Tyto výsledky poukazují na možnou roli NKX2.5 ve specifikaci komor.

3.6.3 *Bmp4*

Rodina genů *Bmp* („Bone morphogenetic protein“) je nezbytná pro správný vývoj celého embrya (Uchimura a kol. 2009). Jedním z nejlépe prostudovaných genů z této rodiny je *Bmp4*. V srdci myšího embrya se exprese BMP4 objevuje ve stáří E8,5 v sinu venosu a OFT, v jehož derivátech přetrvává až do porodu (Jiao a kol. 2003). Ve věku E9,0 se vyskytuje exprese v oblastech, kde se začíná tvořit síňové septum a endokardiální polštářky. Myší embrya s kompletní delecí genu *Bmp4* umírala ve stáří E6,5 až E9,5 (Winnier a kol. 1995). Studie delecí genu *Bmp4* v srdci myších embryí

ukázala jeho důležitou úlohu při septaci srdce a tvorbě chlopní (Jiao a kol. 2003). Delece v celém organismu v heterozygotním stavu i delece specifická pro kardiomyocyty v homozygotním stavu vedla k abnormalitám mezikomorového septa a inkompletním defektům atrioventrikulárního kanálu (kanál je v různém stupni naznačeného rozdělení). Kompletní delece specifická pro kardiomyocyty na pozadí haploinsuficientní exprese v celém organismu vedla ke kompletním defektům atrioventrikulárního kanálu (dochází k míšení krve ze všech dutin). V endokardiálních polštářcích byla detekována snížená proliferace buněk. Stupeň závažnosti defektů v závislosti na genetickém pozadí naznačuje závislost septace srdce na dávce BMP4. Ve shodě s tímto pozorováním je i hyperplazie srdečních chlopní způsobená inaktivací *Smad6*, inhibitoru specifického pro geny rodiny *Bmp* (Galvin a kol. 2000). Tyto výsledky ukazují na přísně regulovanou úlohu BMP4 při tvorbě septa a chlopní z endokardiálních polštářků.

3.6.4 *Isl1*

Jedním z prvních genů exprimovaných buňkami SHF je transkripční faktor se dvěma N-terminálními LIM doménami a jednou C-terminální homeodoménou: „Islet 1“ (*Isl1*) (Cai a kol. 2003). Pokusy na myších embryích dokázaly, že ISL1 je nezbytný pro migraci progenitorových buněk do srdce. Analýza buněčných linií ukázala, že buňky, které v SHF exprimovaly ISL1, tvoří později velkou část OFT, pravé komory, síní, a dorzální část levé komory. Exprese ISL1 ve vyvíjejícím se srdci byla ve shodě s touto analýzou (Sun a kol. 2007). Ve stádiu E8,5 byla exprese ISL1 proteinu detekována v OFT a části pravé síně. Migrace progenitorových buněk do srdeční trubice podle této studie ustala ve stádiu E9,0. U embryí homozygotních pro „knock-out“ genu *Isl1* byl pozorován opožděný vývoj a embryonální letalita v E10,5 (Cai a kol. 2003). Ve věku E9-E9,5 byly pozorovány vážné abnormality při vývoji srdce, které bylo na první pohled špatně tvarované a nestočené. Mutantní embrya dále postrádala pravou komoru a OFT. Heterozygotní mutanti přežívali bez zjevného fenotypu. Exprese ISL1 je nutná ke specifikaci prekurzorových buněk v SHF a jejich přispění k tvorbě srdce.

3.6.5 *Mef2c*

Přímým cílovým genem ISL1 v SHF je „myocyte-specific enhancer factor 2 c“ (*Mef2c*), člen rodiny genů s konzervovanou MADS doménou (Dodou a kol. 2004). MEF2C protein má specifickou DNA vazebnou funkci rozpoznávající konzervovaný úsek bohatý na A-T páry, který se nachází v regulační oblasti mnoha genů specifických pro svalovou tkáň (Gossett a kol. 1989). MEF2C vazebná místa byla nalezena u mnoha genů srdeční svaloviny, což naznačuje, že MEF2C je nezbytný pro jejich transkripci v srdeční svalovině, a pomáhá diferenciaci svalových buněk (Zhu a kol. 1991). Během myšího embryonálního vývoje byla pozorována lokalizace proteinů MEF2C především v srdci a somitech (Subramanian a Nadal-Ginard 1996). V srdcích myších embryí starých E8,5 byl MEF2C detekován především v OFT. Ode dne E9,5 byla pozorována zvýšená exprese MEF2C v OFT a byla detekována také v komorách. Ve věku E11 byl pozorován pokles množství exprimovaného MEF2C. „Knock-out“ mutace *Mef2c* u myši měla za následek embryonální letalitu ve věku E10,5 (Lin a kol. 1997). Srdce mutantních embryí se nestáčela do srdeční kličky a chyběla budoucí pravá komora. Byly pozorovány kardiovaskulární defekty spojené se zvýšeným množstvím extracelulární matrix, změnami tvaru a nahodilou orientací endoteliálních buněk v endokardu, rozšířením cév a snížením jejich množství (Bi a kol. 1999). MEF2C napomáhá specifikaci a diferenciaci svalových buněk.

3.6.6 *Tbx1*

Negativním regulátorem MEF2C je transkripční faktor s konzervovanou T-box doménou: T-box 1 (*Tbx1*) (Pane a kol. 2012). TBX1 hraje významnou úlohu při vývoji OFT a septaci srdce (Zhang a Baldini 2008). Pozorovaná exprese TBX1 se u myši ve věku E7,5 částečně překrývala s expresí NKX2.5 (Brown a kol. 2004). Ve věku E8,5 nebyla pozorována exprese TBX1 v srdeční trubici, jeho exprese byla detekována v oblasti žaberních oblouků a hlavového mezenchymu. V srdci embrya starém E9,5 dne byl TBX1 exprimován v budoucí pravé komoře a OFT. V embryonálním věku E10,5 byla patrná exprese v oblasti budoucího mezikomorového septa, v E14,5 byla detekována i v části levé komory. Funkce *Tbx1* je závislá na jeho množství (Liao a kol. 2004). Delece *Tbx1* měla v homozygotním stavu za následek perzistující aortální kmen, v heterozygotním stavu byl pozorován zvýšený výskyt poruch aortálního oblouku a Fallotovy tetralogie. Zvýšená exprese TBX1 měla za následek také poruchy vývoje

aortálního oblouku a perzistující aortální kmen. TBX1 je tedy důležitý zejména při tvorbě OFT a jeho derivátů.

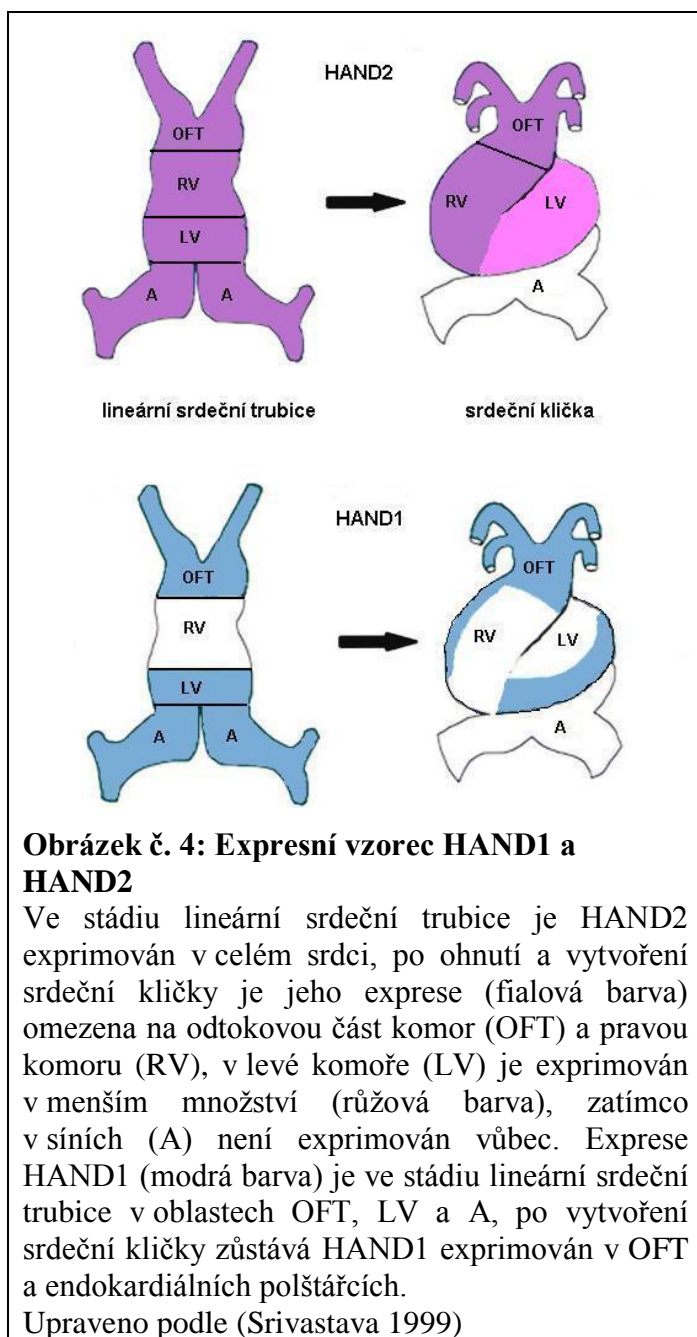
3.6.7 *Tbx5*

T-box 5 (*Tbx5*) je dalším genem z rodiny T-box transkripčních faktorů. U člověka je spojován s Holt-Oramovým syndromem, jenž je charakterizován defekty končetin a srdce, nejčastěji defekty septace (Li a kol. 1997). Exprese TBX5 byla u myších embryí detekována v srdečním srpku v E7,5 spolu s expresí NKX2.5 (Liberatore a kol. 2000). Během diferenciací srdeční trubice bylo pozorováno omezení exprese TBX5 na posteriorní segment, který dává vznik síním a *sinus venosus*. Během ohýbání srdce ve stadiu E8,5 – E9 bylo detekováno rozšíření exprese TBX5 anteriorně do oblasti budoucí levé komory (Bruneau a kol. 1999). V ohnutém srdci, kde komory přešly z antero-posteriorního uspořádání do levo-pravého (E9,0), byla exprese TBX5 omezena na levou stranu srdečních komor. V homozygotním stavu měla delece *Tbx5* za následek embryonální letalitu ve stáří E10,5 (Bruneau a kol. 2001). Ve věku E8,5 měla myši embrya s delecí *Tbx5* deformovanou srdeční trubici. Budoucí síně a levá komora byly výrazně hypoplastické, zatímco růst pravé komory a OFT pokračoval až do věku E9,5. Ohýbání srdce u těchto embryí neproběhlo. V heterozygotním stavu způsobovala delece *Tbx5* abnormální rozšíření komor a síní a defekty IAS a IVS. Přísná regulace TBX5 je důležitá pro správný vývoj chlopní a sept, nicméně TBX5 se účastní vývoje celého srdce.

3.6.8 *Hand1* a *Hand2*

Hand1 („heart and neural crest derivatives expressed transcript 1“) i *Hand2* („heart and neural crest derivatives expressed transcript 2“) jsou transkripční faktory s bHLH doménou (Hollenberg a kol. 1995), které mezi sebou vytváří homo- a heterodimery a regulují tak transkripci (Firulli a kol. 2000). Tyto dva geny mají komplementární expresní vzorce, které se navzájem částečně překrývají (Srivastava a kol. 1995), jak ukazuje obrázek č. 4. Exprese HAND1 byla pozorována v oblastech, ze kterých se vyvíjí levá komora a OFT, zatímco exprese HAND2 byla detekována především v oblasti budoucí pravé komory (Srivastava a kol. 1997). Pozorovaná exprese HAND1 a HAND2 je specifická pro levou, respektive pravou komoru, není řízena levo-pravým rozložením (Thomas a kol. 1998).

Hand1 je důležitým genem pro regulaci srdečních prekursorů (Risebro a kol. 2006). Ve stádiu srdeční kličky byla exprese HAND1 pozorována v buňkách odvozených z PHF a SHF. Exprese HAND1 byla pozorována ve vyvíjejícím se srdci a perikardu myšího embrya od E8,5 (Cserjesi a kol. 1995). HAND1 byl exprimován především v oblasti budoucí levé komory, síní a v OFT. V dalších stádiích vývoje byl pozorován pokles exprese HAND1 a její omezení na oblast endokardiálních polštářků



Obrázek č. 4: Expresní vzorec HAND1 a HAND2

Ve stádiu lineární srdeční trubice je HAND2 exprimován v celém srdci, po ohnutí a vytvoření srdeční kličky je jeho exprese (fialová barva) omezena na odtokovou část komor (OFT) a pravou komoru (RV), v levé komoře (LV) je exprimován v menším množství (růžová barva), zatímco v síních (A) není exprimován vůbec. Exprese HAND1 (modrá barva) je ve stádiu lineární srdeční trubice v oblastech OFT, LV a A, po vytvoření srdeční kličky zůstává HAND1 exprimován v OFT a endokardiálních polštářcích.

Upraveno podle (Srivastava 1999)

(E13,5) a poté chlopní (E14,5).

Kompletní delece *Hand1* měla za následek ranou embryonální letalitu způsobenou extraembryonálními defekty (Riley a kol. 1998). Pomocí tetraploidní agregace byly kompenzovány extraembryonální defekty a bylo umožněno pozorovat defekty v srdci. Ve věku E9,5 bylo u homozygotních mutantů pozorováno selhání ohýbání, defektní rozdělování síní a komor a absence trabekul.

Exprese HAND2 byla ve vyvíjejícím se srdci myšího embrya pozorována také ode dne E8,5 (Srivastava a kol. 1995). Specifikace expresního vzorce byla pozorována během ohýbání srdeční trubice a HAND2 byl detekován především v oblasti budoucí pravé komory (Srivastava a kol. 1997). Od věku E10,5 byl HAND2 v srdci

pozorován v menší míře. Delece *Hand2* měla za následek embryonální letalitu ve stádiu E10,5 (Srivastava a kol. 1997). Srdce mutantních embryí se morfoloicky vyvíjela normálně až do stádia lineární trubice, po začátku ohýbání bylo pozorováno vytvoření

pouze levostranné komory a rozšíření aorty, které postupovalo až do vytvoření balónovité struktury. Geny *Hand1* a *Hand2* jsou hrají významnou roli zejména ve specifikaci komor.

3.6.9 *Wt1*

„Wilms‘ tumor 1“ (*Wt1*) je tumor supresorový gen, jehož mutace způsobují nádory ledvin (Scholz a Kirschner 2005). *Wt1* je důležitý také pro vývoj srdce, zejména epikardu. *In situ* hybridizace odhalila silnou expresi WT1 v proepikardu srdce myších embryí starých E9,5 (Rudat a Kispert 2012). Dále byl WT1 detekován v několika epikardiálních buňkách, které osídlily myokard v atrioventrikulárním sulku. Ve věku E14,5 byl pozorován WT1 v celé epikardiální vrstvě, v mezikomorovém septu a v subepikardu a myokardu komor. WT1 se pravděpodobně účastní EMT, během které vzniká subepikard (Moore a kol. 1999). Kompletní delece *Wt1* vedla k embryonální letalitě okolo E13. Tato embrya měla malformovaná srdce se ztenčenou stěnou komor, nesouvisle se vyvíjejícím epikardem a redukováným subepikardem (Kreidberg a kol. 1993). Epikardiálně podmíněný „knock-out“ *Wt1* genu vedl k embryonální letalitě ve věku E16,5 – E18,5 na následky srdečního selhání (Martinez-Estrada a kol. 2010). U některých mutantních embryí byla pozorována v porovnání s *wt* („wilde type“, divoký typ) embryi tenčí srdeční stěna pravé komory s perikardiální krvácením a koronární cévy nebyly vytvořeny. WT1 se účastní především tvorby epikardu a koronárních cév.

3.6.10 *Vegfa*

VEGFA (vascular endothelial growth factor A) je klíčovým regulátorem vaskulogeneze, tedy vzniku cév z krevních ostrůvků a jejich dalšího růstu. Sestříhem vzniká nejméně 12 izoform, některé mají pro-angiogenní účinky a některé izoformy mají anti-angiogenní účinky (Nowak a kol. 2008). Tyto dvě rodiny izoform se liší svými C-konci.

Transkripty VEGFA byly v myších embryích detekovány ve dni E7,0, v myokardu pak ve stáří E8,5 (Dumont a kol. 1995). VEGFA je nezbytný pro vývoj myšího embrya, jak ukázaly pokusy s delecí genu *Vegfa*, ztráta jediné alely vedla k embryonální letalitě mezi dny E11 a E12 (Carmeliet a kol. 1996). Embrya byla nekrotická s abnormálně vyvinutými cévami. V homozygotním stavu se delece projevovала výraznějšími defekty stejného typu. Delece *Vegfa* specifická pro

kardiomyocyty měla za následek embryonální letalitu s variabilní penetrancí (Giordano a kol. 2001). Srdce embryí s delecí *Vegfa* měla dilatované komory s tenčí stěnou a sníženou kontraktilní funkci. Podobně zvýšení exprese VEGFA vedlo k embryonální letalitě ve dni E12,5 (Miquerol a kol. 2000). Srdce těchto embryí byla abnormálně velká s tenkou stěnou komor, větším množstvím trabekul a defekty septace. Tyto výsledky ukazují na nutnost přísné regulace *Vegfa* během embryonálního vývoje.

4. Cíle práce

Výchozí hypotézy diplomové práce:

- 1) Diabetes v těhotenství dereguluje genovou expresi během embryonálního vývoje a tím negativně ovlivňuje vývojové procesy a zvyšuje riziko vzniku vývojových defektů, zejména kardiovaskulárních defektů.
- 2) HIF-1 transkripční regulace je změněna u embryí ovlivněných diabetem a tato deregulace vede ke vzniku diabetické embryopatie.
- 3) Snížená exprese HIF-1 α u heterozygotních embryí pro delecí genu *Hif1 α* zvyšuje riziko vývojových vad u těchto embryí vystavených diabetickému prostředí.

