

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Peter Hámor

Vliv dávkování genu *Nkx2.5* na vývoj a elektrofyzilogii srdce u myši

Role of *Nkx2.5* on development and electrophysiology of the mouse heart

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. David Sedmera, Ph.D., Dr.Sc., DSc.

Praha, 2015

Prohlášení

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

V Praze, 11.8.2015

Podpis

Podakovanie

Chcel by som sa poďakovať predovšetkým vedúcemu mojej diplomovej práce, prof. Davidovi Sedmerovi, Ph.D., Dr.Sc., DSc, za poskytnutie nekončiacej pomoci v hľadaní nového, Marii Jindrákové za starostlivosť o zvieratá a prípravu chemikálií, Eliške Krejčí a Kláre Krausové za genotypizáciu, Aleně Kvasilové za koordináciu a udržiavanie laboratória, prípravu prostriedkov na experimenty a Tomášovi Kučerovi za poskytnutie prístupu na konfokálny mikroskop. Taktiež chcem poďakovať svojim rodičom a starým rodičom za veľkú podporu vo všetkých smeroch a priateľom za podporu pri písaní tejto práce.

ABSTRAKT

Cieľom tejto práce je skúmanie vplyvu dávkovania génu *Nkx2.5* na elektrofyziológiu srdca myší v prenatalnom období vývoja, v ktorom dochádza ku skolabovaniu jeho fyziologických funkcií. Hlavnou úlohou je hľadanie rozdielov vo vedení elektrického vzruchu v srdci myších embryí v závislosti na ich genotype. Bola na to použitá špecifická metóda snímania prechodu elektrického vzruchu myokardom, tzv. optické mapovanie. Vďaka tejto metóde bolo možné vytvoriť obrázky a videá zachytávajúce prechod elektrického impulzu srdcom, s označením začiatku a smerovania jeho vedenia. Z výstupov týchto snímaní, optických máp, sú určené prípadné anomálie a výchyľky v porovnaní s normálnou funkciou srdca.

Práca sa zameriava na expresiu transkripčného faktoru *Nkx2.5* a s ním súvisiacich regulačných prvkov, ktoré sa podieľajú na správnom formovaní a fyziológii srdca do obdobia vývoja približne 9,5 dní *post coitum* (d.p.c). Jedinci v tomto vývojovom štádiu boli opticky mapovaní a porovnávaní na základe ich genotypu – homozygotne nemutantné, heterozygotné a homozygotne mutantné myšie embryá vykazovali určité podobné vlastnosti, kým v niektorých sa dramaticky líšili.

Keďže táto práca je jedna z mála, ktorá detailne skúma optické mapy homozygotne mutantných jedincov v géne *Nkx2.5*, výsledky z nej plynúce sú možným začiatkom podrobného hľadania abnormalít fenotypu súvisejúcim s týmto transkripčným faktorom. Určenie miesta tohto génu v regulačnej sieti vývoja srdca môže dopomôcť k bližšiemu pochopeniu vrodených srdcových porúch, v ktorých hrá poškodenie tohto génu úlohu.

KĹÚČOVÉ SLOVÁ

Nkx2.5, optické mapovanie, myš, embryo, srdce, elektrofyziológia srdca, vývoj srdca, srdcový prevodový systém, dávkovanie génu, transkripčný faktor, vrodené srdcové poruchy.

ABSTRACT

The objective of this thesis is to investigate the role of *Nkx2.5* gene dosage on electrophysiology of the mouse heart in prenatal stage of its development, in which the physiological functions of the heart fail to function properly. The main goal of this work is to search for differences in conduction of electric impulses through the embryonic mouse heart according to their genotype. Special method of capturing the conduction of electric impulse through myocardium was used for this purpose, called optical mapping. Thanks to this method I was able to construct images and videos capturing transition of the impulse with marked beginning of the activation and its direction in the heart. These outputs, or optical maps, help to define anomalies and defects compared with a normal functioning heart.

The thesis focuses on the expression of the transcription factor *Nkx2.5* and regulatory components related with the correct formation and physiology of the heart until 9.5 days *post coitum*. Individuals in this developmental stage were optically mapped and compared according to their genotypes – homozygous non-mutant, heterozygote and homozygous mutant mouse embryos exhibited some degree of similarity, while other characteristics were dramatically different.

Considering this work as one of a few examining optical maps of homozygous mutant individuals in *Nkx2.5* gene in detail, its results may be a beginning of elaborated search for abnormalities in phenotype correlating with this transcriptional factor. Defining the place of this gene in the complex regulatory network may help to deepen the understanding of congenital heart diseases, where the gene plays significant role.

KEY WORDS

Nkx2.5, optical mapping, mouse, embryo, heart, heart electrophysiology, heart development, cardiac conduction system, gene dosage, transcriptional factor, congenital heart diseases.

OBSAH

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	3
ÚVOD	4
1. TEORETICKÝ ÚVOD	5
1.1. Kardiogenéza	5
1.2. Gén <i>Nkx2.5</i>	7
1.2.1. Úvod	7
1.2.2. Chromozómové umiestnenie	7
1.2.3. Regulácia.....	9
1.2.3.1. Regulačné oblasti.....	9
1.2.3.2. Chromatínové modifikácie	9
1.2.3.3. Fosforylácia.....	10
1.2.4. Mutagenicita	10
1.3. Proteín <i>Nkx2.5</i>	11
1.3.1. Štruktúra proteínu.....	11
1.3.1.1. Homeoboxová doména – HD	13
1.3.1.2. Doména bohatá na tyrozíny – YRD.....	15
1.3.2. Homodimerizácia.....	16
1.3.3. Posttranslačné modifikácie	16
1.3.3.1. Fosforylácia.....	16
1.3.3.2. Sumoylácia.....	17
1.3.4. Väzba na DNA	18
1.3.5. Miesto expresie	19
1.3.6. Interakcia s inými génmami a proteínmi	20
1.3.6.1. GATA-4.....	21
1.3.6.2. Mef2c.....	22
1.3.7. Vplyv <i>Nkx2.5</i> na vývoj srdca	23
1.3.8. Progenitorová úloha	24
1.3.9. Fenotyp <i>Nkx2.5</i> mutantov	26
1.3.10. Vplyv na prevodový systém.....	28
1.3.11. Mutácie <i>Nkx2.5</i> a fenotyp prevodového systému	30
1.3.12. Regulácia iných génov	31
1.3.13. Poruchy srdca a jeho vývoja	34

1.3.13.1.	Haploinsuficiencia.....	34
1.3.13.2.	Knock-out	35
1.3.13.3.	Nadexpresia Nkx2.5.....	36
1.3.14.	Vrodené poruchy u ľudí.....	37
2.	METODIKA PRÁCE.....	38
2.1.	Konštrukcia <i>Nkx2.5^{GFP}</i> alel	38
2.2.	Disekcia myších embryí	39
2.3.	Farbenie.....	39
2.4.	Optické mapovanie.....	41
2.5.	Analýza dát	42
2.6.	Prejasňovanie	42
2.7.	Konfokálna mikroskopia	43
3.	VÝSLEDKY.....	44
3.1.	Genotypizácia	44
3.1.1.	Wild-type	44
3.1.2.	Heterozygoti	46
3.1.3.	Knock-out	47
3.1.4.	Mendelovská dedičnosť	49
3.2.	Optické mapovanie.....	49
3.2.1.	Wild-type	50
3.2.2.	Heterozygoti	52
3.2.3.	Knock-out	54
3.3.	Rýchlosť šírenia elektrického vzruchu	55
3.4.	Rýchlosť kontrakcií	57
4.	DISKUSIA.....	59
5.	ZÁVER	67
6.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	68

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AV	atrioventricular	predsieňovo-komorový
ASD	atrial septal defects	poruchy priehradky predsiení
AVSD	atrioventricular septal defects	poruchy predsieňovo-komorovej priehradky
ANF	atrial natriuretic factor	predsieňový natriuretický faktor
BNP	brain natriuretic peptid	mozgový natriuretický peptid
d.p.c.	days post coitum	dní po párení
GFP	green fluorescent protein	zelený fluorescenčný proteín
HD	homeobox domain	homeoboxová doména
NK2-SD	NK2 specific domain	NK2 špecifická doména
SAN	sinoatrial node	sinoatriálny uzol
SRF	serum response factor	
SUMO	small ubiquitin-like modifier	malý signálny proteín podobný ubikvitínu
TEM	transmission electron microscopy	transmisná elektrónová mikroskopia
TN	tinman domain	tinman doména
VSD	ventricular septal defects	poruchy komorovej priehradky
YRD	tyrosine-rich domain	doména bohatá na tyrozín

ÚVOD

Srdce je prvým funkčným orgánom vo vyvíjajúcich sa embryách, pretože prísun kyslíku a živín skrz obehový systém je predpokladom pre správny rast embrya a jeho prežitie. Formovanie srdca zahŕňa detailne koordinovaný proces bunkovej diferenciácie a integrovanej mnohobunkovej morfogénzy, pričom aj krátke narušenie týchto procesov môže viesť k vývoju vrodených srdcových porúch. Komplexná regulačná sieť, ktorá má pod kontrolou procesy vývoja srdca, jeho formovanie a funkcie, má viacero faktorov zúčastňujúcich sa správneho vývoja.

Jedným z týchto hlavných prvkov je evolučne konzervovaný homeoboxový transkripčný faktor *Nkx2.5*, ktorý sa podieľa na správnom vývoji srdca a jeho funkčných častí zodpovedných za správny vývoj štruktúr prevodového systému. Zohráva kritickú úlohu v kontrole srdcového vývojového programu a v transkripčnej regulácii počas kardiogenézy a adaptívneho procesu v dospelých srdciach. Tento transkripčný faktor je nevyhnutný pre normálny vývoj srdca a mutácie v tomto géne sú spojované s vrodenými srdcovými poruchami. (Akazawa & Komuro, 2005). Mutácie môžu tento gén buď poškodiť, čím sa exprimuje nesprávny variant proteínu, alebo zmeniť silu jeho expresie. Následky môžu byť rôzne od úmrtia pred narodením až po vývoj vrodených srdcových porúch v priebehu života. Niektoré mutácie však nemusia mať žiaden negatívny fenotypový prejav. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010; Benson, et al., 1999; Schott, et al., 1998) Ďalším faktorom v rámci srdcových porúch je dávkovanie génu, či už ide o jeho mutovaný alebo nepoškodený variant. Rôzne mutácie môžu prepuknúť do fenotypu, ktorý má rôzne formy závažnosti ako v embryonálnom vývoji, tak aj v dospelosti jedinca.

Vďaka pokročilým technikám sledovania prenosu elektrického vzruchu je možné sledovať fenotypové prejavy mutácii a dávkovania génu *Nkx2.5* v ešte žijúcich srdciach. Týmto spôsobom sa sledujú poruchy v elektrofyziológii a morfológii srdcového tkaniva, ktoré môžu byť dôvodom srdcových porúch. Jednou z týchto porúch je absencia trabekulovej siete (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999), morfologickej funkčnej štruktúry, ktorá sa podieľa na správnom prúde krvi v embryu. Predpokladá sa, že je to hlavný dôvod zlyhania srdca v prenatálnych vývojových štádiách.

1. TEORETICKÝ ÚVOD

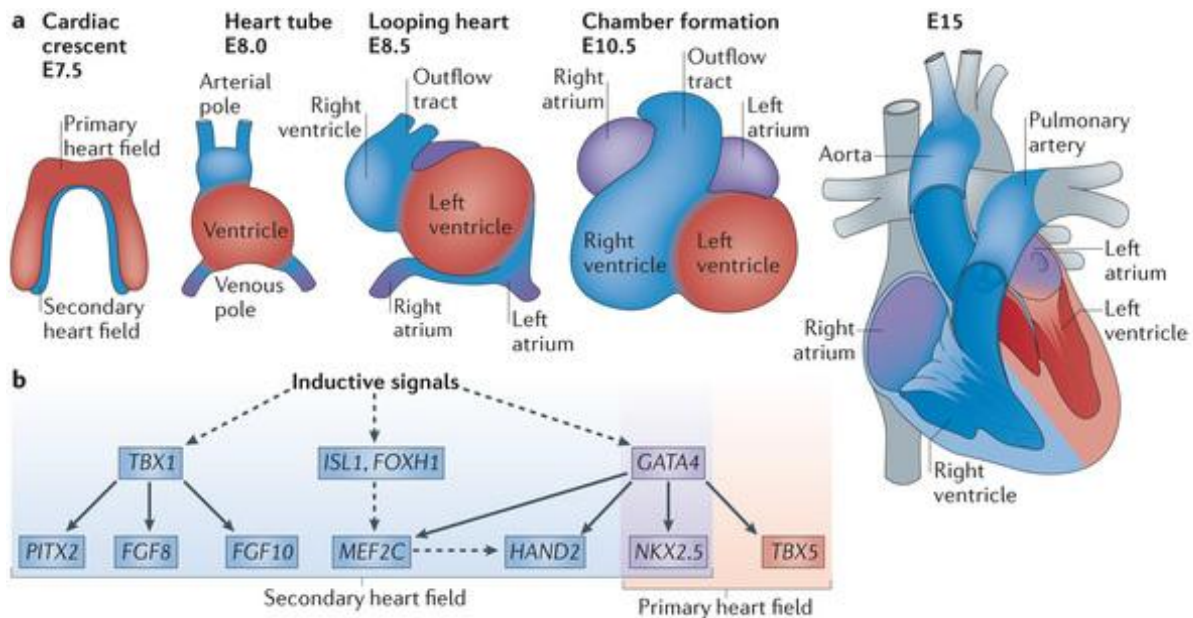
1.1. Kardiogenéza

Srdce je jedným z životne dôležitých orgánov živočíchov. Zabezpečuje cirkuláciu krvi v kardiovaskulárnom systéme a tak prísun kyslíku a roznášanie živín po celom organizme. Podieľa sa na odvádzaní metabolických produktov orgánov a tkanív tela a tak prispieva k udržiavaniu homeostázy. Vďaka obsahu buniek a faktorov imunitného systému v krvi je súčasťou systému imunity. Ide o dutý svalový orgán s niekoľkými prírodnými a odvodovými časťami, a jeho dutá vnútorná časť je u cicavcov a vtákov rozdelená priehradkami na štyri časti – dve predsieňe a dve komory. (Crick, Sheppard, Ho, Gebstein, & Anderson, 1998)