Výchozí hypotézy diplomové práce jsou podloženy předchozími výsledky:

- 1) Maternální diabetes významně ovlivňuje transkripční profil embryí (Pavlinkova a kol. 2009).
- 2) Maternální diabetes dereguluje HIF-1 signální dráhu ve vyvíjejícím se embryu a zvyšuje riziko diabetické embryopatie (Pavlinkova a kol. 2009; Bohuslavova a kol. 2013).
- 3) Kompletní delece genu *Hif1 α* má za následek kardiovaskulární defekty a defekty nervové trubice, což jsou nejčastější defekty diabetické embryopatie (Iyer a kol. 1998a).
- 4) Maternální diabetes vyvolává u embryí stav podobný hypoxii (Li a kol. 2005).

Hlavním cílem diplomové práce byla především analýza HIF-1 signální dráhy a její úlohy při vzniku diabetické embryopatie.

Cíle:

1. **Morfologické posouzení embryonálního vývoje.**
2. **Zjištění změn exprese vybraných genů v srdeční tkáni pomocí qPCR.**
3. **Identifikace indikačních genů pro specifické abnormality v kardiovaskulárním vývoji.**

5. Materiál a metody

5.1 Materiál

5.1.1 Komerční soupravy

- JumpStart™ Taq DNA Polymerase, Sigma
- SYBR®Green JumpStart™ Tag ReadyMix™, Sigma
- RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis Kit, Fermentas

5.1.2 Primery

Seznam použitých primerů je uveden v tabulce č. 2.

5.1.3 Chemikálie

- Agarosa, Sigma
- Citrátový pufr 20mM, Sigma
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), Penta
- Dimehtylsulfoxid (DMSO), Sigma
- Disodná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), Sigma
- DPX „Mountant for histology“ směs distyrenu, změkčovače (dibutylftalát) a xylenu (z anglického „distyrene, plasticizer, xylene“), Sigma
- dNTP Mix (10mM), Fermentas
- Dodecylsulfát sodný (SDS), Sigma
- „Eosin G o Y“ ethanolový roztok, Bamed
- Ethidium bromid, Sigma
- Ethylakohol (ethanol), Penta
- GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas
- Glykogen 20 mg/ml, Sigma
- Hematoxylin, Bamed
- Hydrogenfosforečnan sodný, (Na_2HPO_4), Penta
- Chlorid draselný (KCl), Penta
- Chlorid sodný (NaCl), Penta

- Izopropylalkohol (izopropanol), Penta
- Kyselina boritá (H_3BO_3), Sigma
- Kyselina chlorovodíková
- Paraformaldehyd (PFA), Sigma
- RediLoad, Invitrogen
- Streptozocin (STZ), Sigma
- Tris, Sigma
- Trizol Reagent, Invitrogen
- Voda bez DNáz a RNáz, Sigma
- Xylen, Sigma

5.1.4 Enzymy

- Proteináza K 20 mg/ml, Sigma

5.1.5 Složení použitých roztoků

- Elektroforetický pufr 0,5x TBE:
45 mM Tris, 45 mM H_3BO_3 , 1 mM EDTA, pH 8,0
- Lyzační pufr:
50 mM Tris, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS (w/v), pH 8,0
- PBS pufr:
10 mM Na_2HPO_4 , 150 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4
- Kyselý ethanol:
100 ml 96% (v/v) ethanol, 4 kapky koncentrované HCl

5.1.6 Počítačové programy

- Bio-Rad CFX Manager 3.0
- GraphPad Prism 5.04, GraphPad Software, USA
- ImageJ 1.45s, National Institutes of Health, USA
- LinRegPCR, Heart Failure Research Center, Academic Medical Center, Nizozemsko
- ND-1000 V.3.3.0, NanoDrop Technologies, USA
- NIS Elements D 3.2, Nikon, Japonsko

Tabulka č. 2: Seznam použitých primerů

Název	NCBI Reference Sequence:	Sekvence (5' → 3')	Účel
Neo-F		ACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTG	PCR
Neo-R		GTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAG	
Bmp4-F	NM_007554.2	TAAACCGTCTTGGAGCCTGC	qPCR
Bmp4-R		AATGGCACTACGGAATGGCT	
Gata4-F	NM_008092.3	AATGCGGAAGGAGGGGATTC	qPCR
Gata4-R		CATTGCTGGAGTTACCGCTG	
Hand1-F	NM_008213.2	CAAGCGGAAAAGGGAGTTG	qPCR
Hand1-R		GTGCGCCCTTTAATCCTCTT	
Hand2-F	NM_010402.4	CCTTCAAGGCGGAGATCAAGA	qPCR
Hand2-R		CTGTCCGGCCTTTGGTTTTTC	
Hprt1-F	NM_013556.2	GCTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG	qPCR
Hprt1-R		CCTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT	
Isl1-F	NM_021459.4	CTATTTGCCACCTAGCCACAG	qPCR
Isl1-R		CACAGGGAAATCAGACGTTTT	
Mef2c-F	NM_025282.3	TCCACCTCGGCTCTGTA ACT	qPCR
Mef2c-R		TGAGATAAATGAGTGCTAGTGCAA	
Nkx2.5-F	NM_008700.2	GACGTAGCCTGGTGTCTCG	qPCR
Nkx2.5-R		GTGTGGAATCCGTCGAAAGT	
Tbx1-F	NM_011532.1	CCGGTGAAGAAGAACCCGAA	qPCR
Tbx1-R		CTTCACTTGAACGTGGGGA	
Tbx5-F	NM_011537.3	AATTGAGAACAACCCCTTCG	qPCR
Tbx5-R		CCTGGGAACACAGGATACTC	
Vegfa-F	NM_001025250	ACTGGACCCTGGCTTTACTG	qPCR
Vegfa-R		TGGGACTTCTGCTCTCCTTC	
Wt1-F	NM_144783.2	CACGGCACAGGGTATGAGAG	qPCR
Wt1-R		GTTGGGGCCACTCCAGATAC	

5.1.7 Modelový organismus myš domácí

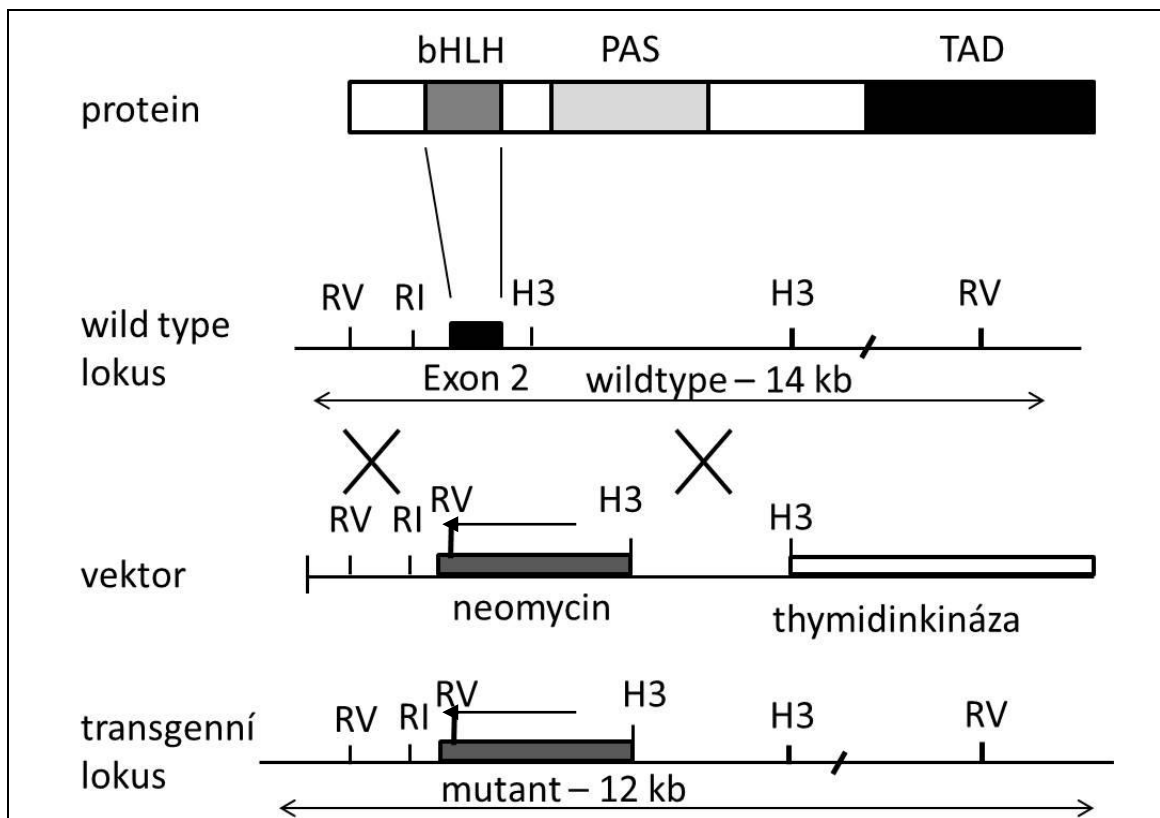
5.1.7.1 Charakteristika modelového organismu

Experimentální práce se zvířaty proběhla v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. ve znění jeho následných novel a vyhlášky č. 39/2009 Sb. Diabetus mellitus byl vyvolán u samic inbredního kmene FVB (číslo 207, Charles River) (*wt*, *Hif1α*^{+/+}). Diabetické a nediabetické samičky byly kříženy se samečkami heterozygotními pro *Hif1α*^{tm1jhu} nulovou alelu (Iyer a kol. 1998b), na FVB geneticky definovaném pozadí. Získaná embrya byla rozdělena do skupin podle věku (E9,5, E10,5), typu pokusu (diabetický, nediabetický) a genotypu (*wt*, *Hif1α*^{+/-}).

Heterozygotní *Hif1α* deficientní myši byly získány od prof. Gregga L. Semenzky z Johns Hopkins University School of Medicine, USA.

5.1.7.2 *Hif1α* nulová alela

Pro studium HIF-1 signální dráhy byla použita embrya heterozygotní pro nulovou alelu *Hif1α*^{tm1jhu} (*Hif1α*^{+/-}). Konstrukce transgenní alely je znázorněna na obrázku číslo 5. Za použití virového vektoru byl v genu *Hif1α* nahrazen exon 2, který je překládán jako bHLH DNA vazebná doména, genem pro rezistenci k neomycinu. Rekombinantní protein tedy postrádá bHLH DNA vazebnou doménu a neplní funkci transkripčního faktoru.



Obrázek č. 5: Konstrukce transgenní alely *Hif1α*^{tm1jhu}

Na obrázku je znázorněna struktura proteinu, „wild type“ lokusu, vektoru a transgenního lokusu. Ve struktuře proteinu jsou důležitými funkčními doménami bHLH a PAS doména, které jsou nutné pro dimerizaci a vazbu na DNA, a transaktivační doména TAD. Ve struktuře DNA reprezentuje exon 2 doménu bHLH. Homologní rekombinací (kříže) byl zaměněn exon 2 za gen pro rezistenci k neomycinu s opačnou orientací směru transkripce (šipka).

Upraveno podle (Iyer a kol. 1998a).

5.2 Metody

5.2.1 Indukce diabetu

Pro sledování vlivu diabetu na embryonální vývoj byly použity myší samičky kmene FVB staré 6 týdnů, kterým byl vyvolán diabetes pomocí dvou intraperitoneálních injekcí streptozotocinu (STZ), který selektivně ničí β buňky v pankreatu. Před aplikací STZ byla samičkám změřena hladina glukózy v krvi odebrané z hlavní ocasní tepny pomocí glukometru Contour TS (Bayer, Švýcarsko) a myši byly zváženy. STZ byl aplikován v množství 100 mg/kg tělesné hmotnosti rozpuštěný v 10mM citrátovém pufru tak, že druhá injekce následovala 1 týden po první injekci. Po 2 týdnech od první injekce byla změřena hladina glukózy v krvi. Za diabetické byly považovány samičky, u nichž byla naměřena hladina glukózy větší nebo rovna 13,9 mmol/l. Jako kontrolní skupina byly použity stejně staré FVB samičky.

5.2.2 Izolace embryí ve věku E9,5 a E10,5

Jako počátek těhotenství byl stanoven den nalezení vaginální zátky. Tento den je označován jako embryonální den 0,5. Těhotné samičky byly v poledne 9., respektive 10. dne po nalezení vaginální zátky zváženy a byla jim změřena hladina glukózy v krvi. Samičky byly usmrceny cervikální dislokací, embryonální vajíčky byly vyjmuty, spočítány a umístěny do ledového PBS. Izolace embryí a zjištění počtu absorbovaných embryí probíhalo okamžitě po vyjmutí embryonálních vajíček pod stereomikroskopem SMZ 1500 (Nikon, Japonsko) v PBS pufru. Část embryonální tkáně byla odebrána pro izolaci DNA. Srdce ve věku E9,5, respektive E10,5 byla umístěna do 100 μ l, respektive 300 μ l Trizolu. Vzorky v Trizolu byly uskladněny v -80 °C.

Velikosti embryí a plochy srdcí byly změřeny pomocí programu NIS Elements D 3.2. Jednotlivé skupiny byly porovnány dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem v programu GraphPad Prism 5.04.

5.2.3 Izolace DNA a genotypizace

Pro zjištění genotypu embryí byla odebrána část embryonální tkáně k izolaci DNA vysrážením izopropanolem z vodného roztoku. Tkáň byla přes noc inkubována s 300 μ l lyzačního pufru a 6 μ l proteinázy K [20 mg/ml] v rotační hybridizační peci

při 55 °C. Zlyzovaná tkáň byla zvortexována a následně centrifugována 12 min při 14 000 g, 18 °C v centrifuze Z216 MK (Hermle, Německo). Supernatant byl přenesen do čisté sterilní mikrozkuhavky. K supernatantu bylo přidáno 300 µl izopropanolu a pomalým převrácením mikrozkuhavky byla vysrážena DNA. Po centrifugaci 1 min při 14 000 g, 18 °C v centrifuze Z216 MK (Hermle, Německo) byla peleta odsolena v 500 µl 70% (v/v) ethanolu a následně odvodněna 500 µl absolutního ethanolu. Peleta DNA byla vysušena a následně rozpouštěna přes noc v termostatu při 55 °C v 50 µl vody. Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru N1000 (NanoDrop Technologies, USA) při 260 nm a měření bylo vyhodnoceno pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0.

Genotypizace byla prováděna pomocí PCR (Mullis a kol. 1986) za použití specifických primerů umožňujících detekci alely *Hif1α^{tm1jhu}*. Primery detekují vložený gen pro rezistenci k neomycinu a jsou uvedeny v tabulce č. 2 pod názvy Neo-R a Neo-F. Reagencie pro PCR jsou uvedeny v tabulce č. 3. Celkový objem reakční směsi byl 25 µl.

Tabulka č. 3: Složení PCR reakční směsi

Složka	V [µl]
10x PCR pufr	2,5
MgCl ₂ (15mM)	1,5
dNTP (10mM)	0,5
Rediload	2,5
primer 1 (10µM)	1
primer 2 (10µM)	1
DMSO	1,25
JumpStart TagDNA Polymerase (2,5 u/µl)	0,15
H ₂ O	13,5
DNA	1,0

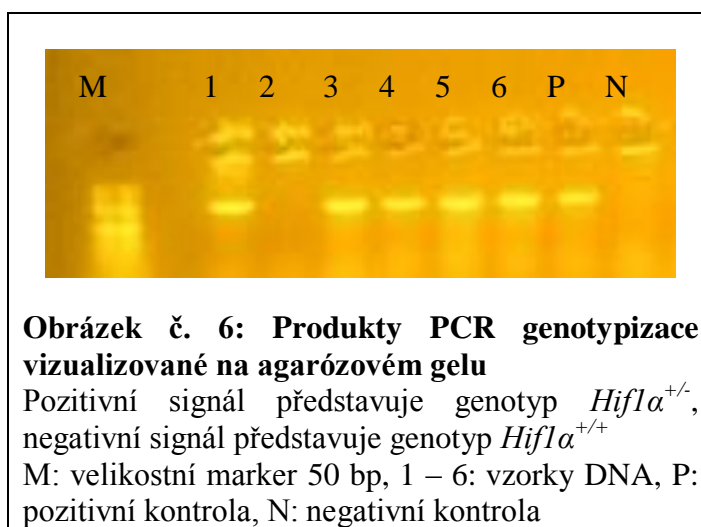
PCR reakce probíhala v termocykleru BIOER (Genepro, Čína) podle protokolu uvedeného v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Schéma PCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Doba [min]	Opakování
aktivace polymerázy	95	5	1
denaturace DNA	95	0,5	
nasedání primerů	63	0,5	34
elongace	72	0,5	
konečná elongace	72	5	1

Produkty PCR reakce byly detekovány pomocí horizontální elektroforézy na 2% (w/v) agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru s přidavkem 5 μ l ethidia bromidu (0,01 μ l/ml). Jako velikostní marker byl použit GeneRuler 50 bp DNA Ladder. Elektroforéza byla prováděna při konstantním napětí 130 V. PCR produkty byly vizualizovány pod UV světlem.

Pozitivní výsledek PCR reakce představuje genotyp *Hif1 α ^{+/-}* a negativní výsledek představuje genotyp *Hif1 α ^{+/+}*, příklad agarózového gelu je na obrázku č. 6.



5.2.4 Izolace RNA

K izolaci RNA byla použita metoda fenol/chloroformové extrakce. Pro získání dostatečného množství RNA pro reverzní transkripci bylo nutné spojit izolovaná srdce embryí E9,5 vždy po dvou na základě stejného genotypu a pouze v rámci jednoho vrhu. RNA ze srdcí věku E10,5 byla izolována jednotlivě.