Pravá predsieň je napojená na pravú komoru a ľavá predsieň na ľavú komoru. Pravá polovica srdca odčerpáva krv z tela cez pľúca do ľavej polovice, ktorá pumpuje krv do zvyšku tela. Obe polovice môžu tlčiť iba v synchronizácii, pravá polovica pumpujúca pľúcnu cirkuláciu a ľavá polovica systémovú. Tento paralelne orientovaný, štvorkomorový systém srdca sa vyvíja zo srdcovej trubice, ktorá funguje ako jednokomorová pumpa. (Moorman & Christoffels, 2003)

Bunky určené k formovaniu srdca vznikajú z mezodermálneho tkaniva už v procese gastrulácie, ktorý nastáva u myší siedmi deň po oplodnení. Prvotná srdcová trubica sa začína vyvíjať u myších embryí v štádiu pred ôsmym dňom vývoja, medzi 8 a 9 dňom je už formovaná spojením myokardializovaných častí stien bilaterálnych intraembryonických celómických dutín. Okolo tohto obdobia začínajú prvé kontrakcie, ktoré sú najskôr náhodné a neskôr sa synchronizujú. Po tomto období sa začína srdcová trubica ohýbať, kým jej vnútorná štruktúra obsahuje jedinú dutinu. Po úplnom ohybe trubice následne začínajú srdcia vykazovať prvé známky formovania predsiení a komôr a bunková vrstva myokardu začína naberať na hrúbke. Následne medzi dňami 9,5 a 12,5 dochádza k exprimovaniu molekulárnych markerov súvisiacich s formovaním srdcových dutín. Z veľkého alebo vonkajšieho zaoblenia sa vytvárajú srdcové komory a predsieňe. Vnútorné zaoblenie je spojením medzi prvotným myokadom budúcej predsienie, atrioventrikulárnym (AV) kanálom a vývodovým traktom. Nasleduje vývoj trabekulovej siete a septácia. (Sizarov, a iní, 2011)

Po nasledujúcich zahnutiach srdcovej trubice, určení ľavo-pravej symetrie, predĺžení srdcovej trubice v oboch smeroch a odstránení vnútorného srdcového rôsolu dosahuje srdce podobnosti dospelého srdca. V tejto práci sa zameriavam na myšie embryá v období 9,5 d.p.c., preto je táto teoretická časť kardiogenézy obmedzená na vývoj srdca do tohto obdobia.



Obrázok 1: a) V 7,5 embryonálnom dni sa formuje srdcový polmesiac z dvoch populácií srdcových progenitorových buniek – z tzv. dvoch srdcových polí. V ôsmom dni bunky zo srdcového polmesiacu migrujú do stredovej oblasti, kde vytvárajú lineárnu srdcovú trubicu. Následne sa predná a zadná časť srdcovej trubice rozšíri vďaka migrácii buniek z druhého srdcového poľa, čím sa vytvárajú oblasti zakladajúce žilové a tepnové póly. Nasleduje ohyb trubice smerom doprava, čo dopomáha k formovaniu primitívnych komôr a predsiení. Žilový pól sa presúva do prednej časti, čo vedie k správnej umiestneniu budúcich komôr a ich správnej vývoju v dni 10,5. Dospievanie srdca nastáva vytváraním priehradiek v oblasti komôr, predsiení a chlopní v 15. dni. Prvé srdcové pole napomáha k vývoji ľavej predsene a oboch komôr. Druhé srdcové pole podporuje vývoj pravej predsene, vývodového systému a oboch komôr. b) Formovanie cicavčieho srdca je kontrolované regulačnou sieťou faktorov v prvom a druhom srdcovom poli. Regulačné udalosti a bunkové presuny, ktoré kontrolujú kardiogenézu sú regulované časovo a priestorovo komplexnou signalizačnou sieťou. GATA4 a Nkx2.5 sú hlavnými transkripčnými faktormi nachádzajúcimi sa v oboch srdcových poliach. Ďalšie hlavné molekuly zúčastnené v regulačnej sieti kardiogenézy a ich vzájomná interakcia sú zobrazené podľa ich priestorovej expresie – v modrom bloku sa nachádzajú prvky exprimované v druhom srdcovom poli, v červenom exprimované v prvom srdcovom poli. Fialová oblasť obsahujúca GATA4 a Nkx2.5 označuje priestorovú expresiu v oboch srdcových poliach. (Xin, Olson, & Bassel-Duby, 2013)

1.2. Gén *Nkx2.5*

1.2.1. Úvod

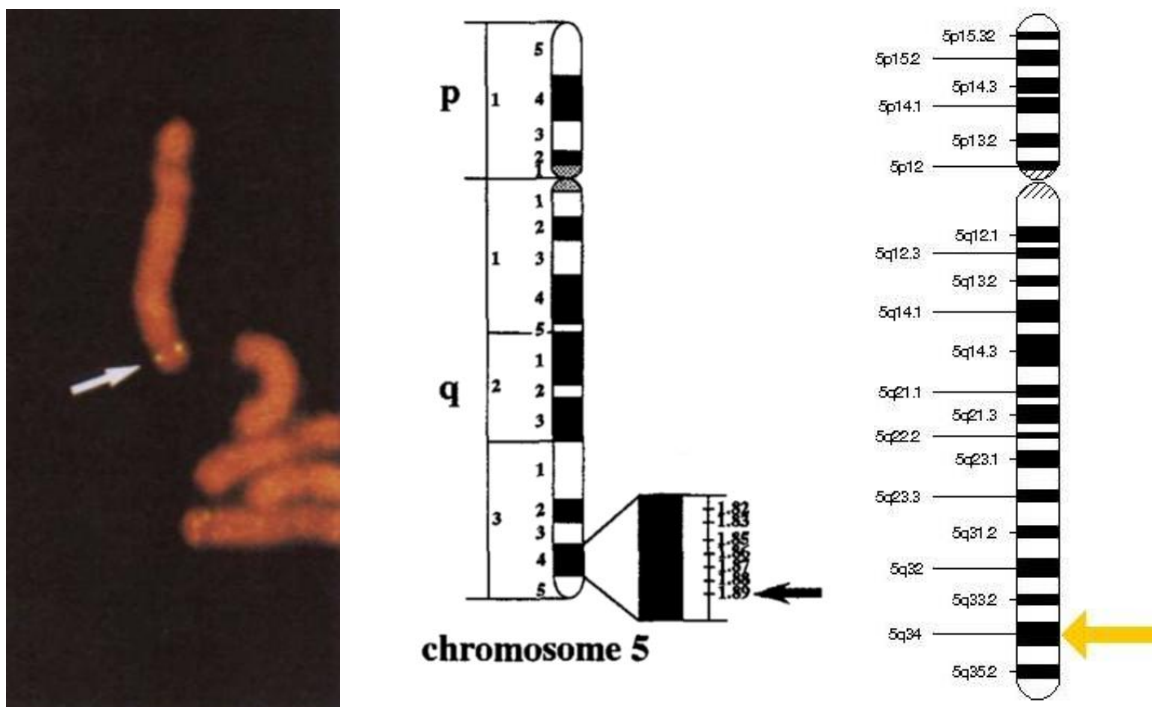
Evolučne konzervovaný gén *Nkx2.5* kódujúci homeoboxový transkripčný faktor je v prvej línii výskumu biológie srdca. Pomáha odhaľovať molekulárne mechanizmy vývoja srdca a jeho porúch, je nevyhnutný pre správny vývoj srdca a mutácie tohto génu sa spájajú s jeho vrodenými poruchami. (Akazawa & Komuro, 2005) Má myogenickú a morforegulačnú úlohu vo vývoji srdca. (Biben & Harvey, 1997) Tento gén je esenciálny pre formovanie, dospievanie a udržiavanie prevodového systému srdca a tiež reguluje množstvo buniek v prevodnom systéme srdca závislých na dávkovaní génu. (Jay, a iní, 2004) Je jedným z prvých génov exprimovaných v srdcovej oblasti embrya a je detekovateľný už v siedmom dni embryonálneho vývoja. Rovnako sa v tomto období aktivujú aj regulačné elementy v prednej časti srdcového polmesiaca, čo môže naznačovať prvotnú aktiváciu v srdcových progenitoroch. (Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998) V dospelom srdci hrá tento gén dôležitú úlohu v ochrane myokardu pred cytotoxickým poškodením. (Akazawa & Komuro, Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy, 2003)

Štyri homeoboxové gény rodiny NK boli najskôr identifikované u *Drosophila*, s najznámejším homológom ľudského *Nkx2.5* nazývaného *tinman*. Táto rodina génov je rozdelená na dve podkategórie, NK1 (*NK1* a jeho homológy) a NK2 (*NK2*, *NK3*, *NK4* a ich homológy). (Harvey, 1996) Pôvodný názov génu *Csx* (cardiac-specific homeobox) ukazuje na jeho dôležitú biologickú úlohu v myokardiálnej bunkovej línii. Jeho súčasný názov pochádza z taxonomického zaradenia ako piateho génu stavovcov, ktorý bol v rodine NK-2 homeoboxových génov identifikovaný. (Lints, Parsons, Hartley, Lyons, & Harvey, 1993) V súčasnosti sa používa viacero označení, ako sú *Nkx2-5*, *Csx*, *Csx1*, *Nkx-2.5*, *Nkx2E* a iné.

1.2.2. Chromozómové umiestnenie

Umiestnenie génu na jemu príslušnom chromozóme bolo zistené na základe fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (FISH) na metafáznych chromozómoch získaných zo samčích lymfocytov. Ľudský gén *Nkx2.5* sa nachádza na piatom chromozóme v časti 5q34 na hranici s 5q35 (Shiojima, a iní, 1995) a skladá sa z dvoch exónov. (Gioli-Pereira,

a iní, 2010) U myši sa nachádza na 17. chromozóme. (Lyons, a iní, 1995) Testovanie ľudskej cDNA knižnice srdcovej komory pomocou myšej *Nkx2.5* próby odhalil jediný transkript tohto génu do mRNA. Sekvenčná analýza ukázala, že obsahuje jeden otvorený čítací rámec so START kodónom, ktorému predchádza Kozakova sekvencia. Hybridizácia ľudskeho genomického Southern blotu s próbami obsahujúcimi cDNA, homeobox a NK2 box ukazuje, že *Nkx2.5* by mohol mať v ľudskom genóme jediný lokus, ale pravdepodobne sa v ňom nachádzajú ďalšie gény, ktoré môžu obsahovať podobnosť v homeoboxovej alebo NK2 doméne. (Turbay, Wechsler, Blanchard, & Izumo, 1996)



Obrázok 2: Prvé označenie umiestnenia génu *Nkx2.5* (vľavo) a jeho priradenie v genetickej mape ľudského piateho chromozómu s vyznačenou oblasťou umiestnenia (stred). (Shiojima, a iní, 1995) Súčasné označenie umiestnenia tohto génu (vpravo). (ghr.nlm.nih.gov)

Hox gény je skupina príbuzných génov, ktoré sa podieľajú na kontrole riadenia vývoja embrya v ose od hlavy k chvostu. Neskôr *Hox* proteíny určujú, aká štruktúra sa v ktorom segmente tela bude vyvíjať. Podieľajú sa tak na určovaní umiestnenia jednotlivých štruktúr, nie však na ich samotnom vytváraní. (Pearson, Lemons, & McGinnis, 2005) Keďže trieda génov *Hox* sa nachádza vo forme zhlukov na štyroch ďalších chromozómoch, indikuje to nepríbuznosť *Hox* a génu *Nkx2.5* v rámci chromozomálneho umiestnenia. Prítomnosť génu *Msx2* v rovnakej chromozómovej

oblasti ako gén *Nkx2.5* naznačuje možnú spoločnú reguláciu týchto génov pri formovaní ľudského srdca, pričom obmedzenejší vzorec expresie *Msx2* v porovnaní s *Nkx2.5* môže poukazovať na jeho priamu či nepriamu reguláciu týmto génom vo vyvíjajúcom sa srdci. (Shiojima, a iní, 1995)

1.2.3. Regulácia

Časopriestorová a kvantitatívna regulácia srdcových transkripčných faktorov musí prebiehať v správnom poradí, aby zabezpečila správnu reguláciu downstreamových cieľov. V promotóroch srdcových transkripčných faktorov existujú regulačné prvky, ktorých účelom je aktivácia alebo represia týchto génov. (Bruneau, Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis, 2002)

1.2.3.1. Regulačné oblasti

Blízka promótorová sekvencia v oblasti -959 bp od génu *Nkx2.5* nie je dostatočná pre aktiváciu génov spojených s kardiogenezou. Ďalšie regulačné prvky medzi -3059 a -959 bp sú kritické pre správnu génovú expresiu. V oblasti medzi -3059 a -2554 je niekoľko väzbových miest pre známe regulátory expresie srdcových génov, ako je GATA, Hox a HMG. Zvyšných 1,5 kbp obsahuje jedno miesto pre GATA, jedno *Nkx* a kombináciu NKE/GATA. Prítomnosť zhlukov týchto väzbových miest pre niekoľko vývojovo dôležitých regulačných faktorov medzi -3059 a -2554 predpokladá dôležitú úlohu tejto oblasti pre raný srdcový vývoj. Ich narušenie spôsobuje stratu génovej aktivity v hltane, srdci a slezine. Závislosť *Nkx2.5* na týchto vzdialených prvkoch s GATA väzbovými miestami ukazuje na možnú reguláciu *Nkx2.5* pomocou faktorov GATA. (Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998)

1.2.3.2. Chromatínové modifikácie

Histónová acetylácia nedávno objavených enhancerov *Nkx2.5* je vývojovo regulovaná a tkanivovo špecifická. Vzory acetylácie korelujú s priestorovou a časovou aktiváciou týchto enhancerových prvkov na chromozóme. Histónová acetylácia hrá úlohu v regulácii expresie *Nkx2.5* cez moduláciu aktivácie jeho enhancerov. (Chi, a iní, 2005) Práve acetylácia a deacetylácia vyzerá byť kľúčová v regulácii expresie *Nkx2.5*. Hyperacetylácia H3 a H4 histónov sa rozlieha do okolného DNA, čo má za následok široké efekty, nie len ovplyvnenie samostatného *Nkx2.5*. (Liu, a iní, 2009)

1.2.3.3. Fosforylácia

PI-3 kináza by mohla byť zodpovedaná za reguláciu expresie Nkx2.5 počas diferenciácie kardiomyocytov cez BMP-Smad signalizačnú dráhu a to takým spôsobom, kde je táto kináza aktivovaná stimuláciou BMP a pozitívne reguluje BMP-Smad signálnu dráhu premiestnením proteínu Smad do jadra bunky. Inhibítory PI-3 kinázy potlačujú diferenciáciu buniek do kardiomyocytov cez špecifickú inhibíciu kinázovej aktivity, čo znamená že PI-3 kináza hrá dôležitú úlohu v tejto diferenciácii zmenou expresie transkripčných faktorov GATA-4 a Nkx2.5. Aktivácia PI-3 kinázou je dôležitá už v skorom štádiu vývoja srdca, a to v období prvých štyroch dní. Pokusy ukázali, že samotné zablokovanie aktivácie PI-3 kinázy nestačí na zastavenie proliferácie kardioblastov alebo na spustenie ich apoptózy v prvotných štádiách diferenciácie kardiomyocytov *in vitro*. (Naito, a iní, 2003) BMP signalizácia skrz Smad1/5/8 fosforyláciu je v mutantnom perikardiálnom mezoderme taktiež zvýšená. (Prall, a iní, 2007) Tento typ signalizácie je zásadný pre schopnosť Nkx2.5 aktivovať srdcový α -aktín, GATA-4 a aj vlastnú aktiváciu Nkx2.5 ústiacu do ich zvýšenej expresie a kardiomyogenézy. (Jamali, Karamboulas, Rogerson, & Skerjanc, 2001)

1.2.4. Mutagenicita

Do roku 2004 bolo identifikovaných 35 mutácií typu SNP (single nucleotide polymorphism). Niekoľko dôkazov naznačuje somatický pôvod mutácií v *Nkx2.5*, ktoré vznikli počas bunkového delenia a sú dôsledkom chýb sprevádzajúcich tento dej. Napríklad je nepravdepodobné, že by sa niekoľko nesynonymických mutácií (mutácie, ktoré vedú k zmene aminokyselinových zvyškov reťazca proteínu) nachádzalo u jedného pacienta ako vrodené chyby. Do roku 2010 bolo vydaných minimálne 28 štúdií s analýzami *Nkx2.5* mutácií v spojení s vrodenými poruchami srdca. Do tohto data sa našlo minimálne 41 nesynonymických mutácií, z nich bolo 25 v rodinných anamnézách, 14 náhodných a 2 patriace do oboch týchto skupín. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010)

Bolo opísané veľké množstvo mutácií *Nkx2.5* a časom pribúdajú nové. Heterozygotné mutácie v géne *Nkx2.5* majú za závažný následok atrioventrikulárny (AV) prevodový blok. Pacienti s týmto defektom majú tiež poruchy sieňovej priehradky. (Schott, a iní, 1998) Príbuzní týchto pacientov majú vrodené srdcové deformácie vrátane

poruchy komorovej priehradky a Fallotovej tetralógie. Niektoré poruchy komorovej priehradky súvisia s dvojvýtokovou pravou komorou a Ebsteinovou anomáliou. (Benson, a iní, 1999)

Niektoré mutácie menia miesto väzby restriktívneho enzýmu. Jedna missense mutácia (zaradenie odlišného aminokyselinového zvyšku do proteínu) predpokladá zmenu kodónu v 5' koncovej oblasti a niekoľko ďalších missense mutácií s predpokladanou zmenou kodónov v homeodoméne. Dve zmeny v jednom nukleotide pravdepodobne tvoria nové STOP kodóny v homeodoméne alebo v 3' koncovej oblasti. Jedna mutácia zmenila prvý nukleotid intrónu. Mimo tieto mutácie bol nájdený jeden polymorfizmus, prípadne tichá mutácia, v 52 kontrolných prípadoch. Tieto varianty sekvencie *Nkx2.5* sú považované za mutácie na základe ich súvisu so srdcovo-cievnyimi ochoreniami, závažnej predpokladanej zmeny v proteínovej štruktúre *Nkx2.5* a ich neprítomnosti vo viac než 100 chromozómoch zo zdravých pacientov. (Benson, a iní, 1999)

1.3. Proteín Nkx2.5

1.3.1. Štruktúra proteínu

Nkx2.5 je transkripčný regulátor dôležitý hlavne v období ranného embryonálneho vývoja. Patrí do rodiny NK homeoproteínov, ktoré hrajú dôležitú úlohu v špecifikácii buniek do rôznych tkanív, zapája sa do srdcového vývoja a dospievania buniek a tkanív. (Genis, Scone, Kasahara, & Nam, 2008) Ľudský proteín *Nkx2.5* má dĺžku 324 aminokyselinových zvyškov a obsahuje regulačné sekvencie na koncoch N a C. C-koncová oblasť nie je najdôležitejšou pre schopnosť *Nkx2.5* indukovať kardiogénu v bunkových kulturách, kým N-koncová oblasť spoločne s homeodoménou sú minimálne oblasti potrebné pre správnu aktivitu *Nkx2.5*. (Jamali, Rogerson, Wilton, & Skerjane, 2001) Oblasť podstatná pre transkripčnú aktivitu, rozliehajúca sa približne medzi aminokyselinami 232-262, je nezvyčajne bohatá na väčšiu aromatickú aminokyselinu tyrozín. (Elliot, a iní, 2006) Ďalej obsahuje konzervovanú doménu HD (homeodoména), NK2 špecifickú doménu (NK2-SD) a doménu TN. (Pradhan, et al., 2012; Reamon-Buettner & Borlak, 2010) Na C-koncovej časti proteínu sa nachádza oblasť bohatá na tyrozíny (YRD). (Elliot, a iní, 2006) TN sa nachádza v blízkosti amino konca proteínu a NK2-SD blízko karboxylového konca. Avšak nie všetky proteíny rodiny NK2 tieto

domény obsahujú. Niektorým najjednoduchším organizmom, ako napríklad *C. elegans*, chýbajú obe spomínané domény. Predpokladá sa tak, že pôvodný gén *NK* v sebe tieto domény zakódované nemal. (Harvey, 1996) Ich funkcie však zatiaľ nie sú známe, aj keď ich knock-out u myši vedie k prenatalnej smrti v 14,5 d.p.c. s niekoľkými srdcovo-cievnymi poruchami, ako poruchy priehradky medzi komorami (AVSD), a downregulácia niektorých komorových markerov prevažne v pravej komore. Heterozygotne mutantné myši prežívajú, ale postupom času sa im taktiež vyvíja množstvo srdcových porúch. To naznačuje, že *NK2-SD* doména hrá úlohu vo vývoji srdca nezávisle na *HD*. (McElhinney, Geiger, Blinder, Benson, & Goldmuntz, 2003) Tieto sekvencie sú medzi ľudským, myším a *Xenopus* génom 100% identické, podobnosť s ostatnými známymi homeodoménami je veľmi nízka (pod 50 %), mimo rodiny *NK2* génov. (Turabay, Wechsler, Blanchard, & Izumo, 1996) Kým *TN* doména má malú podobnosť s peptidickými oblasťami iných transkripčných faktorov, *NK2-SD* je v tejto triede proteínov jedinečná. Od *HD* je oddelená 9 – 32 aminokyselinovými zvyškami, kde niektoré z nich vykazujú istú formu konzervovanosti medzi stavovcami. Táto doména je bohatá na prolín a izoleucín. V súčasnosti nie je jasné, či sekvenčné rozdiely v proteínoch triedy *NK2* poukazujú na rozdielnosť vo funkčných vlastnostiach, alebo ide jednoducho o idiosynkratickú cestu ich evolúcie. (Harvey, 1996) Kým funkčná dôležitosť konzervovaných domén *TN* a *NK-2* nie je úplne objasnená, ich existencia ukazuje ďalšiu možnosť blízkej príbuznosti medzi týmto génom v rôznych druhoch živočíchov. (Turabay, Wechsler, Blanchard, & Izumo, 1996)

Sekvencia aminokyselinových zvyškov ľudského *Nkx2.5* proteínu je 100% a 67% identická s myšou a drozofilou sekvenciou. Tento proteín má minimálne tri izoformy tvorené alternatívnym zostrihovým mechanizmom: typ *a* kóduje proteín s veľkosťou približne 35 kDa (polypeptid s 324 aminokyselinovými zvyškami), ktorý obsahuje *HD*, kým ďalšie typy, *b* a *c*, kódujú skrátenú verziu proteínu s veľkosťou približne 12 kDa (zložený zo 112 zvyškov), ktoré sú identické s typom *a*, ale *HD* im chýba. Amplifikácia každej izoformy reverznou transkriptázovou polymerázovou reakciou odhalila, že všetky tri verzie proteínu sú exprimované vo fetálnych a dospelých srdciach, ale že forma *Nkx2.5a* je najrozšírenejšia. Relatívna úroveň expzie týchto troch izoforiem *Nkx2.5* sa vo vývojových štádiách nemení. (Shiojima, a iní, 1996)

mRNA transkript génu *Nkx2.5* bol zistený od 12. týždňa ľudského embryonálneho vývoja. V období medzi 12. a 19. týždňom bolo množstvo mRNA 5násobne vyššie. (Turbay, Wechsler, Blanchard, & Izumo, 1996) Proteín taktiež obsahuje negatívne modulovacie domény, čo znamená, že transkripčná aktivita *in vitro* sa neprejaví, ale môže byť odhalená ak sú všetky C-koncové aminokyseliny odstránené, alebo keď je koexprimovaný iný srdcový transkripčný faktor priamo interagujúci s *Nkx2.5*. Aktivita proteínu klesla na hladinu pozadia po odstránení 30 a viac aminokyselinových zvyškov z N-koncovej časti proteínu. *Nkx2.5* box doména a C-koncová doména proteínu *Nkx2.5*, ktorých funkcia nie je úplne objasnená, nemajú takmer žiadnu autonómnu transkripčnú aktivitu. (Elliot, a iní, 2006)

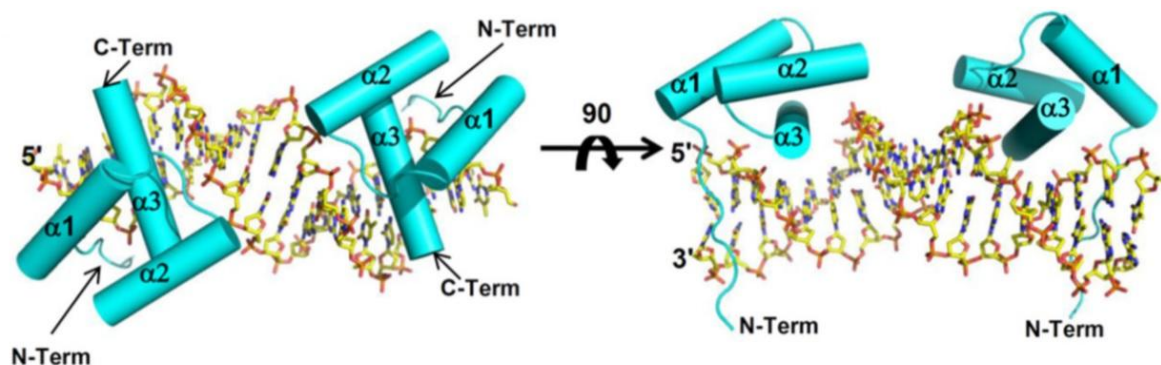
1.3.1.1. Homeoboxová doména – HD

Skrz HD veľkú približne 60 aminokyselinových zvyškov interaguje *Nkx2.5* s DNA pomocou helix-turn-helix DNA-väzbového motívu troch α -helixov, kde helix 3 určuje väzbovú špecifitu. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010) Konzervovaná HD je umiestnená centrálnne v pozícii 138-197 sekvencie aminokyselinových zvyškov proteínu a účastní sa jadrového transportu a interakciách s inými transkripčnými faktormi, rovnako ako väzby s DNA. (Pradhan, a iní, 2012) Vysoko konzervovaná HD sekvencia a jej obmedzená expresia v srdci poukazuje na dôležitú úlohu vo vývoji a diferenciacii ľudského srdca. Predpokladajú sa dva rôzne mechanizmy transkripčnej regulácie proteínu, jeden závislý na homeodoméne a jeden na nej nezávislý. HD proteínov rodiny NK2 majú tyrozín na pozícii 54. Ide o jedinú rodinu homeodoménových proteínov s tyrozínom na tejto pozícii, čo z neho robí jeden z hlavných identifikačných prvkov NK2 triedy, ktorý a slúži aj ako klasifikačný nástroj. (Harvey, 1996)

HD proteínu *Nkx2.5* je vysoko homológna s ostatnými proteínmi triedy NK (homológia s *Nkx2.3* (93 %), *Nkx2.6* (82 %) a *Nkx2.1* (82 %) (Chen & Schwartz, 1995)) a viaže sa na konzervatívny DNA motív C/GAAG. Jedným zo známych downstreamových cieľov *Nkx2.5* je -242 oblasť promótoru atriálneho natriuretického faktoru (ANF). Potenciálnych väzbových oblastí je viac, niektoré sú však pravdepodobne funkčne deaktivované pomocou represoru. (Warren, a iní, 2011) Homeoboxová sekvencia je 100% identická s myšou a 95% identická so sekvenciou z *Xenopus*. (Turbay, Wechsler, Blanchard, & Izumo, 1996)