Zmrazené vzorky v Trizolu byly vytemperovány na 55 °C a poté homogenizovány za pomoci sterilní jehly a injekční stříkačky. V tomto kroku byly vzorky určené ke spojení převedeny do jedné mikrozkušavky. Zhomogenizovaná tkáň byla temperována 3 min při 55 °C a vortexována, tento postup byl 3 krát opakován. Do každé zkumavky byl přidán chloroform v množství odpovídající 1/5 objemu Trizolu, ve kterém byl vzorek homogenizován. Vzorky byly promíchány převrácením 3 krát 15 s a poté inkubovány 5 min při pokojové teplotě a následně centrifugovány 15 min při 14 000 g, 4 °C v centrifuze Z216 MK (Hermle, Německo). Po centrifugaci byla odebrána vrchní vodná fáze obsahující RNA a přenesena do čisté mikrozkušavky. K vodné fázi bylo přidáno 0,5 µl glykogenu o koncentraci 20 mg/ml a izopropanol vytemperovaný na -20 °C v množství odpovídající 1/2 objemu Trizolu, ve kterém byl vzorek homogenizován. Převrácením mikrozkušavky byla vysrážena RNA a vzorky byly inkubovány 30 min v -80 °C. Po skončení inkubace byly vzorky centrifugovány 10 min při 14 000 g, 4 °C v centrifuze Z216 MK (Hermle, Německo). Získaná peleta byla promyta v 500 µl 75% (v/v) ethanolu vytemperovaném na -20 °C a centrifugována 5 min při 7 500 g, 4 °C. Kroky promytí a centrifugace byly opakovány 3 krát. Peleta byla ponechána v 75% (v/v) ethanolu a uskladněna v -80 °C.

5.2.5 Reverzní transkripce

Metoda reverzní transkripce (RT-PCR) umožňuje přepis sekvence RNA do sekvence kódující DNA (cDNA) za pomoci enzymu reverzní transkriptázy.

Mikrozkušavka s peletou RNA v 75% (v/v) ethanolu byla centrifugována 5 min při 7 500 g, 4 °C v centrifuze Z216 MK (Hermle, Německo). Po centrifugaci byl supernatant slit a peleta byla vysušena. RNA byla rozpuštěna ve 12 µl vody. Koncentrace RNA byla změřena pomocí spektrofotometru N1000 (NanoDrop Technologies, USA) při vlnové délce 260 nm a měření bylo vyhodnoceno pomocí počítačového programu ND-1000 V.3.3.0.

RT-PCR probíhala ve dvou krocích v termocykleru BIOER (Genepro, Čína). V prvním kroku byla RNA inkubována s primery 5 min při 65 °C. Složení reakční směsi ukazuje tabulka č. 5. Během inkubace došlo k denaturaci sekundárních struktur RNA. Po ukončení inkubace byla směs rychle ochlazená na ledu, v této fázi došlo k nasednutí primerů na RNA.

Ve 2. kroku reverzní transkripce byla syntetizována cDNA při teplotě 42 °C po dobu 60 min s následnou 5 minutovou inkubací při teplotě 70 °C. Získaná cDNA byla naředěna vodou 20 x a uložena v -80 °C.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro RT-PCR

	Reagencie	Množství (celkový objem 12 µl)
1. krok	RNA	500 ng
	Primer: oligo(dT) ₁₈ (0,5 µg/µl)	1 µl
	Primer: náhodné hexamery (0,2 µg/µl)	1 µl
	Voda	doplněno do 12 µl
	Reagencie	Množství (celkový objem 20 µl)
2. krok	5x reakční pufr	4 µl
	RiboLock RNAs Inhibitor (20 u/µl)	1 µl
	dNTP Mix (10mM)	2 µl
	RevertAid H Minus M-MuLV reverzní transkriptáza (200 u/µl)	1 µl

5.2.6 Kvantitativní polymerázová reakce v reálném čase

Pomocí metody relativní kvantitativní polymerázové reakce v reálném čase („quantitative real time PCR“, qPCR) bylo zjišťováno relativní množství molekul daného genu přepsaných z DNA do RNA. Jako templát pro qPCR byla použita získaná cDNA. Množství cDNA sledovaných genů bylo normalizováno k množství cDNA konstitutivně exprimovaného genu *Hprt1* („hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase 1“).

Reakční směs byla připravena podle tabulky č. 6.

Tabulka č. 6: Reakční směs pro qPCR

Reagencie	Objem [μ l]
cDNA, 20 x	4
Primer F (10 μ M)	0,25
Primer R (10 μ M)	0,25
voda	0,5
2x Syber [®] Green JumpStart [™] Tag ReadyMix [™]	5

Použité primery pro qPCR vybraných genů jsou uvedeny v tabulce č. 2. Reakce probíhala v termocykleru s detekčním systémem pro real time PCR: CFX384 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Biorad, USA) podle schématu uvedeného v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Schéma qPCR reakce

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Doba [s]	Počet opakování
aktivace polymerázy	94	120	1
denaturace	94	15	40
nasedání primerů + elongace	60	60	

5.2.7 Statistické vyhodnocení

Z výsledků qPCR byly programem Bio-Rad CFX Manager 3.0 vypočítány hodnoty C_q („crossing point“). Z technických duplikátů byly vypočítány průměrné hodnoty C_q , které byly normalizovány ke kontrolnímu genu *Hprt1* podle vzorce: $\Delta C_q = C_{q_{gen}} - C_{q_{Hprt1}}$. Tyto hodnoty byly vyhodnoceny v programu GraphPad Prism 5.04 testem analýza rozptylu jednoduchého třídění („one-way ANOVA“) a následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem, při kterém byly porovnávány všechny skupiny se vzorky *wt* nediabetických embryí, tedy kontrolou.

Relativní změna exprese genu byla určena na základě účinnosti (E) reakce qPCR, která byla vypočítána pomocí programu LinRegPCR, a difference (Δ) přechodového bodu (Cq) experimentálního vzorku vůči kontrole podle vzorce č. 1.

$$\text{relativní exprese} = \frac{E_{\text{gen}}^{\Delta Cq \text{ gen (průměr kontrola - průměr EXP)}}}{E_{\text{Hprt1}}^{\Delta Cq \text{ Hprt1 (průměr kontrola - průměr EXP)}}$$

Vzorec č. 1: Výpočet relativní exprese

Kontrola: nediabetický *wt*; EXP: diabetický *wt*, nediabetický *Hif1a*^{+/-}, diabetický *Hif1a*^{+/-}, ΔCq , difference přechodového bodu, E, účinnost reakce

5.2.8 Histologická analýza

5.2.8.1 Příprava řezů

Pro histologickou analýzu řezů hrudníkem byla použita embrya ve věku E14,5. Embrya byla po izolaci fixována ve 4% (w/v) PFA. Následně byla embrya omyta v PBS pufru pro odstranění fixativa z tkáně, odvodněna ethanolovou řadou (25%, 50% a 70% (v/v) ethanol), převedena do xylenu a prosycena parafinem. Odvodnění, převedení do xylenu a prosycení parafinem proběhlo v odvodňovacím tkáňovém automatu ASP 200 (Leica, Německo). Vzorky byly poté zalévány do parafinu pomocí zalévacího automatu EG 1150 (Leica, Německo). Parafinové bločky byly krájeny pomocí mikrotomu RM2255 (Leica, Německo) na řezy o tloušťce 8 μm . Jednotlivé řezy byly napínány na hladině vodní lázně NB-303 (N-Biotek, Korea) vytemperované na 39 °C a přenášeny na podložní skla s nábojem (Superfrost[®] PLUS, Thermo scientific, USA). Konečná fixace řezů na sklech byla provedena inkubací na vyhřívaném napínacím stolku OTS 40 (Medite, Německo) při 42 °C.

5.2.8.2 Barvení a fixace řezů

Před barvením byly řezy zbaveny parafinu postupem uvedeným v tabulce č. 8. Po odparafinování byly řezy barveny hematoxylyn-eosinem dle schématu, které je uvedeno v tabulce č. 9. Po odvodnění tkání (krok 7 až 13 v tabulce č. 9) byly připraveny trvalé preparáty nanesením DPX média a přiložením krycího skla.

5.2.8.3 Histologické vyhodnocení řezů

Na obarvených řezech hrudníkem byla provedena morfologická analýza embryonálního srdce a derivátů OFT. Počty defektů byly statisticky porovnány Fisherovým testem v programu GraphPad Prism 5.04. Pomocí programu ImageJ 1.45s

byl vyhodnocen objem kompaktního myokardu a poměr plochy trabekul na plochu kompaktního myokardu. Pro statistické vyhodnocení byla použita „one-way ANOVA“ s následným dvouvýběrovým nepárovým *t*-testem v programu GraphPad Prism 5.04.

Tabulka č. 8: Postup odparafinování řezů

Číslo kroku	Činidlo (% v/v)	Čas [min]
1	xylén	15
2	100% ethanol	5
3	96% ethanol	5
4	90% ethanol	5
5	80% ethanol	3
6	70% ethanol	5
7	destilovaná voda	∞

Tabulka č. 9: Schéma barvení H-E

Číslo kroku	Činidlo	Čas
1	hematoxilin	40 s
2	tekoucí voda	5 min
3	kyselý ethanol	5 s
4	voda z vodovodu	5 min
5	eosin	5 s
6	destilovaná voda	10 s
7	70% ethanol	10 s
8	80% ethanol	10 s
9	90% ethanol	10 s
10	96% ethanol	10 s
11	100% ethanol	5 min
12	xylén	3 min
13	xylén	3 min

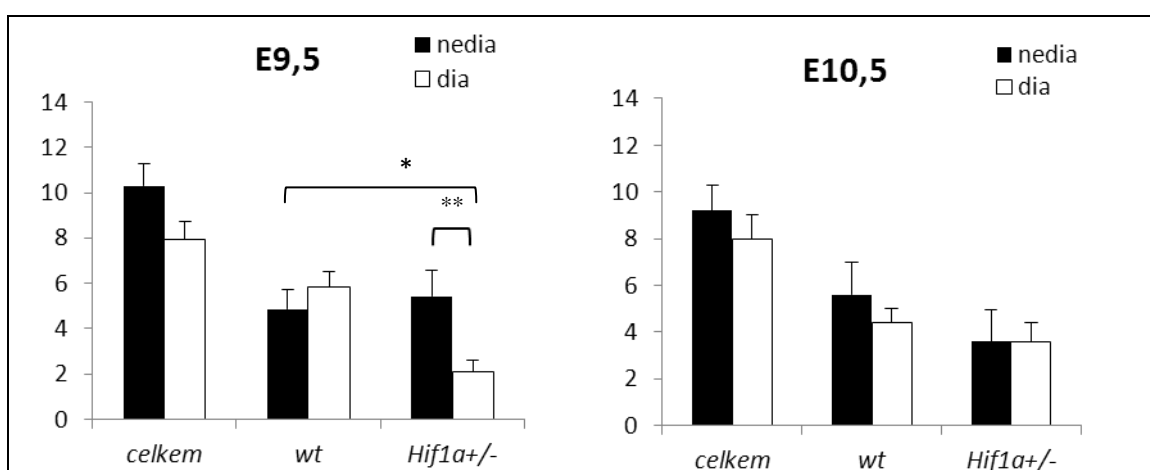
6. Výsledky

6.1 Izolovaná embrya

Ve věku E9,5 bylo získáno celkem 72 embryí ze 7 vrhů neovlivněných diabetem a 87 embryí z 11 diabetických vrhů. Ve věku E10,5 bylo získáno 46 embryí z 5 vrhů bez vlivu diabetu a 40 embryí z 5 vrhů ovlivněných diabetem. Absolutní počty izolovaných embryí a počty embryí rozdělených podle genotypu ukazuje tabulka č. 10. Porovnání průměrného počtu embryí v jednom vrhu ukazují grafy na obrázku č. 7. Negativní vliv diabetu, v kombinaci s vlivem genotypu *Hif1a*^{+/-} byl patrný ve věku E9,5.

Tabulka č. 10: Absolutní počty izolovaných embryí

	Celkem	<i>wt</i>	<i>Hif1a</i> ^{+/-}	Počet vrhů
E9,5 nedia	72	34	38	7
E9,5 dia	87	64	23	11
E10,5 nedia	46	28	18	5
E10,5 dia	40	22	18	5

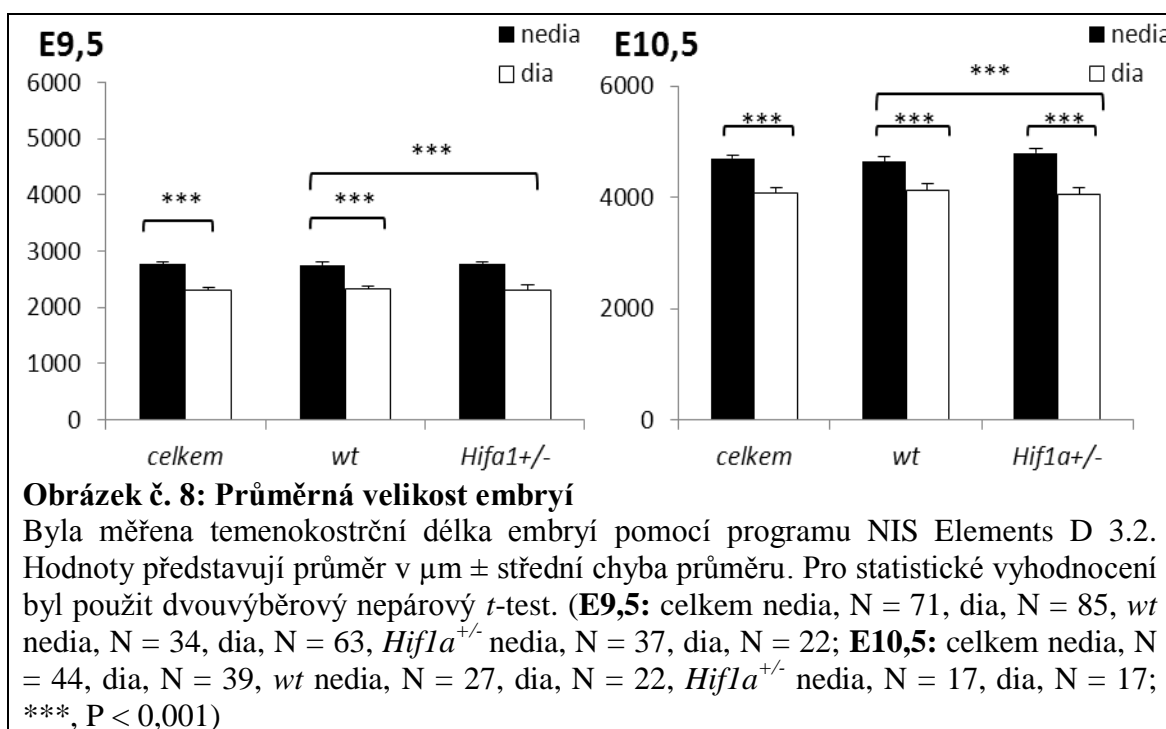


Obrázek č. 7: Průměrný počet embryí v 1 vrhu

Hodnoty představují průměrný počet \pm střední chyba průměru. Pro statistické vyhodnocení byl použit dvouvýběrový nepárový *t*-test. (E9,5: nedia, N = 7, dia, N = 11; E10,5: nedia, N = 5, dia, N = 5, *, P < 0,05, **, P < 0,01)

Pomocí programu NIS Elements D 3.2 byla změřena temenokostrční délka embryí. Průměrnou velikost embryí zobrazují grafy na obrázku č. 8. Ve všech skupinách je patrný trend negativního vlivu diabetu na velikost embryí. Tabulka č. 13 ukazuje počty absorbovaných embryí. Za absorbovaná embrya jsou považována taková, kde byl nalezen pouze prázdný embryonální váček a nebylo možné provést genotypizaci.

Izolovaná embrya byla morfologicky zhodnocena. V tabulkách č. 11 a č. 12 jsou vypsány počty embryí s opožděným a defektním vývojem ve věku E9,5, respektive E10,5. Na obrázku č. 9 jsou příklady embryí s opožděným a defektním vývojem ve věku E9,5. Na obrázku č. 10 jsou příklady embryí s defektním vývojem ve věku E10,5.