Po kryštalizácii samostatnej HD v komplexe so špecifickým DNA elementom, v tomto prípade promótorovou oblasťou *ANF*, sa určila kryštalografická štruktúra HD. V tomto prípade bolo kvôli silnej mozajkovosti proteínových kryštálov potrebné vytvoriť mutanta, ktorý mal v HD vymenený Cys56 (Pradhan, a iní, 2012), prípadne Cys193 (schopné oxidácie) za Ser. Tým sa podarilo získať kvalitné kryštály, pozostávajúce z Nkx2.5 HD (C193S) a 19-merného dvojvlákna DNA s tupými koncami oblasti -242 *ANF*. (Genis, Scone, Kasahara, & Nam, 2008) Pomocou chromatín-imunoprecipitačných techník bola približná promótorová oblasť, obsahujúca aj *ANF*-242, potvrdená *in vivo* ako väzbové miesto pre Nkx2.5 proteín. (Warren, a iní, 2011) Ukázalo sa, že táto oblasť obsahuje dva Nkx2.5 väzbové palindromatické motívy, ktoré sú oddelené piatimi nukleotidmi. (Durocher, Charron, Warren, Schwartz, & Nemer, 1997) Nejde však o jediné potenciálne väzbové miesto, promóter *ANF* obsahuje tri špecifické väzbové miesta pre transkripčný faktor Nkx2.5: -408, -242, -87. HD sa viaže na *ANF* -242 miesto s viac než 80násobne vyššou afinitou než na -87. (Kasahara, a iní, 2000) Mutácie samostatných tyrozínov v HD zmenou na alanín v oblasti medzi aminokyselinami 232 a 262 mali minimálny efekt na transkripciu (najväčšia redukcia aktivity bola 29 %, jedna mutácia dokonca zvýšila aktivitu o 52 %), kým mutácia prvých siedmich z deviatich tyrozínov viedla k zníženiu na 25 % pôvodnej aktivity wild-type fenotypu. Pri mutácii všetkých deviatich tyrozínov klesla aktivita ešte viac. (Elliot, a iní, 2006)

HD zaujíma kanonický tvar formovaním troch α -helixov a N-koncového ramena (zvyšky 1-9), umiestneného upstreamovo od helixu α 1. Dva N-koncové helixy, α 1 (zvyšky 10-22) a α 2 (zvyšky 28-38) sú vzájomne antiparalelné a umiestňujú helix α 3 (zvyšky 42-58) do veľkého žliabku DNA. Správne zloženie HD proteínov rodiny NK2 je pravdepodobne zapríčinené hydrofóbnym jadrom, ktoré sa skladá z Phe8 na N-konci, Leu16 a Phe20 v α 1 helixe, Leu26 v α 1- α 2 slučke, Leu34 a Leu38 v α 2 helixe, Leu40 v α 2- α 3 slučke, Val45, Trp48, Phe49 a Arg52 v α 3 helixe (poradie aminokyselinových zvyškov 137-195 v proteíne Nkx2.5 odpovedá číslovaniu 1-57 v HD). (Pradhan, a iní, 2012)



Obrázok 3: Celková štruktúra komplexu Nkx2.5 HD s promótorovou oblasťou ANF na DNA. Svetlomodrou farbou je vyznačená HD proteínu Nkx2.5. (Pradhan, a iní, 2012)

Mutácia v homeodoméne Nkx2.5 nemusí byť jediná možnosť ako poškodiť funkciu exprimovaného proteínu. *In vitro* testy ukázali, že DNA väzbové vlastnosti Nkx2.5 nie sú potrebné pre asociáciu proteínu so serum response factor (SRF) a koaktiváciu aktívneho génu. K tomu je potrebná len N-koncová oblasť HD Nkx2.5. Preto ak sa v mutantoch exprimuje skrátaná verzia proteínu, stále môže fungovať. Cielené narušenie HD však môže spôsobiť abnormálnu morfogénu srdca pri 8,5 d.p.c. a následkom toho skorú embryonickú smrť spôsobenú hemodynamickou nedostatočnosťou. (Harvey, 1996) V pokuse s aktiváciou reportérového génu Nkx2.5 HD nestačila na aktiváciu, čo naznačuje, že aktivačné domény tohto proteínu sídlia mimo HD. (Chen & Schwartz, 1995)

1.3.1.2. Doména bohatá na tyrozíny – YRD

Usporiadanie tyrozínov v YRD sa líšilo od 4 do 10 v rôznych proteínoch rodiny NK2, aj keď sa udržiavala všeobecná konzervatívnosť v rozmiestnení, hlavne medzi ortológmi Nkx2.5 a Nkx2.3. Medzi ďalšie pomerne dobre konzervované aminokyseliny patrí asparagín 15 v myšom Nkx2.5 a Nkx2.3 a valín na pozícii 7, asparagín 10, prolíny 11, 18, 37 a cysteín 33. Hlavonožci majú YRD aj ďalšie tri konzervované domény C-koncovovej časti proteínu Nkx2.5, preto sa predpokladá koevolúcia s homeodoménou ešte pred rozdelením stavovcov a bezstavovcov pred približne 550 miliónmi rokov. Oblasti bohaté na tyrozín, pravdepodobne predchodcovia YRD, sú prítomné v *C.elegans*, u komárov, medonosných včiel, nezmarov a morských sasaniek. Mutácie tyrozínov na alaníny v YRD doméne *in vitro* modelu nevykázali zníženie väzby proteínu Nkx2.5 na DNA a nenastala ani zmena v transaktívnej aktivite na syntetických promótoroch

nesúcich väzbové miesta pre Nkx2.5. Táto doména chýba ďalším Nkx2.5 príbuzným proteínom, a to Nkx2.1, Nkx2.2 a Nkx2.4, ktoré sú exprimované v nervovej sústave. (Elliot, a iní, 2006)

1.3.2. Homodimerizácia

Predpokladá sa, že homo alebo heterodimerizácia transkripčných faktorov môže regulovať ich transkripčnú aktivitu. Kombinovateľnosť limitovaného počtu transkripčných faktorov umožňuje väčšiu reguláciu biologických procesov, zvyšujúc tak nie len diverzitu, ale aj špecifitu kontrolných mechanizmov. Homodimerická interakcia Nkx2.5 je sprostredkovaná cez C-koncovú regulačnú oblasť. (Kasahara, a iní, 2000)

HD proteín viaže DNA preferenčne ako monomér pri nízkych proteínových koncentráciách a dimerizuje pri vyšších koncentráciách. Napriek tomu, že HD aj kompletný Nkx2.5 proteín viažu monomerické väzbové miesto na DNA s podobnou afinitou, kompletný proteín preferenčne formuje diméry pri koncentrácii o približne 13 rádoov nižších než samotný HD. Ukazuje sa teda, že časti proteínu Nkx2.5 mimo HD, hlavne koncová oblasť COOH, môžu podporovať medziproteínové interakcie zapojené do dimerizácií na DNA. Aminokyselinové zvyšky medzi 159 a 199 sú potrebné pre túto dimerizáciu. Dva základné zvyšky, Lys193 a Arg194, sú pre tento dej nevyhnutné. Nkx2.5 môže tvoriť homodiméry v roztoku rovnako ako v bunkách, takže väzba na DNA nie je nutná pre tento typ medziproteínovej interakcie. (Kasahara, a iní, 2000)

1.3.3. Posttranslačné modifikácie

Nkx2.5 je v prirodzenom stave slabý transkripčný faktor s takmer žiadnou merateľnou represívnou aktivitou. Predpokladá sa, že hydrofóbne interakcie medzi inhibičnými a aktivačnými doménami môžu brániť prístupu k silne nabitým iniciačným transkripčným faktorom. Je možné, že v určitých podmienkach dochádza ku konformačnej zmene v štruktúre proteínu Nkx2.5. (Chen & Schwartz, 1995)

1.3.3.1. Fosforylácia

Nkx2.5 je fosforylovaný počas translokácie do jadra, pričom táto modifikácia zvyšuje schopnosť väzby s DNA a je dôležitá pre transkripčnú aktiváciu Nkx2.5. Ktoré signálne dráhy sú riadiace v srdcovom vývoji a môžu ovplyvniť fosforyláciu Nkx2.5

zatiaľ nie je známe. Tieto mechanizmy však zabezpečujú citlivú reguláciu nezávisle na hladinách expresie proteínov alebo ich umiestnení a pridávajú tak ďalšiu vrstvu v sieti transkripčných faktorov riadiacich vývoj srdca. (Bruneau, Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis, 2002)

1.3.3.2. Sumoylácia

Molekula SUMO (small ubiquitin-like modifier) môže meniť funkcie svojho cieľa pomocou škály mechanizmov, ako sú väzbovosť DNA, stabilita proteínu a iné. Nkx2.5 je modifikovaný pomocou SUMO na jeho 51. aminokyselinu - lyzíne, ktorý je konzervovaný v mnohých živočíšnych druhoch. Zmena tohto lyzínu na arginín (K51R) redukuje schopnosť proteínu Nkx2.5 väzby na DNA a jeho transkripčnú aktivitu, ale nemení lokalizáciu do jadra. (Costa, a iní, 2011) Tieto mutanty sú však cieľom ubikvitinácie. E3 ligázové proteíny PIAS1, PIASx a PIASy podporujú väzbu SUMO-1 na Nkx2.5 na hlavnom väzbovom mieste pre SUMO. Väzba SUMO-2 na Nkx2.5 je katalyzovaná iba proteínom PIASx. Sumoylácia stabilizuje vytváranie komplexov obsahujúcich Nkx2.5, čo má za následok robustnú transkripčnú aktiváciu. Týmto spôsobom sumoylácia pôsobí ako pozitívny regulátor transkripčnej aktivity Nkx2.5. SUMO-1 potencuje aktivitu Nkx2.5 v závislosti na dávkovaní, až do 150násobnej hladiny. (Wang, Zhang, Iyer, Feng, & Schwartz, 2008)

Sumoylácia nastáva zvyčajne na aminokyselinovej sekvencii ΨKXE (Ψ predstavuje väčšiu hydrofóbnu aminokyselinu, X akýkoľvek zvyšok) s jednou potenciálnou cieľovou sekvenciou: lyzín 51 umiestnený v aktivačnej doméne Nkx2.5. (Wang, Zhang, Iyer, Feng, & Schwartz, 2008) Podobným spôsobom funguje aj mutácia lyzínu 309 na cysteín, ktorá naruší správnu sumoyláciu, čo naznačuje regulačný charakter sumoylácie týchto oblastí. S najväčšou pravdepodobnosťou dochádza k zmene trojdimenzionálnej štruktúry proteínu Nkx2.5, vďaka čomu sa zneprístupnia dané oblasti. Niektoré mutácie v HD taktiež znižujú schopnosť sumoylácie. (Kim, a iní, 2011)

SUMO-1 podporuje synergickú aktivitu medzi Nkx2.5 a SRF vďaka podporovaniu stability Nkx2.5/SRF obsahujúcich komplexov. Sumoylovaný proteín Nkx2.5 si zachováva schopnosť dimerizácie s Nkx2.5 bez naviazaného SUMO proteínu. Je však zrejme narušená jeho schopnosť zakomponovávať sa do iných proteínových komplexov a tak pozmenená jeho funkcia. (Wang, Zhang, Iyer, Feng, & Schwartz, 2008) Rovnako je

možné, že sumoylácia napomáha tvoreniu Nkx2.5 komplexov s ostatnými proteínmi pomocou regulácie medziproteínových interakcií, ktoré ovplyvňujú stabilitu a aktivitu transkripčných faktorov a chromatinovú modifikáciu. (Costa, a iní, 2011)

Prítomnosť lyzínu 51 pôsobí ako ochranný faktor Nkx2.5 pred ubikvitináciou, keďže K51R bol označený polyubikvitínom, kým wild-type Nkx2.5 ostal neoznačený. Predpokladá sa teda mechanizmus antagonizmu medzi ubikvitináciou a sumoyláciou Nkx2.5. (Wang, Zhang, Iyer, Feng, & Schwartz, 2008)

1.3.4. Väzba na DNA

Proteíny bez HD nevykazujú schopnosť viazať sa na väzbové sekvencie Nkx2.5. (Shiojima, a iní, 1996) Interakcia medzi DNA a HD je sprostredkovaná zvyškami z troch oblastí HD: N-koncového predĺženia, slučky spájajúcej $\alpha 1$ a $\alpha 2$ a helix $\alpha 3$. Arg5, Val6 a Phe8 N-koncového predĺženia interagujú s DNA v malom žliabku. Kostrové amidové a karboxylové skupiny Val6 a Phe8 interagujú s fosfátovou kostrou DNA cez molekuly vody, spoločne s Tyr25, Leu26 a Arg31. Väčšina väzieb medzi HD a DNA je sprostredkovaná aminokyselinovými zvyškami Gln44, Lys46, Ile47, Gln50, Asn51, Arg53, Tyr54, Lys55 a Lys57 umiestnenými na $\alpha 3$ helixe. Je to práve Tyr54, ktorý je zodpovedný za NK2 špecifické rozpoznanie väzbovej DNA sekvencie. (Pradhan, a iní, 2012)

Štúdia skúmajúca väzbové schopnosti proteínu Nkx2.5 na náhodných nukleotidoch dlhých 15bp dvojláčkovej DNA poukázala na to, že väčšina väzbových miest obsahovala sekvencie bohaté na AT. Najvyššia afinita sa nachádzala na oblastiach obsahujúcich 5'-CAAGTG-3' alebo 5'-TAAGTG-3' nukleotidové jadrá, kým o niečo nižšia afinita bola voči sekvencii 5'-TAAT-3'. V týchto prípadoch sa nachádzali ďalšie A/T (zvyčajne 6) mimo hlavnej sekvencie ohraničené cytozínom alebo guanínom. Najnižšia afinita bola voči oblastiam s piatimi A/T, alebo viac než 7-8 A/T. Najsilnejšiu väzbovú afinitu vykazovala sekvencia, ktorá bola podobná tyroidnému transkripčnému faktoru 1 (Nkx2.1). Nahradenie konzervovaného asparagínu 52 glutamínom v helixe 3 proteínu Nkx2.5 zablokovalo väzbu na DNA a aktiváciu reportérových génov. Tým sa potvrdzuje úloha HD vo väzba proteínu na DNA. (Chen & Schwartz, 1995)

1.3.5. Miesto expresie

Nkx2.5 je v rannom vývojom štádiu srdca exprimovaný v srdcovom polmesiaci, ale v neskoršom embryonálnom období je jeho expresia obmedzená na predsieň a časť pravej komory. Neskôr sa nachádza iba v časti výtokového traktu. (Bruneau, 2002) Nkx2.5 poskytuje jeden z najskorších markerov indukcie srdcového mezodermu. (Mohun & Sparrow, 1997)

V štádiu 9,5 d.p.c. je expresia MLC-2a a Nkx2.5 v myokarde až po hranicu celomického epitelu, ktorý je súčasťou ohraničenia perikario-peritoneálnych dutín, v dorzálnom mezokarde. Štádia 10,5 a 11,5 d.p.c. ukazujú detekovateľnú expresiu Nkx2.5 v myokarde komôr a predsiení, ktoré sú taktiež pozitívne na MLC-2a. Štádia 12,5 a 13,5 d.p.c. majú silnejšiu expresiu MLC-2a v myokarde predsiení a sinus venosus než v komorovom myokarde. Jeho expresia sa úplne neprekrýva s expresiou Nkx2.5, ktorá sa nenachádza v pravom sinoatriálnom uzle, zadnom zhľuku buniek medzi ľavou kardiálnou žilou a pľúcnou žilou, a v stene pravej a ľavej kardinálnej žily. Čiastočné značenie je viditeľné aj na páse myokardiálnych svalových buniek, ktorý sa tiahne od základne predsieňovej priehradky až po AV uzol. (Gittenberger-de Groot, a iní, 2007)

Pri vývoji prvotnej srdcovej trubice v čase 8 d.p.c. je expresia Nkx2.5 obmedzená do vrchnej časti trubice, ktorá sa hneď na to vyvíja do vývodového traktu a pravej komory. Neskôr je expresia vo vnútornej trabekulárnej vrstve pravej komory a myokardiálnej vrstvy obklopujúcej pľúcnej a aortálnej chlopne, aj keď nie je detekovateľná priamo v týchto chlopniach alebo tepnách. V diferencovanom srdci je expresia regulačných elementov obmedzená do prednej časti vývodného traktu a pravých komorových segmentov počas embryonálneho vývoja a v novorodencoch. Rovnaké regulačné elementy aktivujú génovú expresiu vo vyvíjajúcom sa hltane a slezine už od prvotných štádií organogenézy. Regulačné prvky v oblasti -3059 až -2554 postačujú na aktiváciu expresie v prednom srdci, hltane a slezine a nukleotidová sekvencia vzdialených prvkov obsahuje väzbové miesta pre vývojovo dôležité regulačné faktory. *In vitro* štúdie ukazujú na schopnosť GATA faktorov viazať sa špecificky na vzdialené Nkx2.5 regulačné oblasti. Ich mutácia spôsobuje stratu expresie proteínu Nkx2.5 v príslušných orgánoch. (Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998)

1.3.6. Interakcia s inými génmi a proteínmi

V roku 2014 bol na základe porovnania profilu expresie *Nkx2.5* knock-out myších embryí, heterozygótov a wild-type jedinocov identifikovaných 46 génov s rozdielnou exprimáciou v porovnaní s nemutantnými myšami. Vytvorili interakčnú mapu s možnými dráhami, ktoré rôzne dávkovanie génu *Nkx2.5* môže ovplyvňovať na základe informácii o väzbe transkripčných faktorov na DNA. Medzi pravdepodobne zasiahnuté dráhy patria ribozómové dráhy, glykolýza a glukoneogenéza, pyruvátový metabolizmus, kontrakcie srdcového svalu, metabolizmus porfyrínu, fruktózy, manózy a hypertrofická kardiomyopatia. (Li, a iní, 2014) Pokus s *Nkx2.5* mutovanými myšami, kedy sa pri sledovaní jedného typu srdcovej poruchy (komorovej poruchy priehradky) a udržovaním stálej etiológie, ukázal na veľkú zložitosť vrátane interakcií veľkého množstva génov a vonkajších podmienok na *Nkx2.5*. (Winston, a iní, 2012)

Okrem homodimérickej interakcie sa *Nkx2.5* účastní spoločných interakcií s ďalšími hlavnými srdcovými transkripčnými faktormi regulujúcimi vývoj srdca. Keďže tieto medziproteínové interakcie sa líšia u rôznych členoch rodiny NK2, menej konzervatívne aminokyselinové zvyšky umiestnené na povrchu proteínu pravdepodobne fungujú ako miesta týchto interakcií. Ide hlavne o zvyšky Gln10, Tyr14, Lys21, Gln33, Val37 a Lys39. (Pradhan, a iní, 2012)

Proteín *Nkx2.5* sa viaže s *Nkx2.6* približne rovnakou afinitou ako homodimerizuje, a nižšou afinitou k *Nkx2.3*. To poukazuje na možnosť interakcie *Nkx2.5* s ďalšími proteínmi rodiny NK2 s rôzne veľkou afinitou v závislosti na partnerovi. (Kasahara, a iní, 2000)

Kombinácia *Nkx2.5*, *Tbx5* a *Id2* tvorí jednu z kritických transkripčných sietí potrebných pre diferenciáciu komorových myocytov do špecializovaných buniek prevodového systému. (Moskowitz, a iní, 2007) V *Nkx2.5* mutantných embryách pretrváva expresia *Isl1* v kardiomyocytoch srdcového polmesiaca a srdcovej trubice, kým wild-type embryá mali transkripty v druhom srdcovom poli, kým boli nedetekovateľné v kardiomyocytoch v srdcovej trubici a polmesiaci už v ôsmom dni vývoja. (Prall, a iní, 2007)

1.3.6.1. GATA-4

Špecifická schopnosť väzby GATA-4 na DNA sekvencie génu *Nkx2.5* nachádzajúce sa v oblasti -2795 až -2775 a jeho vplyv na génovú aktiváciu bol pozorovaný v *in vivo* transgennej analýze. Keďže *Nkx2.5* a GATA sú koexprimované v nediferencovanom srdcovom primordiu, podieľajú sa tak spoločne na regulačnej sieti srdcovej diferenciácie. (Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998)

Kým *Nkx2.5* je exprimovaný skrz mezoderm a endoderm, GATA-4 je exprimovaný iba v endoderme. (Sepulveda, Vlahopoulos, Iyer, Belaguli, & Schwartz, 2002) *Nkx2.5* a GATA4 môžu aktivovať transkripciu cez odhalenie aktivačnej domény na DNA naviazanom *Nkx2.5*, rovnako ako prilákaním GATA4 pomocou *Nkx2.5* do transkripčne aktívneho komplexu. Nie je jasné, či všetky proteíny, ktoré interagujú s DNA-väzbovým miestom, tak robia v rovnaký čas, pretože sa tam nachádzajú určité fyzikálne obmedzenia. Napríklad *Nkx2.5* môže interagovať s GATA4, Tbx5 a SRF v blízkosti alebo priamo na *Nkx2.5* väzbovom mieste na DNA. V rovnakej oblasti môže interagovať SRF s GATA4 a myokardínom a GATA4 s MEF-2 a FOG-2. Je však nepravdepodobné, aby všetky tieto interakcie pozostávajúce s pomerne veľkých proteínov, prebiehali simultánne. Časová a priestorová regulácia týchto interakcií má pravdepodobne dôležitú úlohu v riadení rôznych citlivo regulovaných transkripčných udalostí, ktoré vyúsťujú do formovania srdca. (Bruneau, 2002)

Dve C-koncové oblasti proteínu *Nkx2.5* sú buď iba čiastočne redundantné, alebo funkčná interakcia medzi *Nkx2.5* a GATA-4 vyžaduje predĺženie homeodomény v C-koncovovej oblasti. Keďže táto oblasť nie je transkripčne aktivujúca (skôr pôsobí ako autorepresívna oblasť a jej odstránenie vedie k superaktivácii), je možné že GATA-4 fyzicky interaguje s *Nkx2.5* a spôsobuje jeho konformačné zmeny, ktoré odhaľujú aktivačné domény. (Durocher, Charron, Warren, Schwartz, & Nemer, 1997) Vyššia expresia GATA-4 v heterozygotných srdciach môže spôsobovať udržiavanie expresie *Nkx2.5* nad minimálnou hladinou potrebnou pre normálny vývoj srdca. (Riazi, a iní, 2009) Lys193 v HD proteínu *Nkx2.5* má kritickú úlohu v interakcii s transkripčným faktorom GATA4. (Kasahara, a iní, 2000)

Heterotypická interakcia medzi GATA-4 a GATA-6 môže generovať transkripčný synergizmus, ktorý môže byť dostatočný aby prekonal stratu GATA/*Nkx2.5* interakcie,

respektíve môže vyvolať povolanie GATA-6 do transkripčne aktívnejšieho GATA-6/GATA-4/Nkx2.5 terciárneho komplexu. (Durocher & Nemer, 1998)

Transkripčná kooperácia bola nájdená u členov Antp rodiny ako Nkx2.5, TTF-1 a HoxB3, ale už nie pri Oct1 a Ptx1. Ukazuje to na dôležitú úlohu homeodomény typu Antp v špecifite týchto synergických interakcií. (Durocher, Charron, Warren, Schwartz, & Nemer, 1997)

1.3.6.2. Mef2c

Strata aktivity Nkx2.5 je sprevádzaná stratou endogénnej expresie kardiomyoblastových génov ako *GATA-4* a *Mef2c*. (Jamali, Rogerson, Wilton, & Skerjane, 2001) Oba tieto transkripčné faktory sa podieľajú na správnej regulácii srdcového vývoja. Selektívna downregulácia transkripčných faktorov zúčastnených v bunkovej diferenciácii, ako sú práve N-myc, HAND1 a MEF2C predpokladá, že Nkx2.5 môže kontrolovať neskorú diferenciáciu srdcových myocytov pomocou downstreamových transkripčných faktorov. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) Vzájomná regulácia medzi Nkx2.5 a Mef2c môže reprezentovať hlboko konzervovaný modul rannej srdcovej regulácie, hlavne vo vývoji druhého srdcového poľa. (Clark, a iní, 2013)

V prípade interakcie medzi Mef2c a Nkx2.5 dochádza k priamej interakcii medzi týmito proteínmi, aj keď Mef2c nevykazuje stabilnú konformáciu pri heterodimerizácii. Jeho stabilnejšia forma sa nachádza pri vytváraní komplexov, ktoré ďalej ovplyvňujú formovanie homodimérov. Podľa tohto modelu teda Mef2c podporuje formovanie homodiméru Nkx2.5, ktorý následne narušuje dimér Mef2c. Mef2c monomér sám o sebe podporuje stabilitu Nkx2.5 diméru. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

1.3.7. Vplyv *Nkx2.5* na vývoj srdca

V štúdií na bunkových líniách bolo poukázané na potrebu *Nkx2.5* pre kardiogézu, pre vývoj kostrových svalov však nie je dôležitý. (Jamali, Rogerson, Wilton, & Skerjane, 2001) Kým vrstvy epikardu a endokardia sú tvorené jedinou bunečnou vrstvou, embryonálny myokard pozostáva z 5 až 10 vrstiev v období 11,5 d.p.c. Ultraštruktúrna analýza transmisnou elektrónovou mikroskopiou (TEM) na rezoch ukazuje, že približne 90 % oblasti myokardiálnej vrstvy je zaplnenej bunkami ultraštruktúrne odlišných a väčších než sú červené krvinky, intersticiálne bunky, neuróny, bunky endotelia a hladkého svalstva. Väčšina týchto buniek sa dá jasne rozdeliť do dvoch skupín: približne 60 % myokardiálnych buniek obsahuje rôzne typy myofilamentárnych zväzkov a sarkomérových štruktúr, ako aj organely ako mitochondrie, Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum a sekretórne granuly obsahujúce proANF; zvyšným bunkám chýbali myofilamenty alebo sekretorické granuly a obsahovali menej cytoplazmatických organel. Tieto nediferencované bunky sa často nachádzali v myokardiálnej vrstve poprekladané bunkami so sarkomerickými štruktúrami. Veľkosť jadier týchto buniek bola však omnoho väčšia ako veľkosť diferencovaných buniek a následne bolo zistené, že sú v nich exprimované rané srdcové markery, ako práve *Nkx2.5*. Tieto výsledky poukazujú na veľké množstvo myokardiálnych buniek exprimujúcich tento transkripčný faktor, ktoré ostávajú nediferencované v myokardiu myších embryí v období 11,5 d.p.c. (Bartlett, Veenstra, & Weeks, 2010)

Imunohistochemická analýza ukázala prítomnosť *Nkx2.5* pozitívnych buniek vo vrstve myokardu, ale nie v endokraniálnych vrstvách. V 8,5 d.p.c. sa expresia *Nkx2.5* prekrýva s expresiou *Isl1*, čo označuje progenitorové bunky druhého srdcového poľa. Expresia *Nkx2.5* koreluje s expresiou MHC, ktorý je raným myokardiálnym markerom prvého srdcového poľa. V 10,5 d.p.c. malá populácia buniek z vývodového traktu a endokardiálneho vankúša exprimuje taktiež *Nkx2.5* a *Isl1*. Expresia *Isl1* je hlavne v dorsomezokarde a neurálnej lište v štádiu 9,5 d.p.c a nie je tam prítomný *Nkx2.5*, čo by sa dalo vysvetliť deriváciou z buniek prvého srdcového poľa alebo znížením *Isl1* na základe prechodu k expresii *Nkx2.5* v druhom srdcovom poli. Viac než 87 % buniek exprimujúcich *Nkx2.5* v štádiu 9,5 d.p.c. sa v *in vitro* podmienkach diferencovalo do kardiomyocytov a buniek prevodového systému, čo následne potvrdila

elektrofyzologická analýza na jednobunkovej úrovni. Niektoré z buniek diferencovali do bijúcich kardiomyocytov a bunky hladkého svalu cievneho systému. (Wu, a iní, 2006)