Tabulka č. 11: Počty abnormálně se vyvíjejících embryí ve věku E9,5

Hodnoty reprezentují počty embryí s vývojovou abnormalitou/celkový počet embryí ve skupině

E9,5	<i>wt</i>		<i>Hif1a</i> ^{+/-}	
	nedia	dia	nedia	dia
Opožděný vývoj	1/34	7/64	1/38	2/23
Defektní vývoj	0/34	0/64	0/38	1/23

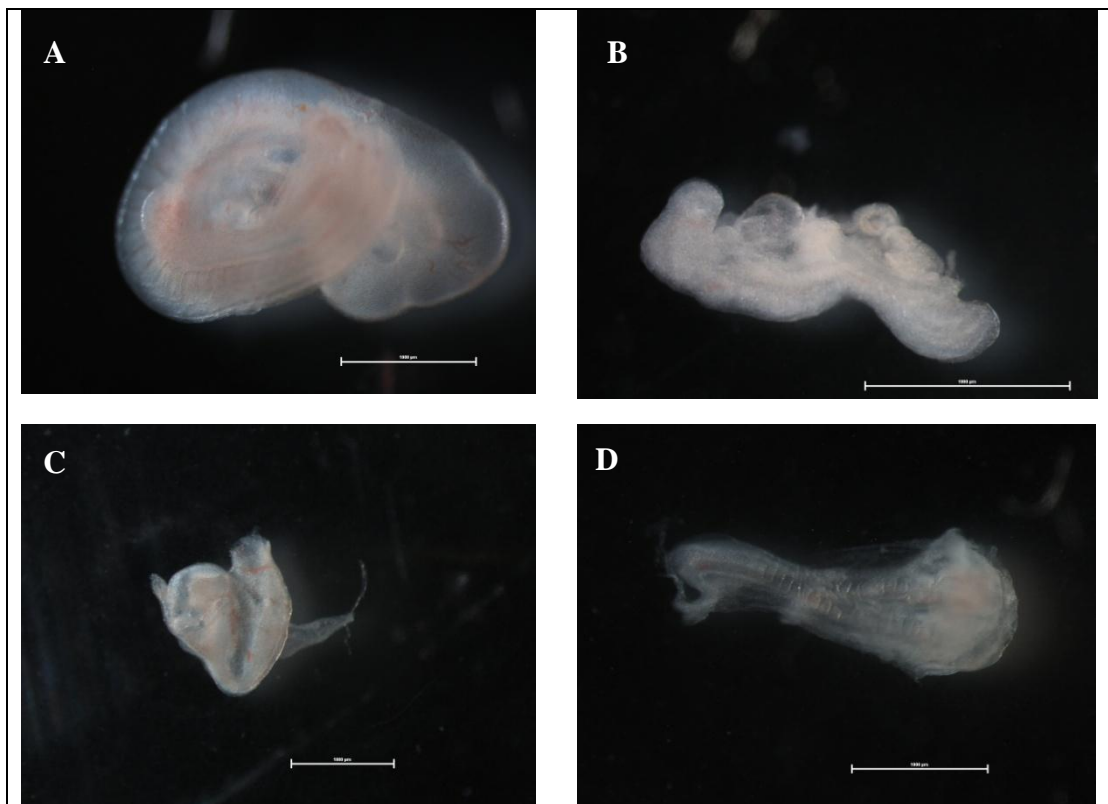
Tabulka č. 12: Počty abnormálně se vyvíjejících embryí ve věku E10,5
Hodnoty reprezentují počty embryí s vývojovou abnormalitou/celkový počet embryí ve skupině

E10,5	<i>wt</i>		<i>Hif1a</i> ^{+/-}	
	nedia	dia	nedia	dia
Opožděný vývoj	0/17	0/22	0/29	0/18
Defektní vývoj	0/17	2/22	1/29	2/18

Tabulka č. 13: Počty absorbovaných embryí

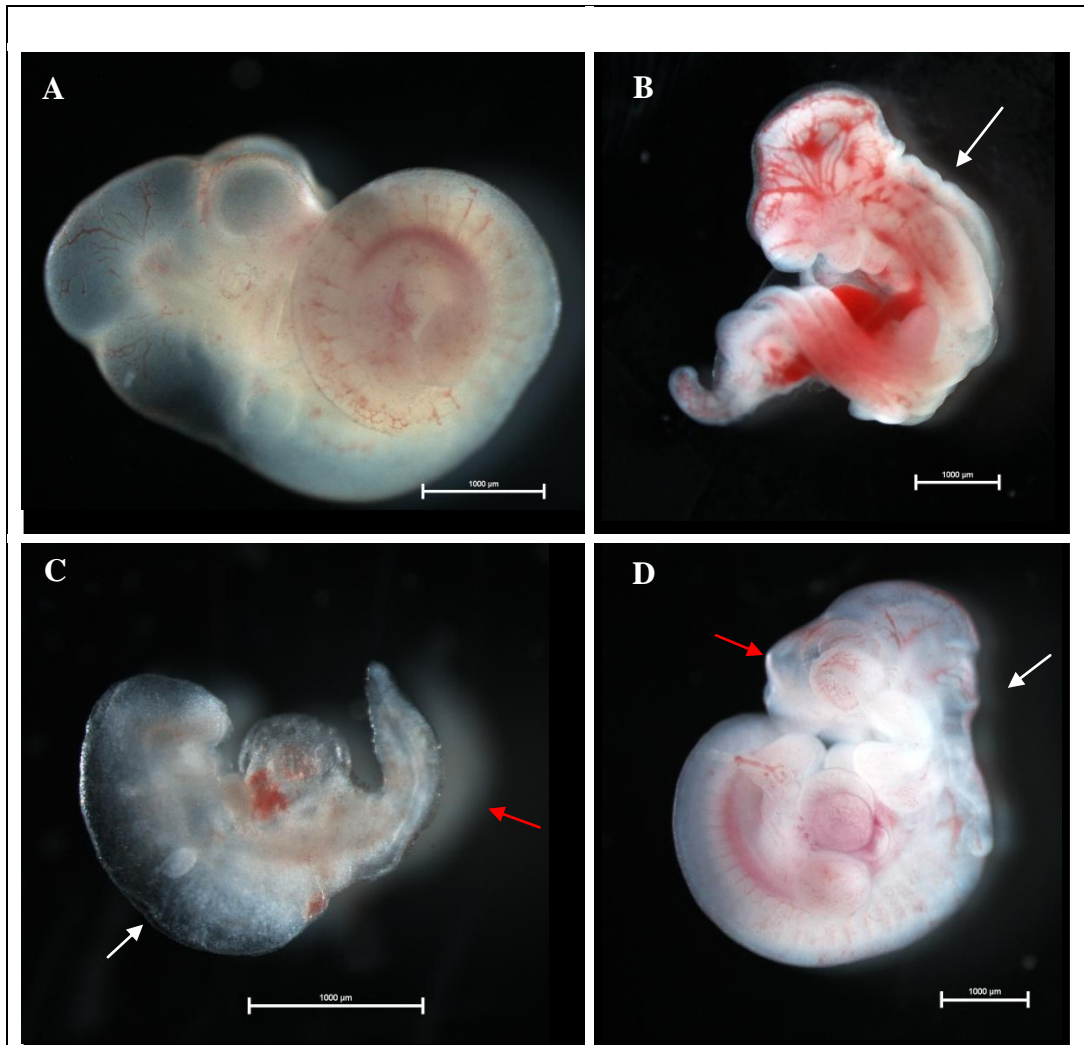
Hodnoty reprezentují absolutní počty absorbovaných embryí/ absolutní počty získaných neabsorbovaných embryí

věk	nedia	dia
E9,5	3/72	26/87
E10,5	1/46	1/40



Obrázek č. 9: Diabetická embryopatie ve věku E9,5

Na obrázku A je normálně se vyvíjející embryo ve věku E9,5, na obrázcích B a C jsou vývojově opožděná embrya, na obrázku D je vývojově defektní embryo. Měřítko představuje 1000 µm.

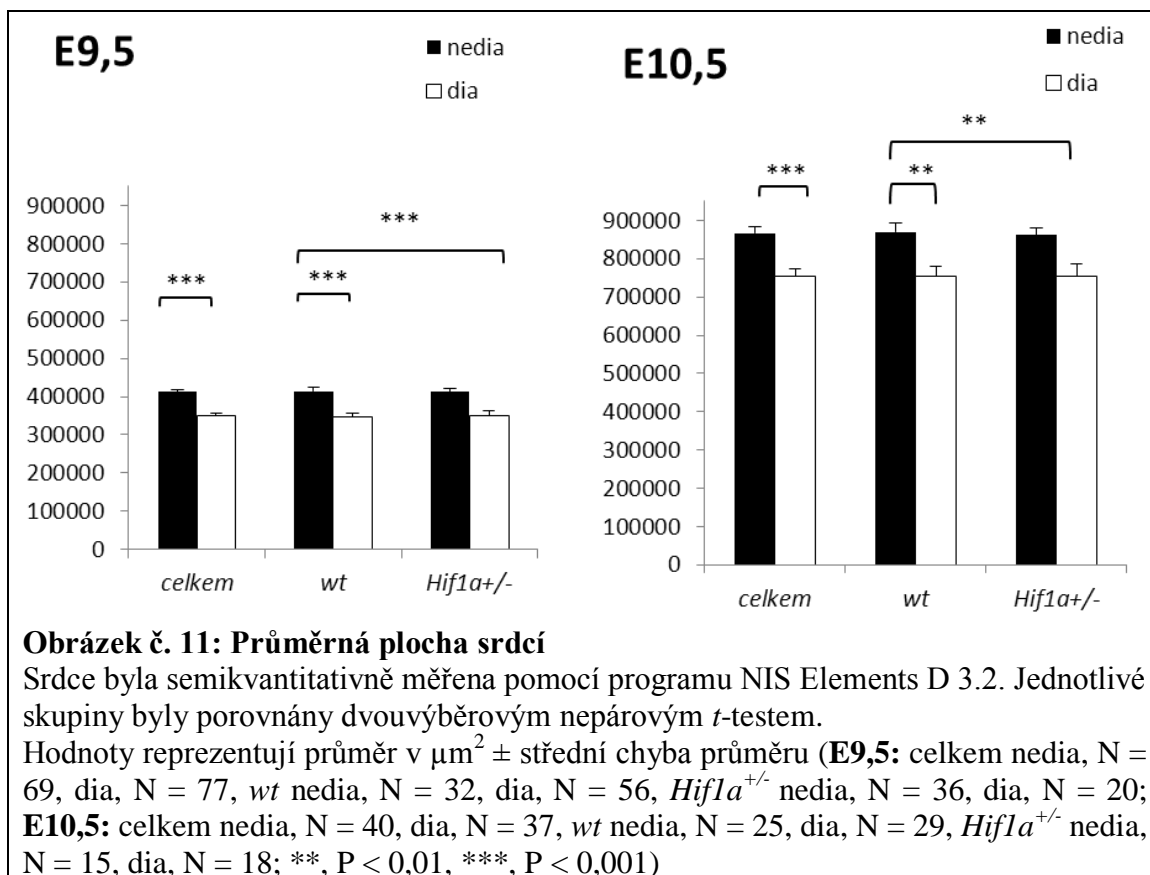


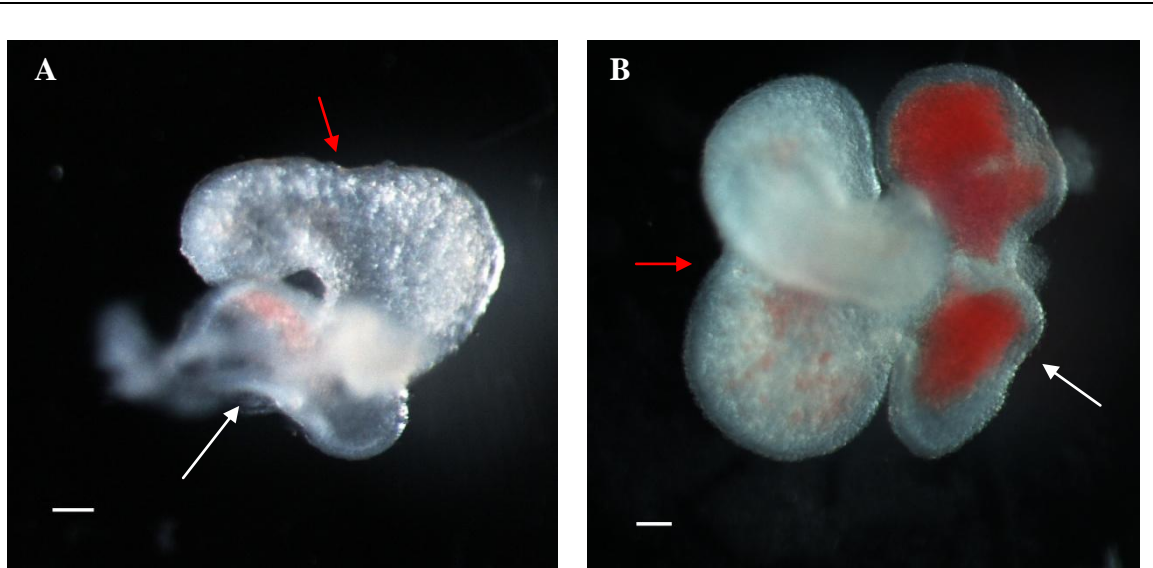
Obrázek č. 10: Diabetická embryopatie ve věku E10,5

Na obrázku A je normálně se vyvíjející embryo ve věku E10,5, na obrázku B je embryo s defektem neurální trubice (šipka) a kardiovaskulárními defekty, na obrázku C je zcela defektní, neživotoschopné embryo s defektem neurální trubice (bílá šipka) a kaudální regresí (červená šipka) a na obrázku D je embryo s otevřenou neurální trubicí (bílá šipka), kardiovaskulárními anomáliemi a defekty žaberních oblouků (červená šipka). Měřítko představuje 1000 µm.

6.2 Izolovaná srdce

Po izolaci srdcí byla změřena jejich plocha pomocí programu NIS Elements D 3.2. Průměrnou plochu srdcí ukazují grafy na obrázku č. 11. V obou věkových skupinách je zřejmý negativní vliv diabetu. U všech izolovaných srdcí byla také hodnocena externí morfologie, zda odpovídá z hlediska vývoje věkům E9,5 a E10,5 (obrázek č. 12).





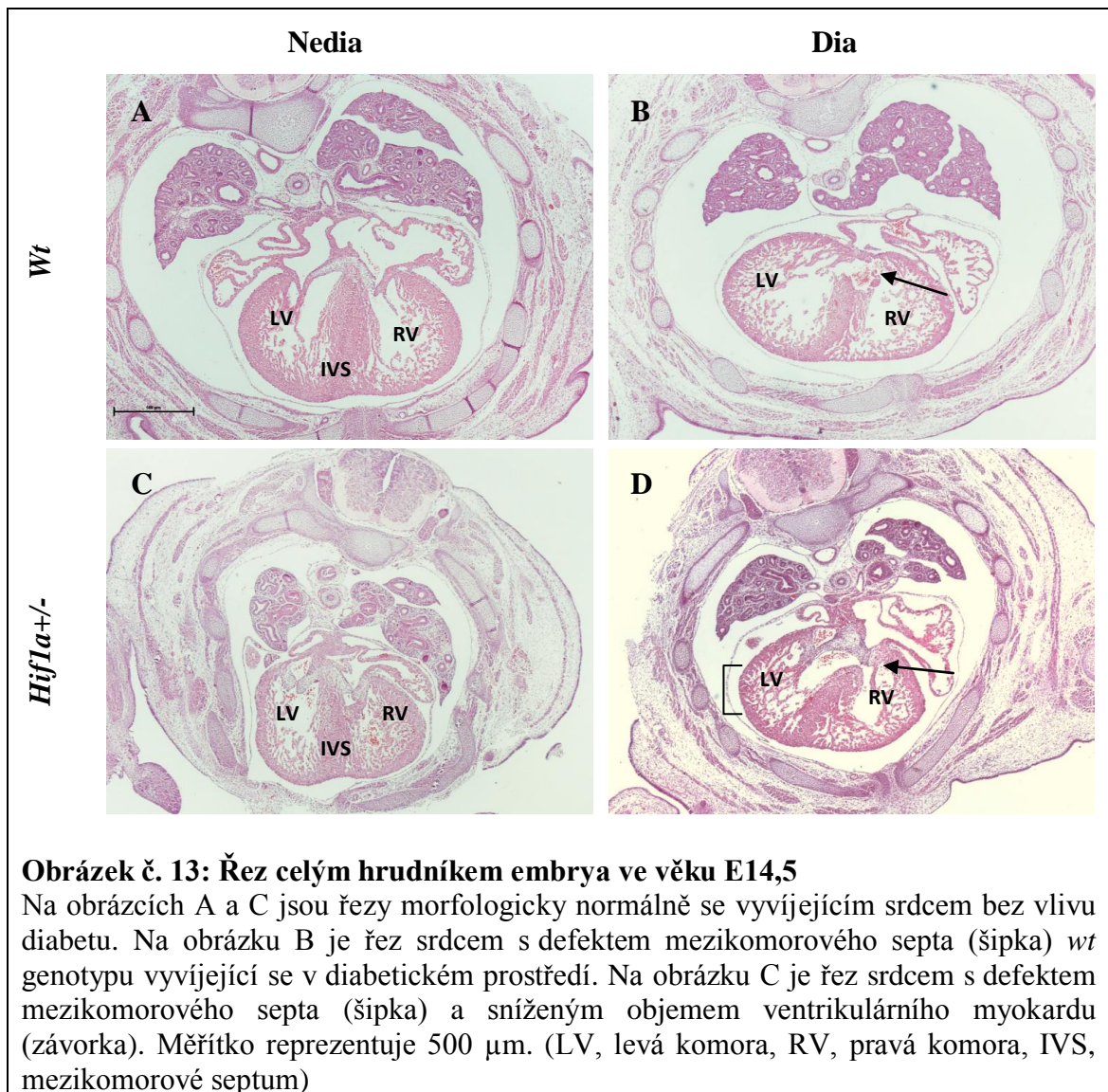
Obrázek č. 12: Izolovaná srdce

Na obrázku A je vyvíjející se srdce ve věku E9,5, na obrázku B je vyvíjející se srdce ve věku E10,5. Na obou obrázcích jsou vidět formující se síně (bílá šipka) a komory (červená šipka). Měřítka představuje 100 μm .