Tkáňovo obmedzený transkripčný faktor GATA-4 a Nkx2.5 homeoboxový proteín sú skoré markery prekardiálnych buniek. Oba sú zásadné pre vývoj srdca, ale ani jeden z nich nedokáže iniciovať kardiogénu samostatne. Ich nadexpresia zvyšuje srdcový vývoj v príslušných prekurzoroch, čo naznačuje, že fungujú ako srdcové kofaktory. Ich koexpresia vyúsťuje v synergickú aktiváciu ANF, kde sa vyžaduje ich vzájomná interakcia. C-koncový zinc finger proteínu GATA-4 a C-koncová oblasť Nkx2.5 sú dôležité časti pre interakciu týchto proteínov. V nesrdcových bunkách transfekcia génmi *GATA-4* a *Nkx2.5* spôsobila synergickú aktiváciu *ANF* promotéru bez aktivácie kontrolných promotérov, ktorým chýbali väzbové miesta pre tieto transkripčné faktory. Len malá časť srdcových génov je cieľom oboch transkripčných faktorov, pri ktorých sú potrebné oba proteíny na správnu aktiváciu. Túto myšlienku podporujú pokusy, pri ktorých je v *GATA-4* mutovaný zinc finger zodpovedný za väzbu na DNA, a tým je narušená schopnosť synergie s *Nkx2.5*. Podobne *Nkx2.5* kooperuje aj s *GATA-5* pri aktivácii expresie génu *ANF*. (Durocher, Charron, Warren, Schwartz, & Nemer, 1997) *Nkx2.5* je potrebný pre správny ohyb srdca a expresiu *eHand* na ľavej strane srdca. Strata tohto génu v *Nkx2.5* mutantných srdciach je zrejme zodpovedná za problémy v ohybe srdcovej trubice. Je možné že touto reguláciou je *Nkx2.5* zapojený do dráhy určujúcej ľavo-pravú orientáciu srdca. (Biben & Harvey, 1997)

1.3.8. Progenitorová úloha

Oblasť špecifická expresia bola sledovaná u deviatich génov v srdcových progenitorových bunkách, napríklad v prekardiálnom mezoderme a v skorom srdcovom polmesiaci. V *Nkx2.5* homozygotne mutantných embryách nie je väčšina progenitorových génov downregulovaná v definitívnych srdcových štruktúrach – napríklad v 8 - 8,5 d.p.c. pretrvala expresia *Igfbp5* a *Pdgfra* počas vývoja srdcovej trubice. (Prall, a iní, 2007) Väčšina markerov diferenciácie srdcového svalu sú exprimované v *Nkx2.5* mutantoch normálne. Medzi výnimky patrí napríklad MLC2C. (Mohun & Sparrow, 1997)

Trojfarebný fluorescenčný reportérový systém NEMEAD zameraný na značenie nediferencovaných komorových buniek *in vitro*, s označenou transkripčnou aktivitou

Nkx2.5 a *MLC2V* promótorov a expresiu reportéru umiestneného v bunečnom jadre, ktorým bol označený promótor *ANF*, bol využitý na sledovanie diferencovaných a nediferencovaných buniek spolu s ich prekrývaním. Kontrola správnosti expresie týchto fluorescenčných farieb potvrdila správnu expresie endogénnych markerov – približne 17 % buniek vykazovalo aktivitu promotéra iba génu *Nkx2.5*, 24 % buniek ukázalo aktivitu promótorov pre *Nkx2.5* a zároveň *MLC2V* a približne 50 % buniek bolo pozitívnych v rámci aktivity promótorov všetkých troch génov. Žiadne bunky nevykazovali výlučnú aktivitu génov *MLC2V* spolu s *ANF*. Množstvo buniek exprimujúcich *Nkx2.5* postupom času (72 a 120 hodinové periódy) klesalo. Ukazuje to na nepriamu koreláciu medzi relatívnymi proporciami nediferencovaných a diferencovaných buniek v rôznych časoch kultivácie, a tým sa poukazuje na možnú progenitorovú úlohu v nediferencovaných bunkách. (Bartlett, Veenstra, & Weeks, 2010)

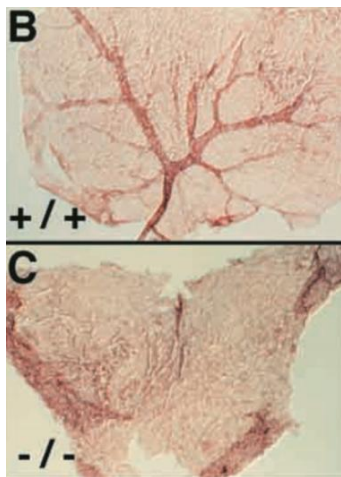
Nkx2.5 je exprimovaný v prvom a druhom srdcovom poli, ktoré sú zdrojmi srdcových progenitorových buniek rôznych častí srdca. Expresia v progenitorových bunkách naznačuje dôležitejšiu úlohu tohto transkripčného faktoru v hierarchii transkripčných regulátorov srdcového vývoja. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010) Počas vývoja srdca druhé srdcové pole poskytuje progenitorové bunky pre väčšinu kardiomyocytov. Tieto bunky exprimujú transkripčný faktor *Nkx2.5*. Bolo ukázané, že spätná represia *Bmp2/Smad1* signalizácie pomocou *Nkx2.5* kriticky reguluje proliferáciu druhého srdcového pola a morfológiu vývodného traktu. Mutanti v *Nkx2.5* mali upregulované gény zodpovedné za srdcovú špecifikáciu (vrátane *Bmp2*), čo viedlo na začiatku do prílišnej progenitorovej špecifikácie a následne do zníženej proliferácie druhého srdcového pola a poškodenia vývodného traktu. Väčšina progenitorových génov ovplyvnených stratou *Nkx2.5* bola exprimovaná v prvom aj druhom srdcovom poli. Ich expresia v prvom srdcovom poli bola extrémne prechodná, čo ukazuje ranú diferenciáciu týchto progenitorov v srdcovom polmesiaci. V *Nkx2.5* mutantoch je upregulácia progenitorových znakov v druhom srdcovom poli a abnormálne pretrvávajúca expresia v diferencujúcich myocytoch znakom dôležitej úlohy *Nkx2.5* v modulovaní expresie génov spojených so srdcovým prevodovým systémom a statusom progenitorových buniek. Väčšina progenitorových génov ovplyvnených stratou *Nkx2.5* bola exprimovaná v prvom aj druhom srdcovom poli. Expresia v prvom srdcovom poli bola extrémne prechodná, čo odráža skorú diferenciáciu týchto progenitoroch v srdcovom oblúku polmesiaci. (Prall, a iní, 2007)

Vzorec expresie progenitorových markerov definuje nové podpopulácie a ich správanie. V druhom srdcovom poli, *Tnc*, *Pdgfra* a *Igfbp5* boli najviac exprimované v spodnej populácii buniek, kým expresia *Pdgfra* bola obmedzená na stredovú oblasť (dorsálny mezokard) a *Tnc* v najviac laterálnych oblastiach. Na rozdiel od vývoja kostrových svalov, kde sa znižuje miera proliferácie ako nastupuje diferenciácia (čím sú jasne rozlíšiteľné molekulárne znaky progenitorov, myoblastov a myocytov), srdcové bunky pokračujú v proliferácii počas diferenciácie. (Prall, a iní, 2007)

1.3.9. Fenotyp *Nkx2.5* mutantov

Prenatálna strata funkcie *Nkx2.5* vyúsťuje k prenatálnej smrti, kým jej strata od druhého týždňa po narodení nie. Jasný mutantný fenotyp vyvstáva do štyroch dní, ak je zrušená funkcia *Nkx2.5* prenatálne, v prípade dva týždne starých myší je tento fenotyp prejavovaný približne o sedem týždňov neskôr. (Takeda, a iní, 2009) Mutantné srdcia sa začínajú odlišovať od normálnych od približne 8 d.p.c. Vykazujú dramatickú poruchu formovania srdca, kým ostatné štruktúry vyzerajú byť normálne. Mutantné embryá nedokážu začať proces ohybu lineárnej srdcovej trubice. V 9 d.p.c. začína veľa embryí vykazovať vývojovú retardáciu. (Lyons, a iní, 1995)

Fenotyp *Nkx2.5* mutantných jedincov začína byť však viditeľný už v skorých štádiách prenatálneho vývoja, ako sú napríklad žltkové vaky. Tie sú miestom prvej hematopoézy a hlavným zdrojom červených krviniek v myších embryách. V žltkových vakoch v 9,5 d.p.c. nebol viditeľný žiaden definovaný cievny systém, iba rozšírené kanály s menším množstvom červených krviniek, kým u wild-type embryí boli v tomto období jasne formované žltkové cievy a sieť menších ciev naplnených červenými krvinkami. Mutantné embryá boli silne anemické. Niekoľko endoteliálnych buniek sa nachádzalo vnútri vaku, ale netvorili cievne kanály, čo naznačuje, že nasledujúca vaskulogenéza a angiogenéza v týchto vakoch neprebehla. Je však možné že tento fenotypový prejav je sekundárnym následkom poškodenia obehovej sústavy, (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) alebo následkom všeobecnej rastovej retardácie embrya.



Obrázok 4: Na povrchu žltkového vaku knock-out myšieho embrya pre gén *Nkx2.5* (C) sa nachádza veľké množstvo záhybov a chýba tam jasne definovaná cievna sieť, ako je tomu u wild-type (B). (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

Odstránenie expresie *Nkx2.5* v myšom srdci síce spôsobuje porušenie správneho formovania srdca, ale nezastavuje prvotné formovanie srdcovej trubice ani expresiu ďalších markerov srdcovej diferenciácie. (Lyons, a iní, 1995) To môže ukazovať na pomerne neskoré zapojenie *Nkx2.5* v kardiogenéze, čo by však nevysvetľovalo ranú exprimáciu tohto proteínu. Eventuálne by sa mohlo jednať o funkčnú redundanciu medzi proteínmi v rodine NK2 génov. (Mohun & Sparrow, 1997)

Heterozygotné mutantné myši mali rovnaký postnatálny vývoj a plodnosť ako wild-type. Z kríženia heterozygótov sa nenarodili žiadne homozygotne mutantné myši, čo naznačuje embryonálnu letálnosť mutácie v homozygotnom stave. V 11,5 d.p.c. neboli nájdené žiadne homozygotne mutantné embryá; v 10,5 d.p.c. sa našli homozygotní mutanti s výraznou retardáciou rastu a veľkým množstvom tekutiny medzi srdcom a perikardiom; v 9,5 d.p.c. množstvo homozygotných mutantov vykazovalo Mendelovskú dedičnosť mutantnej alely. Tieto pozorovania indikujú, že k smrti homozygotných mutantov dochádza v období medzi 9,5 a 11,5 d.p.c. Neprítomnosť endokardiálneho vankúša je jeden z hlavných fenotypov homozygotných mutantov. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

Proliferácia druhého srdcového pola je kritický determinant jeho vývoja, rovnako ako pre veľkosť a morfológiu vývodného traktu a pravej komory. *Nkx2.5* hypomorfy vykazovali zníženie proliferácie v druhom srdcovom poli, a veľkosť vývodného traktu vrátane jeho morfológie boli ohrozené už v 8,5 d.p.c, čo spôsobilo abnormálne umiestnenie vývodných ciev na pravej strane, nasadajúcu aortu a v niekoľkých vážnych prípadoch dvojitú pravú komoru. Niektoré z týchto deformácií bolo možné odstrániť časným vymazaním jednej alebo oboch alel génu *Smad1*. (Prall, a iní, 2007)

V období od 9,5 d.p.c u mutantov dochádzalo k vytvoreniu slučky srdcovej trubice smerom doprava, keďže vývod srdcovej trubice bol umiestnený na pravej strane a sieňová oblasť sa nachádzala v zadnej ľavej časti. Taktiež bolo ukázané, že tento ohyb môže byť prerušený kvôli nedostatku trabekulácie a zabráneniu tvorby

endokardiálneho vankúša. (Harvey, 1996) Komorová časť je netypicky krátka a rozšírená, predsieňová časť nesprávne organizovaná. Fenotyp siení je spojený s nadbytkom sieňových kardiomyocytov, množstvo srdcových buniek v komorách je znížené v neskoršom vývoji, keď sa začína vývoj srdcových komôr. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010) AV kanál bol v tomto čase stále dosť rozšírený a jedna komora bola narýchlo pripojená k ešte dostatočne nevyvinutému vývodnému traktu – v embryách typu wild-type mal naproti tomu AV kanál úzky prierez a budúca ľavá komora, bulbus cordis (budúca pravá komora) a vývodný kanál už boli dostatočne vyvinuté. V mutantných srdciach bol taktiež dramaticky zhoršený vývoj trabekulového systému a cievneho systému srdca. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

Homozygotné mutácie neeliminovali líniu srdcových buniek, čo naznačuje výrazný rozdiel medzi génom *Nkx2.5* a *tinman*, ktorý špecializuje prekardiálny a brušný mezoderm. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) Tento rozdiel v úlohe medzi *Nkx2.5* a *tinman* môže byť ovplyvnený redundáciou iných génov, ktoré môžu byť dostatočné na začatie vývoja srdca u stavovcov až do chvíle, v ktorej vykazujú mutantné srdcia nefunkčnosť. (Harvey, 1996)

1.3.10. Vplyv na prevodový systém

V rôznych líniách myší sa môže pravdepodobnosť abnormalít prevodového systému dramaticky líšiť. Tieto rozdiely môžu byť spôsobené genetickým pozadím alebo vlastnosťami danej nepopísanej mutácie. Efekty danej mutácie môžu byť dramaticky ovplyvnené už spomínaným genetickým pozadím. (Rosenthal & Harvey, 1999)

Na základe súčasných poznatkov vývoja prevodového systému sa vykresľuje niekoľko mechanizmov, podľa ktorých v ňom *Nkx2.5* zohráva dôležitú úlohu. Keďže nedochádza k výraznej proliferácii buniek po tom, čo sú bunky regrutované do prevodového systému, redukcia týchto buniek v *Nkx2.5* mutantných zvieratách musí byť spôsobená buď znížením regrutovania alebo zvýšením straty buniek. Zníženie regrutovania myocytov inými populáciami buniek nebolo potvrdené, avšak *Nkx2.5* môže regulovať expresiu možných induktívnych signálov, ktoré ďalej povolávajú pluripotentné myocyty. V tomto prípade by bolo dávkovanie tohto génu dôležité pre vývoj. (Jay, a iní, 2004) Taktiež bolo zistené že, sinoatriálny uzol (SAN), ktorý sa pokladá za srdcový pacemaker, je vývojovo pod kontrolou *Nkx2.5*. Pre správny vývoj SAN je

dôležitá represia *Nkx2.5* v počiatočných vývojových štádiách tejto štruktúry. (Kasahara, Barunkova, Schinke, Tanaka, & Izumo, 1998)