6.3 Histologická analýza srdcí E14,5

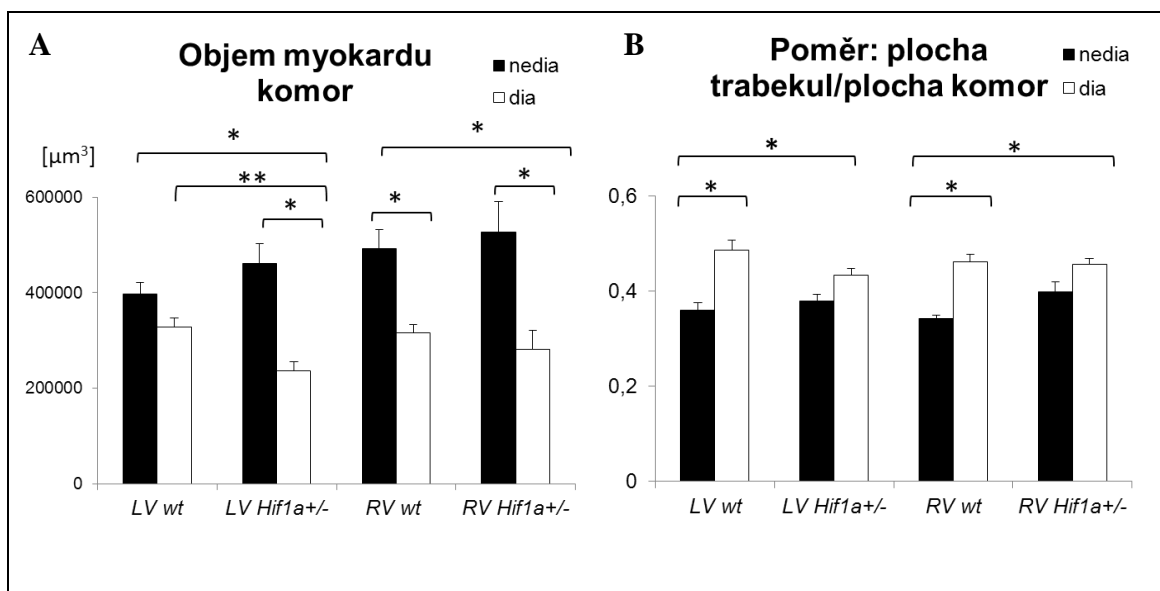
Pro plné zhodnocení výskytu a typu kardiovaskulárních defektů u našeho modelu diabetické embryopatie byly zkoumány histologické řezy celým hrudníkem embryí ve věku E14,5. Příklady řezů jsou uvedeny na obrázku č. 13. V tomto věku je dokončena poslední fáze vývoje srdce: septace, a tím je možné bezpečně určit morfologické defekty včetně defektů septa a defektů OFT. Bylo získáno 17 embryí *Hif1 α ^{+/-}* a 18 embryí *wt* z celkem 6 vrhů ovlivněných diabetem a 13 embryí *Hif1 α ^{+/-}* a 15 embryí *wt* z celkem 4 vrhů bez vlivu diabetu. U embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí byla pozorována zvýšená incidence kardiovaskulárních defektů. Jednalo se především o defekty IVS, pozorován byl i perikardiální otok v kombinaci s defekty IVS (65 %, respektive 12 % kardiovaskulárních defektů). *Hif1 α ^{+/-}* embrya z diabetických těhotenství měla v porovnání s *Hif1 α ^{+/-}* embryi z těhotenství bez ovlivnění diabetem zvýšenou incidenci kardiovaskulárních defektů o 47 % ($n = 8$ s defekty/17 embryí celkem, $P = 0,004$, Fischerův test). Obdobně měla *wt* embrya ovlivněná diabetem zvýšenou incidenci kardiovaskulárních defektů o 28 % ($n = 5$ s defekty/18 embryí celkem; $P = 0,048$, Fisherův test). HIF-1 α moduluje migraci buněk neurální lišty, které přispívají k formaci OFT a aortálních oblouků (Compernelle a kol. 2003). Z tohoto

důvodu byl morfologicky analyzován především plicní a aortální kmen. Ze 35 analyzovaných *wt* a *Hif1a*^{+/-} embryí z diabetických těhotenství, byl identifikován pouze jeden případ perzistujícího aortálního kmene a to u *Hif1a*^{+/-} embrya. Nebyl identifikován žádný případ transpozice velkých cév nebo dvojitokové pravé komory. Na obrázku č. 13 je zřejmé snížení ventrikulárního kompaktního myokardu, které bylo zaznamenáno u všech embryí vystavených diabetickému prostředí v porovnání s embryí z těhotenství bez ovlivnění diabetem.



Objem myokardu komor byl měřen pomocí programu ImageJ 1.45s a porovnán „one-way ANOVA“, s následným *t*-testem. Graf zobrazující výsledky porovnání objemu myokardu komor je na obrázku č. 14 A. V obou komorách bylo pozorováno významné snížení objemu kompaktního myokardu u embryí vyvíjejících se

v diabetickém prostředí oproti embryím bez vlivu diabetu. V levé komoře byl pozorován také významný vliv genotypu. Embrya *Hif1a*^{+/-} ovlivněná diabetem měla menší objem kompaktního myokardu oproti *wt* embryím ovlivněných diabetem. Dále byla měřena plocha trabekul, ta byla vztažena k ploše kompaktního myokardu. Graf na obrázku č. 14 B ukazuje, že embrya vyvíjející se v diabetickém prostředí měla v porovnání s embryi neovlivněnými diabetem zvětšenou plochu trabekul.



Obrázek č. 14: Vliv diabetu na stěnu komor

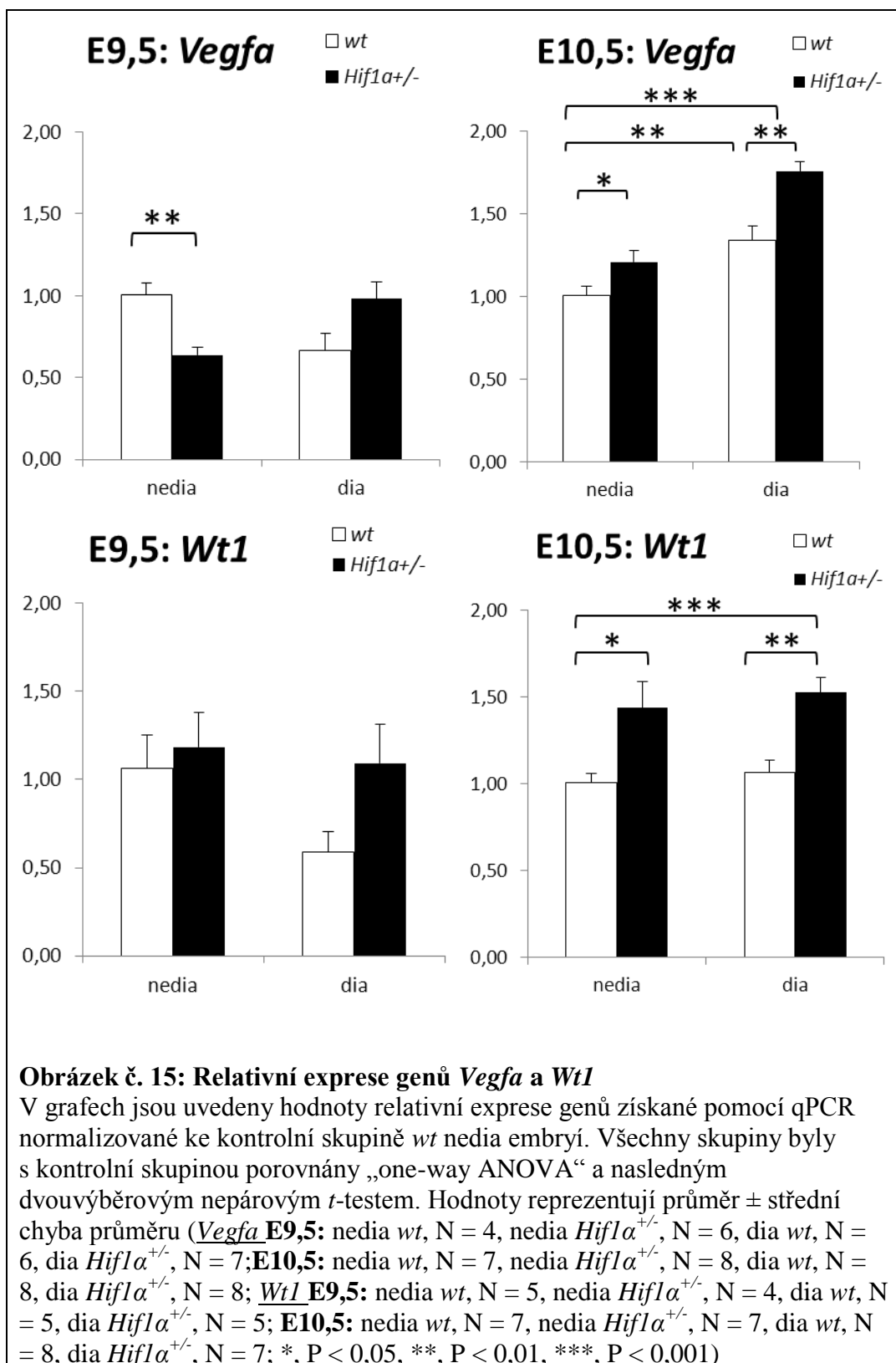
V grafu A je zobrazeno porovnání objemu kompaktního myokardu komor embryí ve věku E14,5. Hodnoty reprezentují objem v [μm^3] \pm střední chyba průměru. V grafu B je zobrazeno srovnání poměrů plochy trabekul/plochu kompakty u embryí ve věku E14,5. Hodnoty reprezentují poměr \pm střední chyba průměru. Pro statistické vyhodnocení byla použita „one-way ANOVA“ a následný dvouvýběrový nepárový *t*-test. (A, N = 5, B, LV *wt* nedia, N = 4, *wt* dia, N = 4, *Hif1a*^{+/-} nedia, N = 5, *Hif1a*^{+/-} dia, N = 4, RV *wt* nedia, N = 3, *wt* dia, N = 4, *Hif1a*^{+/-} nedia, N = 5, *Hif1a*^{+/-} dia, N = 5; *, P < 0,05, **, P < 0,01, LV, levá komora, RV, pravá komora)

6.4 Relativní exprese vybraných kandidátních genů

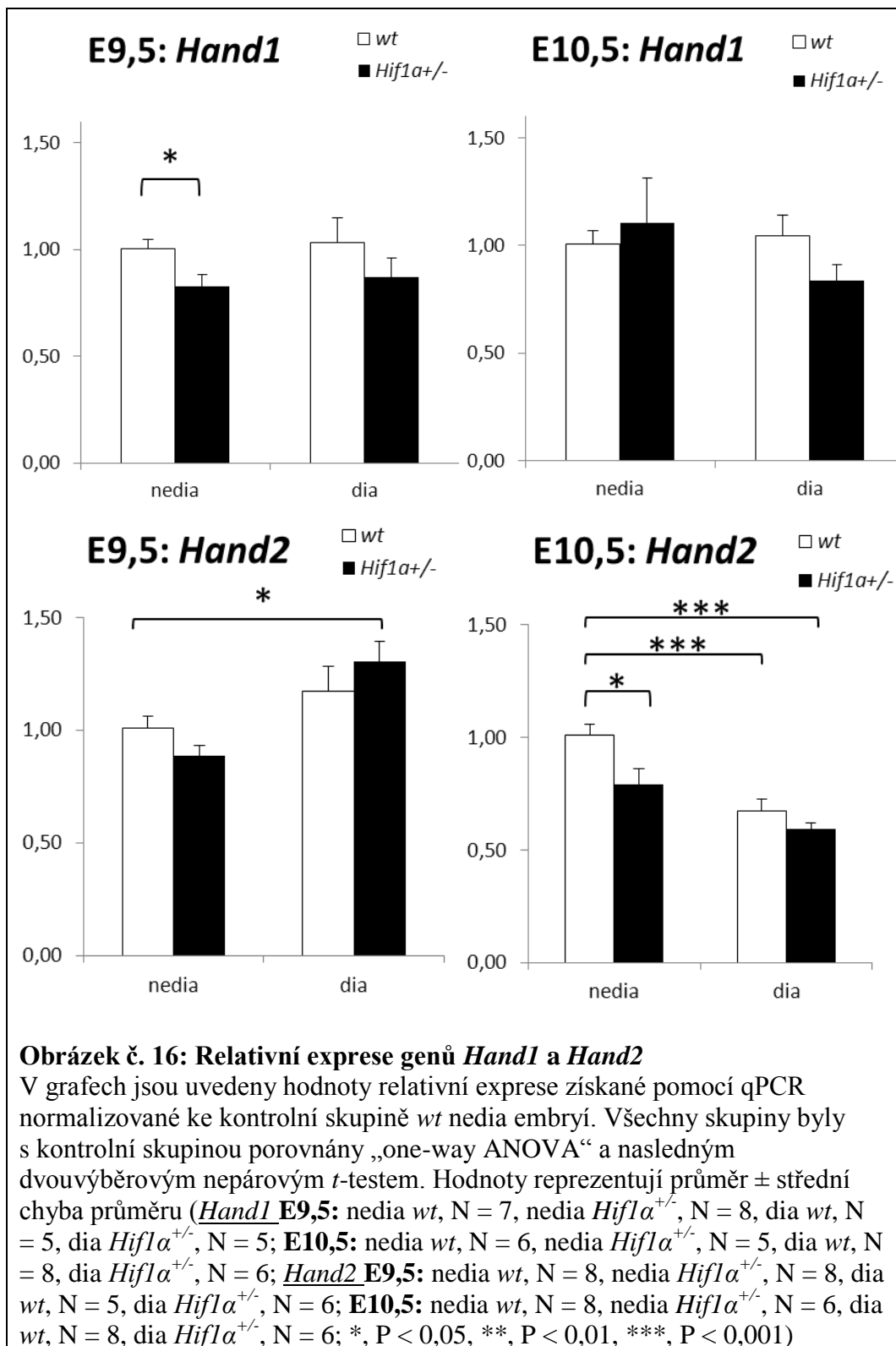
Pomocí qPCR byla měřena relativní exprese 11 genů, která byla normalizována ke konstitutivně exprimovanému genu *Hprt1*. Relativní exprese všech skupin byla pomocí dvouvýběrového nepárového *t*-testu porovnána s kontrolní skupinou *wt* embryí bez vlivu diabetu.

Byly vybrány geny, které ovlivňují vývoj srdce a jsou známými, případně možnými cílovými geny pro HIF-1 α . Grafy se srovnáním relativních expresí jednotlivých genů byly rozděleny do skupin s ohledem na jejich funkci.

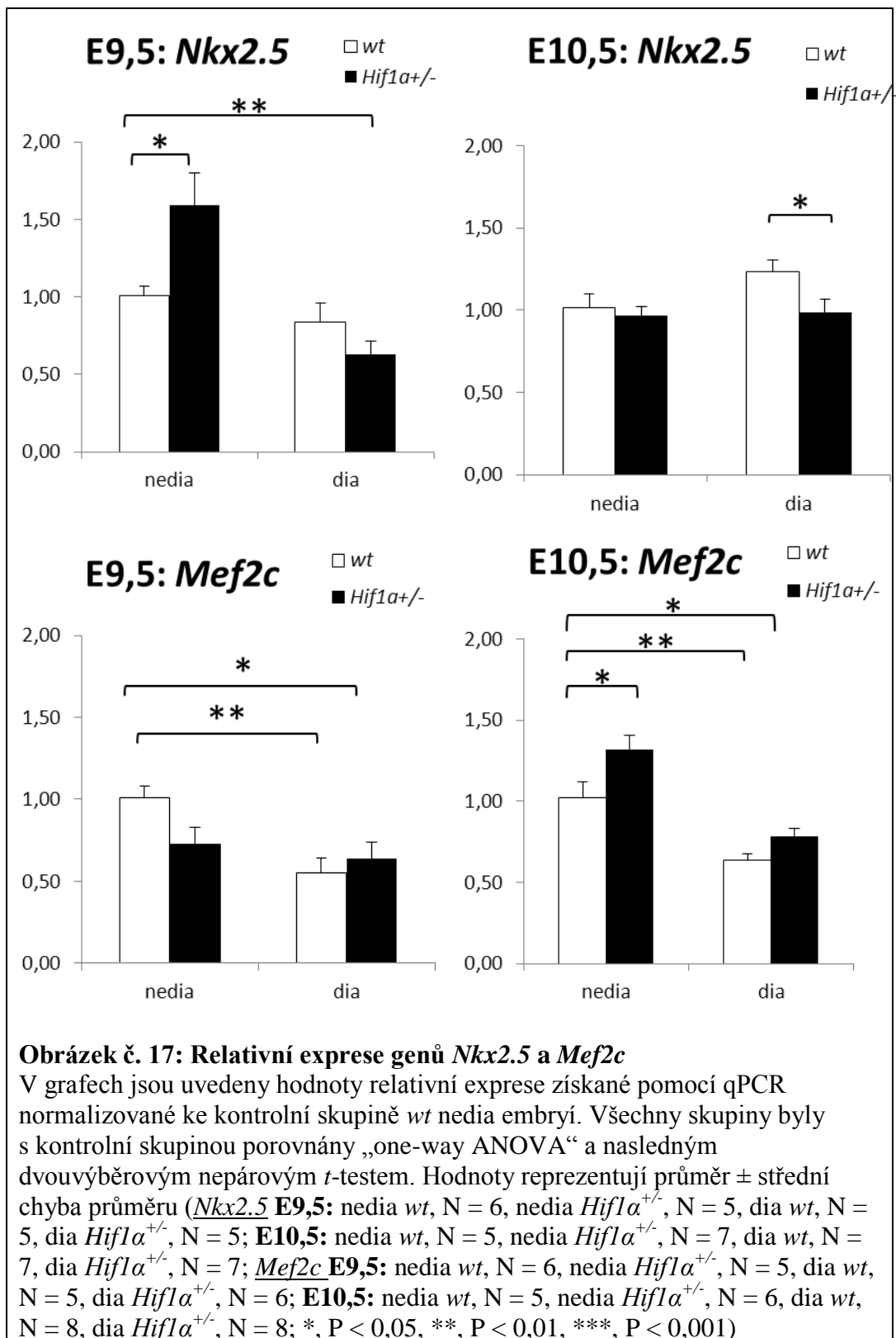
Geny *Vegfa* a *Wt1* jsou známými cíly přímé regulace transkripčním faktorem HIF-1 (Wagner a kol. 2003; Manalo a kol. 2005). Relativní exprese těchto genů jsou zobrazeny v grafech na obrázku č. 15. Množství mRNA *Vegfa* bylo signifikantně sníženo u embryí *Hif1 α ^{+/-}* neovlivněných diabetem ve věku E9,5, což je v souladu s *Hif1 α* haploinsuficiencí. Naopak ve věku E10,5 bylo množství mRNA ve srovnání s kontrolou, *wt* neovlivněných diabetem, významně zvýšeno ve všech skupinách. Statistické porovnání navíc ukázalo signifikantní rozdíl i mezi *Hif1 α ^{+/-}* embryi ovlivněnými diabetem a *wt* embryi ze stejných těhotenství. V případě genu *Wt1* je patrný trend snížené exprese mRNA ve skupině *wt* embryí ovlivněných diabetem ve věku E9,5. Ve věku E10,5 byla statisticky významně zvýšena exprese mRNA u embryí *Hif1 α ^{+/-}* ve skupině bez vlivu diabetu i ve skupině ovlivněné diabetem ve srovnání s kontrolní skupinou. Statisticky významné zvýšení exprese bylo pozorováno také u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* embryí v porovnání s diabetickými *wt* embryi.



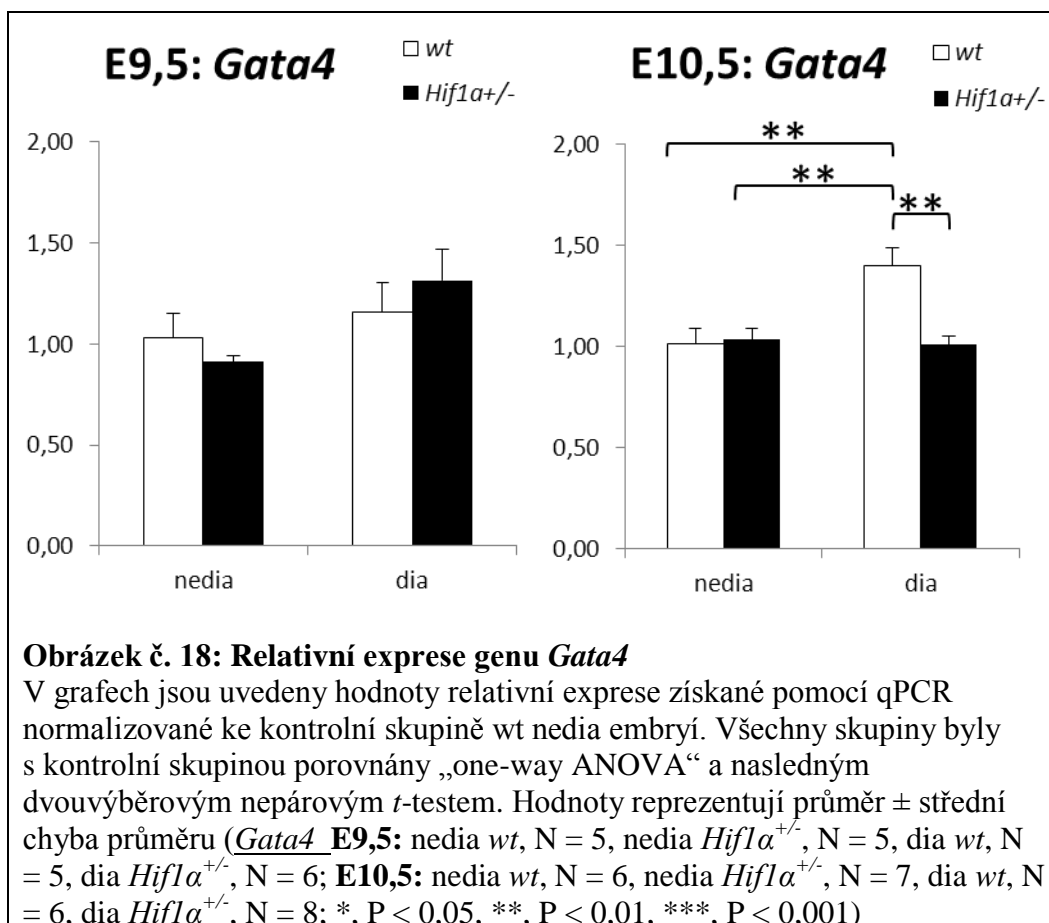
HAND1 a HAND2 se účastní specifikace budoucích komor (Thomas a kol. 1998). Grafy relativní exprese těchto genů jsou zobrazeny na obrázku č. 16. Expese genu *Hand1*, který se exprimuje specificky v levé komoře, byla u embryí *Hif1 α ^{+/-}* v nediabetickém prostředí oproti kontrole signifikantně snížena ve věku E9,5. Naproti tomu ve věku E10,5 nebyla expese *Hand1* signifikantně ovlivněna v žádné skupině. Trend snížené exprese *Hand1* je detekovatelný u *Hif1 α ^{+/-}* embryí ovlivněných diabetem obou věkových skupin v porovnání s *wt* embryi. Tento trend naznačuje vliv *Hif1 α ^{+/-}* genotypu. V kontrastu s tím byla expese *Hand2* ve věku E9,5 oproti kontrole významně zvýšena u *Hif1 α ^{+/-}* embryí ovlivněných diabetem. Ve věku E10,5 byla expese *Hand2* ve všech experimentálních skupinách oproti kontrole naopak snížena.



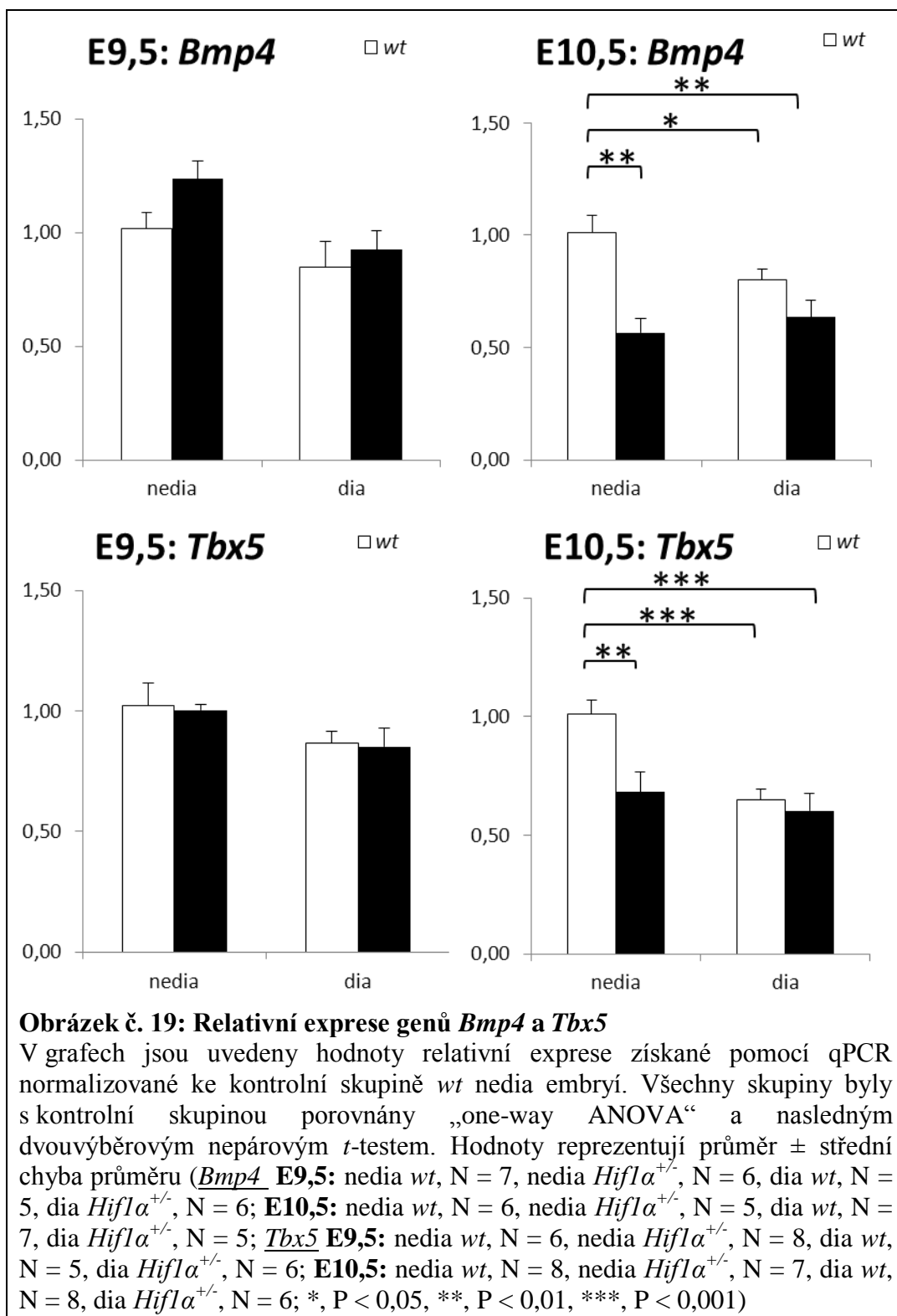
Produkty *Nkx2.5* a *Mef2c* genů se pravděpodobně účastní diferenciaci buněk, oba jsou nezbytné pro iniciaci ohýbání srdeční trubice (Lints a kol. 1993; Lin a kol. 1997). Expres *Nkx2.5* je ovlivněna transkripčním faktorem *Hif1 α* (Krishnan a kol. 2008). *Mef2c* s *Hif1 α* fyzicky interaguje. Jejich relativní exprese je znázorněna v grafech na obrázku č. 17. *Nkx2.5* je ve věku E9,5 deregulován u *Hif1 α ^{+/-}* embryí bez vlivu diabetu i u *Hif1 α ^{+/-}* embryí ovlivněných diabetem. U diabetem ovlivněných *Hif1 α ^{+/-}* embryí je exprese *Nkx2.5* oproti kontrole snížena, u *Hif1 α ^{+/-}* embryí bez vlivu diabetu je jeho exprese naopak zvýšena. Ve věku E10,5 bylo pozorováno statisticky významné snížení exprese *Nkx2.5* u diabetických *Hif1 α ^{+/-}* embryí oproti *wt* embryím ve vrzích ovlivněných diabetem. Expres *Mef2c* byla ve věku E9,5 oproti kontrole signifikantně snížena u obou skupin embryí (*wt*, *Hif1 α ^{+/-}*) ovlivněných diabetem. Tento trend lze pozorovat i u *Hif1 α ^{+/-}* embryí vyvíjejících se v nediabetickém prostředí. Ve věku E10,5 byla exprese *Mef2c* u *Hif1 α ^{+/-}* embryí vyvíjejících se v nediabetickém prostředí oproti kontrole významně zvýšena. Stejně jako u E9,5 diabetem ovlivněných embryí byla exprese *Mef2c* u obou skupin embryí (*wt*, *Hif1 α ^{+/-}*) vyvíjejících se v diabetickém prostředí signifikantně snížena.



GATA4 ve vyvíjejícím se srdci ovlivňuje proces EMT (Rivera-Feliciano a kol. 2006) a proliferaci buněk (Grepin a kol. 1997). Graf ukazující relativní expresi *Gata4* je na obrázku č. 18. V případě tohoto genu byla pozorována statisticky významná změna exprese oproti kontrole pouze ve věku E10,5 ve skupině *wt* embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí. Porovnání s ostatními skupinami (*wt*, *Hif1α^{+/-}* nedia, *Hif1α^{+/-}* dia) prokázalo statistickou významnost naznačující vliv genotypu.

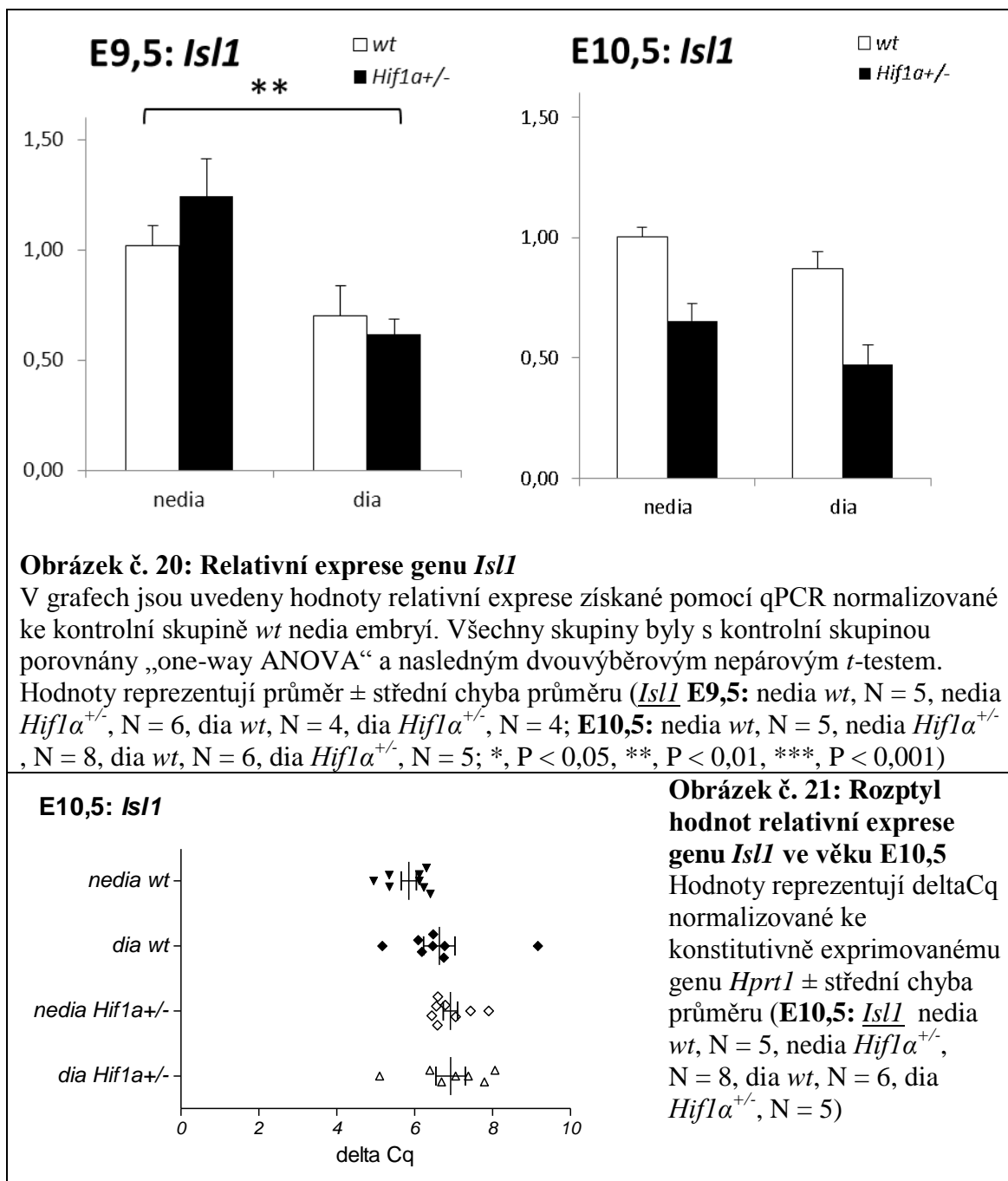


BMP4 i TBX5 se účastní vývoje sept a chlopní (Bruneau a kol. 2001; Jiao a kol. 2003), grafy ukazující jejich relativní expresi jsou na obrázku č. 19. U genu *Bmp4* byla pozorována signifikantní změna v jeho expresi oproti kontrole ve věku E10,5. Všechny zkoumané skupiny měly ve srovnání s kontrolní skupinou *wt* embryí sníženou expresi. V případě genu *Tbx5* byla signifikantní změna exprese pozorována také pouze ve věku E10,5, ukazující na vliv diabetu a *Hif1α^{+/-}* genotypu. Relativní exprese *Tbx5* byla ve srovnání s kontrolou (*wt* embrya neovlivněná diabetem) také ve všech skupinách snižena v E10,5.



ISL1 je zodpovědný za specifikaci progenitorových buněk v SHF a jejich migraci do srdce (Cai a kol. 2003). Relativní exprese mRNA genu *Isl1* jsou zobrazeny v grafech na obrázku č. 20. Exprese *Isl1* byla ve věku E9,5 oproti kontrolní skupině signifikantně snížena u *Hif1α*^{+/-} embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí. Stejný

trend byl zaznamenán i u *wt* embryí. Ve věku E10,5 nebylo možné statistické vyhodnocení z důvodu příliš velkého rozptylu získaných hodnot (obrázek č. 21). Výrazné rozptyly hodnot mRNA byly naměřeny zejména u embryí z diabetických těhotenství, naznačující deregulaci exprese *Isl1* v důsledku diabetického prostředí a kombinovaný vliv *Hif1α*^{+/-} genotypu a diabetu.



Expresi genu *Tbx1* nebylo možné vyhodnotit. Množství *Tbx1* mRNA v tkáni bylo pod úrovní detekce, z toho důvodu nejsou výsledky uvedeny.

7. Diskuze

Jednou z vážných komplikací onemocnění diabetes mellitus je diabetická embryopatie. U diabetických těhotenství se riziko výskytu vrozených vývojových vad zvyšuje až desetkrát (Casson a kol. 1997). Diabetická embryopatie může ovlivnit kterýkoli vyvíjející se orgánový systém, ale nejčastějšími defekty jsou defekty kardiovaskulárního systému. Nejčastějšími srdečními malformacemi diagnostikovanými u lidských diabetických těhotenství jsou defekty IVS, syndrom hypoplastického levého srdce a perzistentní aortální kmen. (Kucera 1971; Martinez-Frias 1994; Wren a kol. 2003). Stejně typy kardiovaskulárních defektů byly popsány také u zvířecích modelů. Tyto studie ukázaly, že hyperglykemie, hypoxie a abnormální mateřský/fetalní metabolismus negativně ovlivňují embryonální vývoj (Ellington 1997; Sadler 1997; Gutierrez a kol. 2007). Molekulární mechanismy, které deregulují genovou expresi a v konečném důsledku vedou ke vzniku vrozených vad, však stále nejsou plně objasněné.