Anatomické abnormality v AV uzle pravdepodobne prispievajú do AV bloku prvého stupňa so spojením s ešte neznámymi faktormi súvisiacimi s maturáciou, a hypoplázia Hisovho zväzku a Purkyňovho systému môže kompletne vysvetľovať defekty spojené s týmito štruktúrami. *Nkx2.5* je dôležitý pre vytvorenie AV uzlu. U haploinsuficientných myší je AV uzol menší a obsahuje menej buniek ako má wild-type. To ukazuje na priamu súvislosť medzi dávkovaním génu *Nkx2.5* a bunkami tohto uzlu. AV uzol taktiež neobsahoval proximálnu časť, ktorá exprimovala *Cx45* ale nie *Cx40*. (Jay, a iní, 2004) U homozygotných mutantov je *Cx45* neprítomné, čo sa dá vysvetliť jeho reguláciou pomocou *Nkx2.5*. Kým základná štruktúra génu *Cx45* je známa, mechanizmy zapojené do regulácie jeho transkripčnej aktivity nie sú jasné. Výsledky štúdie (Dupays, a iní, 2005) ukazujú na možnosť, že *Cx45* je downstreamový cieľ *Nkx2.5*, ale kvôli nedostatku ďalších informácií zatiaľ nie je možné určiť, či *Nkx2.5* priamo či nepriamo ovplyvňuje expresiu *Cx45*. Nedostatok *Cx45* v myokarde *Nkx2.5* mutantných embryí by mohlo byť jednou z hlavných príčin letality v skorom štádiu vývoja. Downregulácia *Cx40* v *Nkx2.5* mutantoch bola považovaná za potenciálnu príčinu porúch prevodového systému, a to preto, že promotér *Cx40* obsahuje väzbové miesta pre *Nkx2.5* a transaktivačné eseje ukazujú na aktiváciu expresie *Cx40*. (Bruneau, a iní, 2001) Napriek tomu, že *Nkx2.5* haploinsuficientné bunky AV uzlu a Hisovho zväzku majú menej buniek, tie však majú normálnu expresiu *Cx40* a *Cx45*. (Jay, a iní, 2004) Fluorescenčne značená alela génu *Cx40* umožňuje vizualizáciu centrálného prevodového systému v živých preparátoch. Sieňové myokardium taktiež exprimuje *Cx40*, ale oblasť medzi ním a centrálnym prevodovým systémom exprimujúcim GFP nie. (Gazit, Li, Choi, Miquerol, & Jay, 2014)

Šírenie tlkotu srdca cez prevodový systém môže byť sledované povrchovým ECG. Hypoplastický centrálny a okrajový prevodový systém v *Nkx2.5* knock-out myšiach je spojený s fyziologickými poruchami na viacerých úrovniach. ECG získané z myší od 3 týždňov do 1 roku veku u homozygotných mutantov a heterozygotov vykazovalo rovnaké abnormality prevodového systému a elektrofyziologické poruchy. Pri meraní signálu v Hisovom zväzku mali *Nkx2.5* haploinsuficientné myši zanedbateľný alebo úplne chýbajúci signál. V porovnaní s wild-type je táto zmena tak veľká, že by sa na jej

základe mohlo dedukovať o aký genotyp *Nkx2.5* môže ísť len na základe vyšetrenia signálu Hisovho zväzku. (Jay, a iní, 2004) *Nkx2.5* heterozygotne mutantné myšie embryá majú abnormálne predĺžené PR a intervaly medzi sieňami a Hisovým zväzkom medzi 4 a 7 týždňami veku. Títo mutanti majú výrazne predĺžený AH interval, ale stimulácia AV uzla ukázala iba malé zvýšenie tohto intervalu. (Gazit, Li, Choi, Miquerol, & Jay, 2014) Postup prenosu elektrického impulzu cez Hisov zväzok, ktorý je detekovateľný u wild-type myši, je malý alebo úplne chýba u myši haploinsuficientných v *Nkx2.5*. Rýchlosť prenosu tohto impulzu v mutantných myšiach do Purkyňových vlákien bol normálny. (Jay, a iní, 2004) Tvorba SAN je pod reguláciou mnohých génov. Expresia *Pitx2* vedie k inhibícii programu špecializácie pravej strany srdca v jeho ľavej časti, takže absencia *Pitx2* v pravej strane vedie k aktivácii *Shox2* expresie, ktorá reprimuje *Nkx2.5*. Táto represia dovoľuje aktiváciu diferenciačného programu v sinusovom uzle. (Espinoza-Lewis, a iní, 2009)

1.3.11. Mutácie *Nkx2.5* a fenotyp prevodového systému

Srdcový prevodový systém sa vyvíja postupným príchodom multipotentných embryonickým myocytov do uzlu alebo súboru vlákien. Následne tieto bunky opúšťajú bunkový cyklus. V myšom srdci sa Purkyňové vlákna vyvíjajú skrz subendokardiálnu distribúciu. *Nkx2.5* je upregulovaný počas obdobia príchodu do centrálného a okrajového prevodového systému srdca. Toto pozorovanie podporuje hypotézu že *Nkx2.5* mutantný fenotyp prevodového systému môže byť výsledkom embryonálneho vývoja. (Jay, a iní, 2004)

Nkx2.5 haploinsuficientné myši mali vyvinutý menší centrálny prevodový systém. AV uzol je umiestnený na zadnej časti nad interventrikulárnou priehradkou. Hisov zväzok sa rozpína dopredu z AV uzla okolo medzikomorvej priehradky (IVS). AV aj Hisov zväzok exprimujú Cx40 a Cx45 a sú menšie v porovnaní s wild-type myšami. (Jay, a iní, 2004) Kompletná delécia génu *Nkx2.5* spôsobuje nedostatočný vývoj až kompletnú absenciu trabekúl. Následne je zníženie expresie Cx43 u *Nkx2.5* mutantných embryí spôsobené na základe nesprávne vyvinutých komorového trabekulového systému. Tieto abnormality tiež podporujú zníženie expresie Cx40. (Dupays, a iní, 2005)

Je niekoľko pozorovaní podporujúcich hypotézu, kde je špecifikácia komorového srdcového prevodového systému závislá na kombinovanej aktivite *Nkx2.5* a *Tbx5*.

Heterozygotné myši nemali normálne smerovanie elektrických impulzov z AV uzla cez komory, ktoré je potrebné pre fyziologicky správnu komorovú kontrakciu. Chýbala expresia molekulárnych markerov srdcového prevodového systému, a bunky taktiež nevystúpili z bunkového cyklu. To naznačuje, že už u haploinsuficientných myší nedochádza k správnej špecifikácii komorového prevodového systému. (Moskowitz, a iní, 2007)

Mutácie v doménach zodpovedných za väzbu Nkx2.5 na DNA spôsobujú poruchy prevodového systému u ľudí. Tieto mutácie boli prvý krát objavené v rodinách s dedičnými poruchami septa predsiení a atrioventrikulárneho prevodového systému. (Jay, a iní, 2004) Medzi ďalšie poruchy patria poruchy priehradky komôr (VSD), porucha AV kanálu či supraventrikulárna tachykardia. Našli sa u pacientov s inzertovanými nukleotidmi do časti génu kódujúceho HD a následným vytvorením STOP kodónu a translácii skrátenej verzie proteínu. (Sarkozy, a iní, 2005)

Rodiny s poruchami priehradky medzi predsieňami (ASD) majú často AV blok rôznych typov, defekty priehradok a u ľudských pacientov sú v neskoršom veku následkom toho nevyhnutné implantácie pacemakerov. Našli sa mutácie vytvárajúce skoré vytvorenie STOP kodónu a teda skrátené verzie Nkx2.5 proteínu. Tento typ mutácie je pomerne vzácny. (Gutierrez-Roelens, a iní, 2006)

1.3.12. Regulácia iných génov

Množstvo downstreamových srdcových regulačných génov, ktoré sú závislé na Nkx2.5, umiestnili transkripčný faktor Nkx2.5 na vrchol genetickej hierarchie zodpovednej za vývoj srdca v stavovcoch. (Rosenthal & Harvey, 1999)

Expresia ANF bola v komorách homozygotných mutantov zrušená a v predsieňach zachovaná, kým vo wild-type embryách je expresia v oboch oblastiach. Mozgový natriuretický peptid (BNP) bol v komorách takmer neexprimovaný, kým v predsieňach bola expresia porovnateľná s tou vo wild-type. Tieto výsledky ukazujú, že expresia týchto génov v komorách je regulovaná génom *Nkx2.5*, kým v predsieňach je na ňom nezávislá. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) Transkripčná aktivácia ANF pomocou Nkx2.5 je závislá na jeho dávkovaní v heterogénnom systéme, ale až úplný nedostatok Nkx2.5 spôsobuje úbytok expresie ANF *in vivo*. (Nagel,

Kaufmann, Drexler, & MacLeod, 2003) Z toho vyplýva, že endogénna regulácia *ANF* je závislá na dávkovaní *Tbx5* a *Nkx2.5* v tom má dôležitú, ale menej dramatickú úlohu. Plná aktivácia *ANF* je závislá na interakcii oboch transkripčných faktoroch. (Bruneau, 2002)

Strata aktivity *Nkx2.5* je sprevádzaná stratou endogénnej expresie kardiomyoblastových génov ako *GATA-4* a *MEF2C* a zároveň sa výrazne nezmenila expresia génov kostrových svalov počas mezodermálnej indukcie. To ukazuje na dôležitosť *Nkx2.5* pre vývoj mezodermu do kardioblastov, ale nie do kostrových svalov. (Jamali, Rogerson, Wilton, & Skerjane, 2001)

Msx2 je silne exprimované v mezenchýme hltanového oblúku a v myokarde AV kanálu. Nízka úroveň expresie je taktiež v častiach myokardu a perikardia. V mutovaných embryách je však expresia tohto génu nižšia a priestorovo viac rozptýlená, hlavne v oblasti komôr. To poukazuje na pravdepodobnosť potlačenia expresie *Msx2* génom *Nkx2.5*. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

TEF-1 bol exprimovaný ako vo wild-type, tak aj v homozygotne mutantných embryách. *N-myc* transkripty neboli detekované v mutovaných srdciach, ale jeho expresia v neurálnej trubici a mezenchýme hltanového oblúku bola zachovaná. Expresia *MEF2C* bola výrazne downregulovaná v mutantných srdciach. *HAND1* nebol v myokardiu mutantných embryí exprimovaný. Na druhej strane, expresia *GATA-4* a *HAND2* nebola ovplyvnená v mutantných srdciach. Selektívna downregulácia *N-myc*, *HAND1* a *MEF2C* predpokladá, že *Nkx2.5* môže kontrolovať neskorú diferenciáciu srdcových myocytov pomocou downstream transkripčných faktorov. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

V homozygotne mutantných embryách nebola významne utlmená expresia α -srdcového aktínu, (Harvey, 1996) napriek tomu že sa ukázala synergistická aktivácia jeho promotéru spolu so SRF. (Chen, a iní, 1996) Rovnako bola detekovateľná expresia génu *MLC2V* v celom komorovom myokarde. Expresia α -myosin heavy chain a β -myosin heavy chain nebola ovplyvnená v mutantných embryách, (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) aj keď sa na ich regulácii môže *Nkx2.5* podieľať downreguláciou CARP (cardiac muscle-enriched ankyrin-repeat protein). Rovný myogenický fenotyp, ktorý vykazujú *Nkx2.5* mutanty môže poukazovať na hypotézu redundancie, ale taktiež môže hrať úlohu ako regulátor génu *MLC2V*. (Harvey, 1996)

V homozygotných mutantoch je množstvo exprimovaného génu dramaticky znížené, u heterozygotov je znížený čiastočne. (Lyons, a iní, 1995)

Nkx2.5/Tbx5 interakcia má významnú úlohu vo vrodených poruchách srdca, pretože poskytuje mechanizmus rozrušenie bežného srdcového fenotypu spôsobeného haploinsuficienciou jedného z transkripčných faktorov: porušenie stechiometrie Nkx2.5/Tbx5 interakcie znížením dávkovanie jedného z daných proteínov môže viesť k podobnému efektu na ich transkripčných cieľoch. Tbx5 aj Nkx2.5 interagujú so špecifickým väzbovým miestom na promótoře *Cx40* a aktivujú ho priamo. Jeho transkripty sú citlivé na dávkovanie *Tbx5*, kde jeho polovičné zníženie spôsobí takmer úplnú stratu transkripcie *Cx40 in vivo* v myšom srdci. (Christoffels, Keijser, Houweling, Clout, & Moorman, 2000) To naznačuje, že hlavným mechanizmom regulácie génu *Cx40* je obsadenie niekoľkých miest na jeho promótoře transkriptmi Tbx5 a zníženie jeho dávkovania vyúsťuje v nelineárnu odpoveď transkripčného aparátu na tomto lokuse. Kritická hladina Tbx5 tak pôsobí v mechanizme génovej expresie vývoji srdca v určitých oblastiach systémom všetko alebo nič. (Bruneau, 2002)

Expresia ANP v myokarde je pod kontrolou Nkx2.5, keďže jeho transkripty neboli detekovateľne v srdciach *Nkx2.5* knock-outových myšiach. C-koncová oblasť ANP obsahuje oblasti pre Nkx2.5 a GATA-4 a ukazuje sa, že by základná srdcová aktivita ANP promótoře mohla byť mediovaná práve týmito proteínmi. To podporuje aj pozorovanie, kedy odstránenie jedného alebo oboch týchto faktorov znižuje aktivitu ANP. (Durocher & Nemer, 1998)

Nkx2.5 knock-out myši majú abnormálny proepikardiálny vývoj a zníženú expresiu transkripčného faktoru *Wt1*, ktorý sa v srdci zapája v proepikardiu a epikardiu. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010)