Tato diplomová práce vychází z několika poznatků, které ukazují, že maternální diabetes významně mění genový expresní profil embryí a dochází k významnému ovlivnění HIF-1 regulovaných signálních drah ve vyvíjejícím se embryu (Pavlinkova a kol. 2009). Dále bylo ukázáno, že kompletní delece *Hif1a* způsobuje defekty, které odpovídají fenotypu diabetické embryopatie (Iyer a kol. 1998a; Kotch a kol. 1999; Compernelle a kol. 2003)

Heterozygotní *Hif1a*^{+/-} embrya se vyvíjejí normálně, avšak v diabetickém prostředí jsou náchylnější ke vzniku diabetické embryopatie, v porovnání s *wt* embryi (Bohuslavova a kol. 2013). Analýzy spojené s touto diplomovou prací potvrdily negativní vliv diabetu a deregulace HIF-1 signální dráhy na vývoj plodu v našem modelu. Trend sníženého průměrného počtu embryí v jednom vrhu byl zaznamenán u obou zkoumaných věků, E9,5 a E10,5 u diabetických těhotenství. Ve věku E9,5 byl pozorován negativní vliv kombinace diabetu a genotypu *Hif1a*^{+/-}, kdy počet diabetem ovlivněných *Hif1a*^{+/-} embryí na jeden vrh byl významně snížen v porovnání nejen s nediabetickými kontrolními těhotenstvími, ale také s počty *wt* embryí z diabetických těhotenství (obrázek č. 7). Byla potvrzena statisticky významně menší velikost plodů vyvíjejících se v diabetickém prostředí (obrázek č. 8), která je u člověka asociována s vyšším výskytem vrozených vývojových vad u diabetických

těhotenství (Casson a kol. 1997). Pozorovaná menší plocha srdcí u embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí odpovídá pozorované menší celkové velikosti diabetem ovlivněných embryí (obrázek č. 11). U embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí byl pozorován častější výskyt opožděného a defektního vývoje, 2 nediabetická embrya oproti 9 diabetickým embryím, respektive 1 nediabetické embryo oproti 5 diabetickým. S tím souvisí také pozorování zvýšeného výskytu absorbovaných embryí v diabetem ovlivněných vrzích (27 embryí) ve srovnání s vrhy bez vlivu diabetu (4 embrya, tabulka č. 11).

Histologická analýza řezů hrudníkem embryí ve věku E14,5 z diabetických těhotenství potvrdila zvýšený výskyt kardiovaskulárních defektů, zejména defektů IVS a změny v myokardu komor (obrázek č. 13). Navíc bylo ve vrzích ovlivněných diabetem pozorováno, že *Hif1α^{+/-}* embrya mají tenčí levou kompaktní stěnu komor než *wt* embrya (obrázek č. 13A). Dále bylo pozorováno zvýšené množství komorových trabekul u embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí (obrázek č. 13B). Pravděpodobnou funkcí trabekul je zvětšení povrchu myokardu pro vstřebávání kyslíku. Tyto výsledky jsou v souladu s hypotézou, že diabetické prostředí způsobuje tkáňovou hypoxii a aktivuje kompenzační mechanismy k zajištění dostatečné hladiny kyslíku v tkáních.

Zkoumané geny byly vybrány s ohledem na jejich funkci ve vývoji srdce a na jejich možnou regulaci HIF-1 signální dráhou. Analýza exprese genů účastnících se vývoje srdce potvrdila výchozí hypotézu, že diabetes v těhotenství dereguluje genovou expresi během vývoje embrya a tím negativně ovlivňuje vývojové procesy a zvyšuje riziko vzniku vývojových defektů. Relativní exprese genu *Vegfa* byla signifikantně změněna v obou pozorovaných embryonálních věcích (obrázek č. 15). Exprese VEGFA je přímo aktivována transkripčním faktorem HIF-1 (Manalo a kol. 2005), je tedy možné, že se jedná o přímý vliv genotypu. Nicméně VEGFA má několik sestřihových variant, z nichž některé mají angiogenní účinek a jiné působí antiangiogenně (Nowak a kol. 2008). *Vegfa* primery použité v této diplomové práci byly navrženy tak, aby detekovaly všechny primární *Vegfa* izoformy: VEGF 120, VEGF 164, a VEGF 188. Ve věku E9,5 byla významně snižená exprese *Vegfa* u *Hif1α^{+/-}* embryí z nediabetických těhotenství v porovnání s *wt*, což odpovídá *Hif1α* nedostatečné funkci vázané k tomuto genotypu (obrázek č. 15). Naopak trend ukazující zvýšenou *Vegfa* expresi u *Hif1α^{+/-}* embryí z diabetických těhotenství naznačuje možnou kompenzaci *Hif1α^{+/-}* genotypu. Ve věku E10,5 bylo v porovnání s *wt* embryi neovlivněnými

diabetem pozorováno statisticky významné zvýšení exprese *Vegfa* u *wt* embryí z diabetických těhotenství (obrázek č. 15). Tyto výsledky jsou v souladu s předchozí publikací, kde bylo ukázáno, že maternální diabetes zvyšuje expresi *Vegfa* v E10,5 embryích (Pavlinkova a kol. 2009). Zvýšená exprese VEGFA byla dána do souvislosti s negativní regulací EMT v endokardiálních polštářcích (Dor a kol. 2001), ztenčenou stěnou komor, zvýšeným množstvím trabekul a defekty IVS (Miquerol a kol. 2000). Výsledky získané v rámci této diplomové práce naznačují, že *Vegfa* je gen, který by se mohl podílet na vzniku fenotypu diabetické embryopatie.

Dalším genem, který je indukován transkripčním faktorem HIF-1 je *Wt1* (Wagner a kol. 2003). V případě tohoto genu byla překvapivě pozorována statisticky významně zvýšená exprese ve věku E10,5 ovlivněná genotypem *Hif1α^{+/-}* (obrázek č. 15). Je možné, že se jedná o mechanismus mající za úkol kompenzovat chybějící alelu genu *Hif1α*.

Hand1 je také pravděpodobně indukován HIF-1 (Compernelle a kol. 2003). V myších embryích deficientních pro HIF-1 α nebyla jeho exprese detekovatelná. Pozorovaná snížená exprese v této práci ve věku E9,5 u *Hif1α^{+/-}* embryí neovlivněných diabtem by tedy mohla znamenat přímý vliv HIF-1 regulace (obrázek č. 16). Ve skupině *Hif1α^{+/-}* embryí ovlivněných diabtem byl pozorován trend snížené exprese u obou analyzovaných věků, odpovídající nedostatečné funkci HIF-1 α u embryí s tímto genotypem. Studie myších embryí s delecí *Hand1* v srdci odhalily defekty IVS a chlopni způsobené zvýšenou proliferací buněk v endokardiálních polštářcích (McFadden a kol. 2005). V rámci této diplomové práce byla zjištěna zvýšená exprese *Vegfa* ve věku E10,5, která proces proliferace buněk v endokardiálních polštářcích inhibuje, jak ukázali Dor a kol. (2001). Toto zvýšení by mohlo znamenat kompenzační mechanismus snížené exprese *Hand1*.

Hand2 může částečně suplovat funkci *Hand1* v případě jeho deficience (McFadden a kol. 2005). Je tedy možné, že pozorovaná zvýšená exprese ve věku E9,5 u *Hif1α^{+/-}* embryí ovlivněných diabtem je následek snížené exprese *Hand1* (obrázek č. 16). Ve věku E10,5 byla ve srovnání s *wt* kontrolou pozorována snížená exprese ve všech skupinách embryí. Tyto výsledky naznačují, že je *Hand2* ovlivňován diabtem a také *Hif1α^{+/-}* genotypem..

Nkx2.5 je gen, který je pravděpodobně nepřímo ovlivněn HIF-1 transkripčním faktorem (Krishnan a kol. 2008). Exprese tohoto genu byla významně změněna u *Hif1α^{+/-}* embryí ve věku E9,5, což naznačuje, že gen *Nkx2.5* je ovlivněn HIF-1

signalizací (obrázek č. 17). Je zajímavé, že v *Hif1a*^{+/-} skupině neovlivněné diabetem byla pozorována zvýšená exprese *Nkx2.5* a v *Hif1a*^{+/-} skupině ovlivněné diabetem byla pozorována snížená exprese. U *wt* embryí ovlivněných diabetem byla ve věku E10,5 pozorována snížená exprese u *Hif1a*^{+/-} embryí oproti *wt* embryím z diabetických těhotenství (obrázek č. 17). Na myších embryích bylo ukázáno, že kardiomyocyty exprimující *Nkx2.5* jsou nutné pro tvorbu endokardiálních polštářků (Tanaka a kol. 1999). Výsledky získané v rámci této diplomové práce naznačují, že *Nkx2.5* je regulován HIF-1 signalizací, nicméně je pravděpodobné, že zde hrají roli další regulační mechanismy. Deregulace *Nkx2.5* by mohla hrát funkční roli při vzniku diabetické embryopatie.

V této diplomové práci byly pozorovány změny exprese *Mef2c*, které ukazují na významný vliv diabetu (obrázek č. 17). V obou skupinách embryí ovlivněných diabetem (*wt* a *Hif1a*^{+/-}) byla ve věku E9,5 a E10,5 pozorována snížená exprese. Je zajímavé, že ve věku E10,5 byla pozorována zvýšená exprese u *Hif1a*^{+/-} embryí neovlivněných diabetem. Naopak, ve věku E9,5 byl pozorován trend snížené exprese u *Hif1a*^{+/-} embryí neovlivněných diabetem, nevyšel však statisticky signifikantní. Je možné, že se jedná o kompenzační mechanismus vlivem heterozygotního stavu mutace. Tyto výsledky jsou v souladu s publikovanými výsledky ukazující, že *Mef2c* je přímým cílovým genem regulace HIF-1 (Krishnan a kol. 2008).

GATA4 ve vyvíjejícím se embryonálním srdci ovlivňuje proces EMT a jeho hypomorfni mutace má za následek defekty septace a vývoje chlopní (Misra a kol. 2012). Překvapivě byla v této práci pozorována zvýšená exprese ve věku E10,5 u *wt* embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí (obrázek č. 18). U myši se specifickou delecí *Gata4* v kardiomyocytech byla pozorována zhoršená odpověď na zvýšenou zátěž (Oka a kol. 2006). Je možné, že pozorovaná zvýšená exprese je reakcí na zátěž, kterou představuje diabetes. Naopak neschopnost reakce na diabetické prostředí u *Hif1a*^{+/-} mutantů může představovat zvýšené riziko diabetické embryopatie, které u diabetem ovlivněných *Hif1a*^{+/-} embryí naznačují analýzy i publikované výsledky naší laboratoře (Bohuslavova a kol. 2013). Výsledky získané v rámci této diplomové práce naznačují, že *Gata4* je pravděpodobně ovlivněn HIF-1 signalizací.

Bmp4 je pravděpodobným cílovým genem HIF-1 regulace (Lenox a kol. 2005), což by mohlo být důvodem pozorované snížené exprese tohoto genu u obou skupin *Hif1a*^{+/-} embryí (diabetem ovlivněná i neovlivněná) ve věku E10,5. *Bmp4* hraje důležitou úlohu při tvorbě septa a chlopní (Jiao a kol. 2003). V rámci této diplomové

práce byla pozorována snížená exprese *Bmp4* ve věku E10,5 u všech skupin embryí (*wt* ovlivněná diabetem a *Hif1 α ^{+/-}* diabetem ovlivněná i neovlivněná) porovnávaných s *wt* embryi neovlivněnými diabetem (obrázek č. 19), která naznačuje, že se *Bmp4* funkčně účastní procesů v diabetické embryopatii. V rámci skupiny diabetem ovlivněných embryí se zdá trend snížené exprese výraznější u *Hif1 α ^{+/-}* embryí. Statistické porovnání skupiny *wt* a *Hif1 α ^{+/-}* embryí však neprokázalo signifikantní rozdíl. Tyto výsledky naznačují, že *Bmp4* je ovlivněn diabetickým prostředím a HIF-1 signalizací.

Dalším genem, který se účastní septace srdce je *Tbx5* (Bruneau a kol. 2001). V heterozygotním stavu je delece *Tbx5* spojena s vrozenými vývojovými vadami, které zahrnují srdeční hypoplasii a síňokomorové defekty septa (Bruneau a kol. 2001). Také u *Tbx5* genu ve věku E10,5 byla pozorována ve srovnání s kontrolní skupinou (*wt* embryí bez vlivu diabetu) snížená exprese ve všech skupinách embryí (obrázek č. 19). U *Hif1 α ^{+/-}* embryí neovlivněných diabetem je možným důvodem pozorované snížené exprese přímý vliv genotypu, protože bylo dokázáno, že *Tbx5* je přímým cílovým genem HIF-1 regulace (Krishnan a kol. 2008). Pozorované snížení exprese u *wt* a *Hif1 α ^{+/-}* embryí z diabetických těhotenství naznačuje, že exprese tohoto genu je ovlivněna diabetickým prostředím a deregulace tohoto genu by mohla zvyšovat riziko vzniku defektů septa při diabetické embryopatii.

ISL1 je nutný pro migraci prekursorových buněk do oblasti srdeční trubice (Sun a kol. 2007). Migrace buněk končí přibližně ve věku E9,0. V modelu diabetické embryopatie, který byl studován v rámci této diplomové práce, byla ve věku E9,5 ve srovnání s kontrolní skupinou pozorována signifikantně snížená exprese *Isl1* u *Hif1 α ^{+/-}* embryí vyvíjejících se v diabetickém prostředí (obrázek č. 20). Trend snížené exprese byl pozorován i u *wt* embryí ovlivněných diabetem, tato změna exprese však nebyla statisticky potvrzena. Tyto výsledky naznačují, že diabetes ovlivňuje migraci prekursorových buněk do vyvíjejícího se srdce. Ve věku E10,5 byl pozorován trend snížené exprese vlivem genotypu u *Hif1 α ^{+/-}* embryí ovlivněných diabetem i u *Hif1 α ^{+/-}* embryí bez vlivu diabetu, nebylo však možné stanovit statistickou signifikanci z důvodu velkého rozptylu hodnot v jednotlivých skupinách, jak ukazuje graf na obrázku č.21. Tato zvýšená variabilita genové exprese souvisí s patologickým vlivem diabetu na embryonální vývoj.

Maternální diabetes indukuje specifické morfologické defekty, které představují částečně penetrantní fenotyp. V myším modelu diabetické embryopatie jsou zkoumána embrya se stejným genetickým pozadím a se stejnou expozicí diabetickému prostředí,

přesto je pozorován různý stupeň postižení (Gutierrez a kol. 2007; Kumar a kol. 2007; Pavlinkova a kol. 2009). Možné vysvětlení etiologie diabetické embryopatie vázané na změny genové exprese zdůrazňuje dvě komponenty, deregulace genové exprese a zvýšení variability genové exprese (Salbaum a Kappen 2010). V studii představují *Hif1a*^{+/-} genotyp a zvýšená variabilita genové exprese rozdíly mezi embryi, které mohou být spouštěcím mechanismem patologických změn vedoucích ke vzniku diabetické embryopatie.

8. Souhrn

Tato práce byla zaměřena na studium molekulárních změn ve vyvíjejícím se embryonálním srdci myšního modelu, které jsou způsobeny maternálním diabetem.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno následující:

- Maternální diabetes má za následek snížený průměrný počet embryí ve vrhu, ve věku E9,5 byl pozorován negativní vliv kombinace genotypu *Hif1 α ^{+/-}* a diabetu. Embrya vyvíjející se v diabetickém prostředí mají menší průměrnou velikost než nediabetická embrya a vyšší výskyt vývojových abnormalit.
- Myší embrya vyvíjející se v diabetickém prostředí mají zvýšený výskyt vývojových defektů srdce, zejména defekty mezikomorového septa. Embrya vyvíjející se v diabetickém prostředí mají snížený objem myokardu a zvýšené množství trabekul.
- Diabetes dereguluje u embryí následující geny: *Vegfa*, *Mef2c*, *Gata4*, *Bmp4*, *Hand2* a *Tbx5*. Kombinace vlivu genotypu *Hif1 α ^{+/-}* a diabetického prostředí způsobila změny v expresi *Hand2*, *Vegfa*, *Nkx2.5*, *Gata4*, a *Isl1*. U genů *Hand1* a *Wt1* byla potvrzena jejich účast v HIF-1 signalizaci.
- Získané výsledky naznačují, že deregulace genů důležitých pro vývoj srdce by mohla hrát funkční roli v diabetické embryopatii.

Výsledky uvedené v této práci budou použity v odborném článku, který bude publikován v zahraničním odborném časopisu.

9. Seznam použité literatury

- Bartoš, V., P. Pelikánová, K. Andělová, P. Bouček, P. Brůček, M. Dryáková, E. Ezechiášová, K. Filip, V. Havlová, T. Hrachovinová, A. Jirkovská, K. Komersová, R. Kožnarová, V. Mazárová, J. Rybka, F. Saudek, T. Sechser, T. Sosna, V. Staněk, J. Škrha, J. Válek, J. Vavřinec, J. Venháčová, K. Vondra a V. Zamrazil (2003). *Praktická diabetologie*. Na Šejdru 247/6a, 142 00 Praha 4, MAXDORF s. r. o.
- Bi, W., C. J. Drake a J. J. Schwarz (1999). "The transcription factor *mef2c*-null mouse exhibits complex vascular malformations and reduced cardiac expression of angiopoietin 1 and *vegf*." *Developmental biology* 211(2): 255-267.
- Bohuslavova, R., L. Skvorova, D. Sedmera, G. L. Semenza a G. Pavlinkova (2013). "Increased susceptibility of *hif-1alpha* heterozygous-null mice to cardiovascular malformations associated with maternal diabetes." *Journal of molecular and cellular cardiology*.
- Brown, C. B., J. M. Wenning, M. M. Lu, D. J. Epstein, E. N. Meyers a J. A. Epstein (2004). "Cre-mediated excision of *fgf8* in the *tbx1* expression domain reveals a critical role for *fgf8* in cardiovascular development in the mouse." *Developmental biology* 267(1): 190-202.
- Bruick, R. K. a S. L. McKnight (2001). "A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify *hif*." *Science* 294(5545): 1337-1340.
- Bruneau, B. G., M. Logan, N. Davis, T. Levi, C. J. Tabin, J. G. Seidman a C. E. Seidman (1999). "Chamber-specific cardiac expression of *tbx5* and heart defects in *holt-oram* syndrome." *Developmental biology* 211(1): 100-108.
- Bruneau, B. G., G. Nemer, J. P. Schmitt, F. Charron, L. Robitaille, S. Caron, D. A. Conner, M. Gessler, M. Nemer, C. E. Seidman a J. G. Seidman (2001). "A murine model of *holt-oram* syndrome defines roles of the *t-box* transcription factor *tbx5* in cardiogenesis and disease." *Cell* 106(6): 709-721.
- Cai, C. L., X. Liang, Y. Shi, P. H. Chu, S. L. Pfaff, J. Chen a S. Evans (2003). "*Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart." *Dev Cell* 5(6): 877-889.
- Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoeck, K. Harpal, C. Eberhardt, C. Declercq, J. Pawling, L. Moons, D. Collen, W. Risau a A. Nagy (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single *vegf* allele." *Nature* 380(6573): 435-439.
- Casson, I. F., C. A. Clarke, C. V. Howard, O. McKendrick, S. Pennycook, P. O. Pharoah, M. J. Platt, M. Stanistreet, D. van Velszen a S. Walkinshaw (1997). "Outcomes of pregnancy in insulin dependent diabetic women: Results of a five year population cohort study." *BMJ* 315(7103): 275-278.
- Cohen, E. D., Y. Tian a E. E. Morrisey (2008). "Wnt signaling: An essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal." *Development* 135(5): 789-798.
- Compernelle, V., K. Brusselmans, D. Franco, A. Moorman, M. Dewerchin, D. Collen a P. Carmeliet (2003). "*Cardia bifida*, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1 α ." *Cardiovascular research* 60(3): 569-579.
- Cserjesi, P., D. Brown, G. E. Lyons a E. N. Olson (1995). "Expression of the novel basic helix-loop-helix gene *ehand* in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development." *Developmental biology* 170(2): 664-678.
- Čihák, R., M. Grim, R. Druga, M. Med a I. Helekal (2004). *Anatomie, Grada*.
- Dodou, E., M. P. Verzi, J. P. Anderson, S. M. Xu a B. L. Black (2004). "*Mef2c* is a direct transcriptional target of *isl1* and *gata* factors in the anterior heart field during mouse embryonic development." *Development* 131(16): 3931-3942.
- Dor, Y., T. D. Camenisch, A. Itin, G. I. Fishman, J. A. McDonald, P. Carmeliet a E. Keshet (2001). "A novel role for *vegf* in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects." *Development* 128(9): 1531-1538.
- Dumont, D. J., G. H. Fong, M. C. Puri, G. Gradwohl, K. Alitalo a M. L. Breitman (1995). "Vascularization of the mouse embryo: A study of *flk-1*, *tek*, *tie*, and vascular endothelial growth factor expression during development." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 203(1): 80-92.
- Dunwoodie, S. L. (2009). "The role of hypoxia in development of the mammalian embryo." *Dev Cell* 17(6): 755-773.

- Ellington, S. K. (1997). "Effects of excess glucose on mammalian post-implantation embryos." *The International journal of developmental biology* 41(2): 299-306.
- Firulli, B. A., D. B. Hadzic, J. R. McDaid a A. B. Firulli (2000). "The basic helix-loop-helix transcription factors dhand and ehnd exhibit dimerization characteristics that suggest complex regulation of function." *The Journal of biological chemistry* 275(43): 33567-33573.
- Fox, J. G. (2007). *The mouse in biomedical research: Normative biology, husbandry, and models*, Elsevier Science & Tech.
- Galvin, K. M., M. J. Donovan, C. A. Lynch, R. I. Meyer, R. J. Paul, J. N. Lorenz, V. Fairchild-Huntress, K. L. Dixon, J. H. Dunmore, M. A. Gimbrone, Jr., D. Falb a D. Huszar (2000). "A role for smad6 in development and homeostasis of the cardiovascular system." *Nat Genet* 24(2): 171-174.
- Giordano, F. J., H. P. Gerber, S. P. Williams, N. VanBruggen, S. Bunting, P. Ruiz-Lozano, Y. Gu, A. K. Nath, Y. Huang, R. Hickey, N. Dalton, K. L. Peterson, J. Ross, Jr., K. R. Chien a N. Ferrara (2001). "A cardiac myocyte vascular endothelial growth factor paracrine pathway is required to maintain cardiac function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10): 5780-5785.
- Gossett, L. A., D. J. Kelvin, E. A. Sternberg a E. N. Olson (1989). "A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes." *Molecular and cellular biology* 9(11): 5022-5033.
- Grepin, C., G. Nemer a M. Nemer (1997). "Enhanced cardiogenesis in embryonic stem cells overexpressing the gata-4 transcription factor." *Development* 124(12): 2387-2395.
- Gutierrez, J. C., T. C. Hrubec, M. R. Prater, B. J. Smith, L. E. Freeman a S. D. Holladay (2007). "Aortic and ventricular dilation and myocardial reduction in gestation day 17 icr mouse fetuses of diabetic mothers." *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 79(6): 459-464.
- Harvey, R. P. a N. Rosenthal (1999). *Heart development*, Academic Press.
- Hod, M., L. G. Jovanovic, G. C. Di Renzo, A. De Leiva a O. Langer (2008). *Textbook of diabetes and pregnancy*, second edition, Taylor & Francis.
- Hollenberg, S. M., R. Sternglanz, P. F. Cheng a H. Weintraub (1995). "Identification of a new family of tissue-specific basic helix-loop-helix proteins with a two-hybrid system." *Molecular and cellular biology* 15(7): 3813-3822.
- Iyer, N. V., L. E. Kotch, F. Agani, S. W. Leung, E. Laughner, R. H. Wenger, M. Gassmann, J. D. Gearhart, A. M. Lawler, A. Y. Yu a G. L. Semenza (1998a). "Cellular and developmental control of o₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Genes & development* 12(2): 149-162.
- Iyer, N. V., S. W. Leung a G. L. Semenza (1998b). "The human hypoxia-inducible factor 1alpha gene: Hif1a structure and evolutionary conservation." *Genomics* 52(2): 159-165.
- Jiao, K., H. Kulesa, K. Tompkins, Y. Zhou, L. Batts, H. S. Baldwin a B. L. Hogan (2003). "An essential role of bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse heart." *Genes & development* 17(19): 2362-2367.
- Kotch, L. E., N. V. Iyer, E. Laughner a G. L. Semenza (1999). "Defective vascularization of hif-1alpha-null embryos is not associated with vegf deficiency but with mesenchymal cell death." *Developmental biology* 209(2): 254-267.
- Kreidberg, J. A., H. Sariola, J. M. Loring, M. Maeda, J. Pelletier, D. Housman a R. Jaenisch (1993). "Wt-1 is required for early kidney development." *Cell* 74(4): 679-691.
- Krishnan, J., P. Ahuja, S. Bodenmann, D. Knapik, E. Perriard, W. Krek a J. C. Perriard (2008). "Essential role of developmentally activated hypoxia-inducible factor 1alpha for cardiac morphogenesis and function." *Circulation research* 103(10): 1139-1146.
- Kruithof, B. P., M. J. van den Hoff, A. Wessels a A. F. Moorman (2003). "Cardiac muscle cell formation after development of the linear heart tube." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 227(1): 1-13.
- Kucera, J. (1971). "Rate and type of congenital anomalies among offspring of diabetic women." *The Journal of reproductive medicine* 7(2): 73-82.
- Kumar, S. D., S. T. Dheen a S. S. Tay (2007). "Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development." *Cardiovascular diabetology* 6: 34.
- Kuo, C. T., E. E. Morrisey, R. Anandappa, K. Sigrist, M. M. Lu, M. S. Parmacek, C. Soudais a J. M. Leiden (1997). "Gata4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation." *Genes & development* 11(8): 1048-1060.
- Lenox, L. E., J. M. Perry a R. F. Paulson (2005). "Bmp4 and madh5 regulate the erythroid response to acute anemia." *Blood* 105(7): 2741-2748.

- Li, Q. Y., R. A. Newbury-Ecob, J. A. Terrett, D. I. Wilson, A. R. Curtis, C. H. Yi, T. Gebuhr, P. J. Bullen, S. C. Robson, T. Strachan, D. Bonnet, S. Lyonnet, I. D. Young, J. A. Raeburn, A. J. Buckler, D. J. Law a J. D. Brook (1997). "Holt-oram syndrome is caused by mutations in *tbx5*, a member of the brachyury (*t*) gene family." *Nature genetics* 15(1): 21-29.
- Li, R., M. Chase, S. K. Jung, P. J. Smith a M. R. Loeken (2005). "Hypoxic stress in diabetic pregnancy contributes to impaired embryo gene expression and defective development by inducing oxidative stress." *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 289(4): E591-599.
- Liao, J., L. Kochilas, S. Nowotschin, J. S. Arnold, V. S. Aggarwal, J. A. Epstein, M. C. Brown, J. Adams a B. E. Morrow (2004). "Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/digeorge syndrome mouse models by altering *tbx1* dosage." *Human molecular genetics* 13(15): 1577-1585.
- Liberatore, C. M., R. D. Searcy-Schrick a K. E. Yutzey (2000). "Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal heart chamber development." *Developmental biology* 223(1): 169-180.
- Lin, Q., J. Schwarz, C. Bucana a E. N. Olson (1997). "Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor *mef2c*." *Science* 276(5317): 1404-1407.
- Lints, T. J., L. M. Parsons, L. Hartley, I. Lyons a R. P. Harvey (1993). "Nkx-2.5: A novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants." *Development* 119(2): 419-431.
- Lough, J. a Y. Sugi (2000). "Endoderm and heart development." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 217(4): 327-342.
- Lyons, I., L. M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J. E. Andrews, L. Robb a R. P. Harvey (1995). "Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *nkx2-5*." *Genes & development* 9(13): 1654-1666.
- Manalo, D. J., A. Rowan, T. Lavoie, L. Natarajan, B. D. Kelly, S. Q. Ye, J. G. Garcia a G. L. Semenza (2005). "Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by *hif-1*." *Blood* 105(2): 659-669.
- Martinez-Estrada, O. M., L. A. Lettice, A. Essafi, J. A. Guadix, J. Slight, V. Velecela, E. Hall, J. Reichmann, P. S. Devenney, P. Hohenstein, N. Hosen, R. E. Hill, R. Munoz-Chapuli a N. D. Hastie (2010). "Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of *snail* and *e-cadherin*." *Nature genetics* 42(1): 89-93.
- Martinez-Frias, M. L. (1994). "Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: Identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies." *American journal of medical genetics* 51(2): 108-113.
- McFadden, D. G., A. C. Barbosa, J. A. Richardson, M. D. Schneider, D. Srivastava a E. N. Olson (2005). "The *hand1* and *hand2* transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner." *Development* 132(1): 189-201.
- Miquerol, L., B. L. Langille a A. Nagy (2000). "Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression." *Development* 127(18): 3941-3946.
- Misra, C., N. Sachan, C. R. McNally, S. N. Koenig, H. A. Nichols, A. Guggilam, P. A. Lucchesi, W. T. Pu, D. Srivastava a V. Garg (2012). "Congenital heart disease-causing *gata4* mutation displays functional deficits in vivo." *PLoS genetics* 8(5): e1002690.
- Molkentin, J. D. (2000). "The zinc finger-containing transcription factors *gata-4*, *-5*, and *-6*. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression." *The Journal of biological chemistry* 275(50): 38949-38952.
- Molkentin, J. D., Q. Lin, S. A. Duncan a E. N. Olson (1997). "Requirement of the transcription factor *gata4* for heart tube formation and ventral morphogenesis." *Genes & development* 11(8): 1061-1072.
- Moore, A. W., L. McInnes, J. Kreidberg, N. D. Hastie a A. Schedl (1999). "Yac complementation shows a requirement for *wt1* in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis." *Development* 126(9): 1845-1857.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn a H. Erlich (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction." *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 51 Pt 1: 263-273.
- Nowak, D. G., J. Woolard, E. M. Amin, O. Konopatskaya, M. A. Saleem, A. J. Churchill, M. R. Lodomery, S. J. Harper a D. O. Bates (2008). "Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of *vegf* is differentially regulated by splicing and growth factors." *Journal of cell science* 121(Pt 20): 3487-3495.

- Oka, T., M. Maillet, A. J. Watt, R. J. Schwartz, B. J. Aronow, S. A. Duncan a J. D. Molkentin (2006). "Cardiac-specific deletion of *gata4* reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability." *Circulation research* 98(6): 837-845.
- Okazaki, K. a E. Maltepe (2006). "Oxygen, epigenetics and stem cell fate." *Regenerative medicine* 1(1): 71-83.
- Pane, L. S., Z. Zhang, R. Ferrentino, T. Huynh, L. Cutillo a A. Baldini (2012). "*Tbx1* is a negative modulator of *mef2c*." *Human molecular genetics* 21(11): 2485-2496.
- Pavlinkova, G., J. M. Salbaum a C. Kappen (2009). "Maternal diabetes alters transcriptional programs in the developing embryo." *BMC genomics* 10: 274.
- Radisky, D. C. (2005). "Epithelial-mesenchymal transition." *Journal of cell science* 118(Pt 19): 4325-4326.
- Riley, P., L. Anson-Cartwright a J. C. Cross (1998). "The *hand1* bhlh transcription factor is essential for placentation and cardiac morphogenesis." *Nature genetics* 18(3): 271-275.
- Risebro, C. A., N. Smart, L. Dupays, R. Breckenridge, T. J. Mohun a P. R. Riley (2006). "*Hand1* regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart." *Development* 133(22): 4595-4606.
- Rivera-Feliciano, J., K. H. Lee, S. W. Kong, S. Rajagopal, Q. Ma, Z. Springer, S. Izumo, C. J. Tabin a W. T. Pu (2006). "Development of heart valves requires *gata4* expression in endothelial-derived cells." *Development* 133(18): 3607-3618.
- Ruas, J. L. a L. Poellinger (2005). "Hypoxia-dependent activation of *hif* into a transcriptional regulator." *Seminars in cell & developmental biology* 16(4-5): 514-522.
- Rudat, C. a A. Kispert (2012). "*Wt1* and epicardial fate mapping." *Circulation research* 111(2): 165-169.
- Sadler, T. W. (1997). "Mouse embryos in culture: Models for understanding diabetes-induced embryopathies and gene function." *The International journal of developmental biology* 41(2): 291-297.
- Salbaum, J. M. a C. Kappen (2010). "Neural tube defect genes and maternal diabetes during pregnancy." *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* 88(8): 601-611.
- Savolainen, S. M., J. F. Foley a S. A. Elmore (2009). "Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on e11.5 to e18.5." *Toxicologic pathology* 37(4): 395-414.
- Scholz, H. a K. M. Kirschner (2005). "A role for the wilms' tumor protein *wt1* in organ development." *Physiology (Bethesda)* 20: 54-59.
- Snarr, B. S., C. B. Kern a A. Wessels (2008). "Origin and fate of cardiac mesenchyme." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237(10): 2804-2819.
- Srivastava, D. (1999). "Hand proteins: Molecular mediators of cardiac development and congenital heart disease." *Trends in cardiovascular medicine* 9(1-2): 11-18.
- Srivastava, D., P. Cserjesi a E. N. Olson (1995). "A subclass of bhlh proteins required for cardiac morphogenesis." *Science* 270(5244): 1995-1999.
- Srivastava, D., T. Thomas, Q. Lin, M. L. Kirby, D. Brown a E. N. Olson (1997). "Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bhlh transcription factor, *dhand*." *Nature genetics* 16(2): 154-160.
- Subramanian, S. V. a B. Nadal-Ginard (1996). "Early expression of the different isoforms of the myocyte enhancer factor-2 (*mef2*) protein in myogenic as well as non-myogenic cell lineages during mouse embryogenesis." *Mechanisms of development* 57(1): 103-112.
- Sun, Y., X. Liang, N. Najafi, M. Cass, L. Lin, C. L. Cai, J. Chen a S. M. Evans (2007). "Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells." *Developmental biology* 304(1): 286-296.
- Tanaka, M., Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki a S. Izumo (1999). "The cardiac homeobox gene *csx/nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development." *Development* 126(6): 1269-1280.
- Thomas, T., H. Yamagishi, P. A. Overbeek, E. N. Olson a D. Srivastava (1998). "The bhlh factors, *dhand* and *ehand*, specify pulmonary and systemic cardiac ventricles independent of left-right sidedness." *Developmental biology* 196(2): 228-236.
- Tirziu, D., F. J. Giordano a M. Simons (2010). "Cell communications in the heart." *Circulation* 122(9): 928-937.
- Uchimura, T., Y. Komatsu, M. Tanaka, K. L. McCann a Y. Mishina (2009). "*Bmp2* and *bmp4* genetically interact to support multiple aspects of mouse development including functional heart development." *Genesis* 47(6): 374-384.
- Wagner, K. D., N. Wagner, S. Wellmann, G. Schley, A. Bondke, H. Theres a H. Scholz (2003). "Oxygen-regulated expression of the wilms' tumor suppressor *wt1* involves hypoxia-inducible factor-1

- (hif-1)." FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17(10): 1364-1366.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue a G. L. Semenza (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular o2 tension." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(12): 5510-5514.
- Wessels, A. a D. Sedmera (2003). "Developmental anatomy of the heart: A tale of mice and man." Physiological genomics 15(3): 165-176.
- World Health Organization (WHO) (1999). Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva.
- Winnier, G., M. Blessing, P. A. Labosky a B. L. Hogan (1995). "Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse." Genes & development 9(17): 2105-2116.
- Wren, C., G. Birrell a G. Hawthorne (2003). "Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers." Heart 89(10): 1217-1220.
- Wu, S. M., Y. Fujiwara, S. M. Cibulsky, D. E. Clapham, C. L. Lien, T. M. Schultheiss a S. H. Orkin (2006). "Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart." Cell 127(6): 1137-1150.
- Zaffran, S. a M. Frasch (2002). "Early signals in cardiac development." Circulation research 91(6): 457-469.
- Zhang, Z. a A. Baldini (2008). "In vivo response to high-resolution variation of tbx1 mrna dosage." Human molecular genetics 17(1): 150-157.
- Zhu, H., A. V. Garcia, R. S. Ross, S. M. Evans a K. R. Chien (1991). "A conserved 28-base-pair element (hf-1) in the rat cardiac myosin light-chain-2 gene confers cardiac-specific and alpha-adrenergic-inducible expression in cultured neonatal rat myocardial cells." Molecular and cellular biology 11(4): 2273-2281.