Etsrp71 je nedávno objavený transkripčný faktor, ktorý je exprimovaný v endokardiu a endotelii vyvíjajúceho sa embrya, pričom sa jeho expresia vytráca v neskorších vývojových fázach. Jeho odstránenie spôsobuje letalitu embryí. Tento gén je downstream cieľom Nkx2.5 v srdcových progenitorových bunkách. (Ferdous, a iní, 2009)

Regulačné sekvencie v oblasti od -3059 sú dostatočné na aktiváciu bunkovo špecifickej génovej expresia v kritických štádiách určenia bunkovej línie a udržanie

expresie počas organogenézy vo tkanivách exprimujúcich *Nkx2.5*. (Searcy, Vincent, Liberatore, & Yutzey, 1998) Taktiež modifikácia transkripčných faktorov z inaktívnych foriem do foriem aktívnych a opačne pravdepodobne zohráva dôležitú úlohu v rámci regulácie transkripčnej aktivity. (Bruneau, 2002)

1.3.13. Poruchy srdca a jeho vývoja

Srdcové abnormality sú pripisované častejšie komplexnej interakcii medzi génmi a prostredím než mendelevovskej dedičnosti jediného mutovaného génu. Tento prístup však nemusí byť správny, pretože vplyv mutácií v jednej alele a jej vplyv na vrodené poruchy môže byť maskovaný faktormi, ako sú nepresná kosegregácia mutácie a čiastočná penetrancia, rôznorodosť závažnosti poruchy a typ poruchy (čiastočná expresivita) a nesymptomatický jedinci v daných rodinách. (Benson, a iní, 1998) Zhoršujúce sa elektrofyzikálne abnormality u pacientov s normálnou štruktúrou srdca alebo po spontánnej či chirurgickej oprave ASD a vysoká náhla úmrtnosť u pacientov bez pacemakerov naznačuje, že normálne množstvá *Nkx2.5* sú potrebné pre správnu fyziologickú funkciu atrioventrikulárneho uzlu počas života. (Schott, a iní, 1998)

1.3.13.1. Haploinsuficiencia

Abnormality spôsobené mutáciami vo forme delécie jednej alely sú pripisované haploinsuficiencii, čo znamená dvojnásobné zníženie expresie spôsobujúce danú poruchu. Pre gény ako je *Nkx2.5*, ktoré kódujú transkripčné faktory, je haploinsuficiencia zvyčajne definovaná ako podpriemerná hladina proteínu produkovaná z jedinej normálnej alely, čo vedie k patologicky nízkym úrovniam expresie downstreamových cieľov. (Rosenthal & Harvey, 1999) *Nkx2.5* heterozygotné myši majú polovičné množstvo *Nkx2.5* mRNA v porovnaní s wild-type. (Jay, a iní, 2004) Preto majú napríklad polovičené množstvo buniek primordia AV uzla, kým *Nkx2.5* homozygotné knock-out myši ho nemajú. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010) Haploinsuficiencia génu *Nkx2.5* v myšiach vedie k srdcovým fenotypom ktoré sú omnoho menej závažné ako heterozygotné mutácie u ľudí: ASD sa objavuje u 1 % mutantných myší ale u viac než 70 % ľudských pacientov, poruchy prevodového systému, ktoré sú u myší zreteľné, ale nie veľmi závažné, a nerozvíjajú sa do druhého a tretieho stupňa prevodového bloku ako u ľudí, dysmorfogenéza sieňovej priehradky a občasné poruchy aortálnej chlopne.

(Biben, a iní, 2000) V súčasnosti chýba dostatočný zvierací model, ktorý by jasne odrážal vývojové poruchy, ktoré mutácia v tomto géne vyvoláva na ľuďoch. (Elliot, a iní, 2006)

Závažné fenotypy spojené s heterozygotnou mutáciou v *Nkx2.5* sú prekvapujúce, keďže tento typ mutácie u modelových organizmoch nemá tak dramatické následky. Tieto rozdiely môžu odrážať skutočnosť, že tieto problémy sú sledované u ľudí len vo vážnych prípadoch. Taktiež môžu byť rozdielne formy vývoja srdca, genetická redundancia u ľudí alebo ešte neodhalené fenotypové prejavy u heterozygotných myší. (Benson, a iní, 1999) Počiatočná predstava o tom, že *Nkx2.5* heterozygotné mutácie sú v ovplyvnených myšiach recesívne, bola zmenená na základe nedávnych klinických štúdií, ukazujúcich na niekoľko vrodených srdcových porúch spôsobených zdedenou mutáciou iba v jednej alele ľudského *Nkx2.5* génu. (Schott, a iní, 1998)

Sledovanie závislosti rýchlosti vedenia vzruchu na sile stimulácie ukázala, že sila stimulácie nemá na prevodový systém heterozygotne mutantných ani wild-type srdcí žiaden efekt. Aj keď *Nkx2.5* haploinsuficiencia spôsobuje drobné zmeny v bunkách exprimujúcich Cx40 v dolnej časti AV uzla smerom k Purkyňovému systému, vnútorná funkcia buniek vyzerá byť normálna. Absencia skracovania Inf-H intervalu v heterozygotne mutantných srdciach nesúvisí s absolútnou neschopnosťou skrátenia PR intervalu. Adrenergná stimulácia zrýchľuje tepovú frekvenciu srdca a AV prevod vzruchu. (Gazit, Li, Choi, Miquerol, & Jay, 2014) Keďže sa u haploinsuficientných myšiach nevyvinul AV blok prvého stupňa do štvrtého týždňa, hypoplázia ani neprítomnosť proximálnej časti AV uzla nie sú dostatočné aby spôsobili poruchy v prevodovom systéme v mladých myšiach, aj keď sa môžu podieľať na patogenéze. Hisov zväzok v *Nkx2.5* haploinsuficientných myšiach je tenký a jemný v porovnaní s wild-type. Hypoplastický Hisov zväzok môže priamo vysvetliť nízku amplitúdu depolarizačného signálu Hisovho zväzku nameraného v *Nkx2.5* mutantných srdciach. (Jay, a iní, 2004)

1.3.13.2. Knock-out

Šírenie srdcového impulzu a kontrakcií je v *Nkx2.5* knock-outových myších embryách vymykajúce sa normálu. V 75 % embryí je tlkot srdca nízky (32 úderov za minútu oproti 60 vo wild-type), čo môže poukazovať na nedostatočný vývoj alebo poruchu sinoatriálneho (SA) uzla. V 25 % prípadoch sa sťahy objavovali najprv v komore, čo indikuje nefunkčnosť SA uzlu alebo jeho nahradenie iným pacemakerom,

ako je napríklad AV. Zrejme aj následkom týchto porúch majú srdcia *Nkx2.5* homozygotne mutantných embryí poruchy v hnaní krvi zo srdca. Hemodynamická nedostatočnosť u *Nkx2.5* knock-out myší sa odráža v cievnom fenotype, ktorý je charakterizovaný zúžením aorty. (Dupays, a iní, 2005)

1.3.13.3. Nadexpresia *Nkx2.5*

V súčasnosti nie sú odhalené žiadne choroby spôsobené nadexpresiou alebo konštitutívne aktívnymi mutáciami *Nkx2.5*. Myšie modely tejto nadexpresie sú spojené s abnormalitami v prevodovom systéme srdca, pravdepodobne čiastočne modulované downstreamovými efektmi inhibície konexínových izoforiem. Tieto poruchy AV prevodového systému pretrvávajú do dospelosti. V modeloch nadexpresie *Nkx2.5* neboli identifikované žiadne štruktúre poruchy srdcí u myší starých dva týždne, pri šiestich týždňoch sa napriek žiadnym morfológickým zmenám začali objavovať krvné zrazeniny v ľavých predsieňach. Tkanivá prevodového systému boli histologicky normálne usporiadané a umiestnené, ale chýbali niektoré markery prevodového systému. Nadexpresia transkripčne aktívneho génu *Nkx2.5* odhalila postnatálne poruchy AV uzlu so zachovaním prevodového systému sinusového uzlu, siení a vzdialenejších častí systému. Postnatálna nadexpresia *Nkx2.5* môže hrať dôležitú úlohu v inhibícii prevodového systému s downreguláciou *Cx43* a *Cx40*. Keďže sú tieto gény exprimované heterozygotne, zníženie expresie týchto konexínových génov je iba čiastočné. (Wakimoto, a iní, 2003)

Expresia *Nkx2.5* je zvýšená v hypertrofovaných srdciach. Hladina srdcových génov ako je *ANP*, *BNP*, *CARP* a *MLC2V* je v *Nkx2.5* transgénnych myšiach upregulovaná. Tým sa ukazuje, že samotné *Nkx2.5* a jeho nadmerná expresia nie je dostatočné na spôsobenie hypertrofie srdca, ale že pôsobí skôr ako kontrolný srdcový genetický program v srdciach embryí aj dospelých myšiach. *Nkx2.5* sa teda exprimuje v nadmernej miere v odpovedi na hypertrofnú stimuláciu a môže mať implikácie v transkripčnej regulácii program srdcových génov v hypertrofovaných srdciach. (Akazawa & Komuro, 2003)

1.3.14. Vrodené poruchy u ľudí

Nkx2.5 transkričný faktor sa zapája do vývojových rolí vrátane komorového, sieňového rozdelenia pomocou priehradky a AV prevodového systému. Mutácia v tomto géne môže spôsobiť AV blok bez predošlých prejavov vrodených srdcových porúch. (Benson, a iní, 1999) Databáza oddelenia Kardiológie v Bostonskej detskej nemocnici obsahuje záznamy 360tich pacientov s kompletným srdcovým blokom a anatomickou poruchou, z období medzi rokmi 1988 a 2002, z nich bolo 13 potvrdených ako vrodené vady. Bola u nich odhalená 1-tranzpozícia veľkých tepien (1-TGA) a heterotaxia s izomerizmom ľavej predsieni. V prípade 1-TGA sú pravá a ľavá komora umiestnené opačne v relatívnej pozícii, aby sa z nich stali systemické a pľúcne pumpovacie komory. V heterotaxii je ľavá a pravá asymetria predsiení, pľúc, brušných vnútorných orgánov nesprávna. Pacienti s heterotaxiou majú predsieni, štruktúry a orgány z jednej strany nachádzajúce sa na strane druhej, z čoho vyplývajú názvy ľavý a pravý izomerizmus. Sprievodným javom bývajú aj poruchy endokardiálneho vankúša, ako sú poruchy AV kanála. Neprítomnosť srdcového bloku v prípadoch zvyšných pacientov predpokladá špecificitu daných etiológií. Preto je možné, že prevodové poruchy v 1-TGA sú zrejme spojené s nesprávnym ohybom srdcovej trubice a nie s defektmi ako sú komorová hypoplázia, VSD alebo valvulárne abnormality. Ak môže vývoj prevodového systému spôsobiť jeho postnatálne poruchy, nepôjde o vždy prítomný alebo neprítomný fenotyp. Začínajúca vážnosť poruchy prevodového systému je rôznorodá a môže sa časom zhoršovať, môže mať však aj vrodený základ. Neskorý vývoj bloku prvej triedy v mutantných myšiach pripomína vývoj bloku v ľuďoch s mutáciou v Nkx2.5 alebo vo vrodených srdcových poruchách ako 1-TGA a heterotaxia. (Jay, a iní, 2004) Rovnako majú títo pacienti s heterozygotnou mutáciou v Nkx2.5 časté ASD a s možným AV blokom. Môžu sa objaviť taktiež Fallotova tetralógia a porucha septa komôr. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010)

Štúdia od Gioli-Pereira naznačila, že napriek neexistujúcej priamej korelácie medzi genotypom a fenotypom majú mutácie somatického pôvodu vo väzbových doménach Nkx2.5 spojitosť s AVSD a VSD na základe straty funkcie proteínu. (Gioli-Pereira, a iní, 2010)

2. METODIKA PRÁCE

Štúdium elektrických a mechanických vlastností srdca na zjednodušených modeloch *in vitro* tkanivových kultúr predstavuje určité výhody. Ak sú myocyty kultivované v správnych podmienkach dostatočne dlhú dobu, vytvoria vrstvu buniek – funkčné syncýtium spojené gap junctions, čím sa priestorová geometria myokardu rozloží do dvojrozmerného modelu. Na ňom je možné skúmať bunkové a molekulárne deje. (Vostarek, Sankova, & Sedmera, 2014) V prípade tejto diplomovej práce by však táto metóda nebola dostačujúca, keďže vývoj srdca ako taký je pod reguláciou mnohých transkripčných faktorov, exprimovaných v rôznych časoch a na rôznych miestach počas vývoja srdca, od základnej trubice až po komplexný komorový orgán. Preto som sa zameral na živý transgénny myší model, v ktorom je narušená štruktúra proteínu Nkx2.5, a je nahradená fluorescenčným proteínom GFP. Tým sa nie len že ukáže, v ktorých častiach srdca a tela je tento gén exprimovaný (u heterozygotných mutantov s jednou nahradenou alelou), ale fenotypizácia môže prebiehať fluorescenčnou mikroskopiou a hľadani narušených štruktúr.

Základným cieľom práce so srdcami myších embryí v období vývoja 9,5 d.p.c bola čo najrýchlejšia a najprecíznejšia disekcia, z ktorej bolo potrebné získať bijúce srdcia, ich následné zafarbenie napätovo citlivými farbami, inhibícia pohybov spôsobených kontrakciami na základe ešte stále prebiehajúcich napätových vzruchoch a samotné optické mapovanie pod intenzívnym diódovým zdrojom žiarenia. Technická náročnosť tohto postupu mala niekoľko vrstiev.

2.1. Konštrukcia *Nkx2.5^{GFP}* alel

Na elektrofyzologické pokusy skúmajúce aktivitu a prechod elektrického signálu srdca som použil myší model s vloženou sekvenciou pre GFP do *Nkx2.5* na pozíciu odpovedajúcu 35. aminokyselinovému zvyšku proteínu podľa (Biben, a iní, 2000) Pôvodne používaný model s alelami obsahujúcimi kazetu s neomycínovou rezistenciou (pgk-Neo) v sekvencii tretieho helixu homeodomény nebol použitý, keďže nie vždy boli tieto alely úplne nulové. (Harvey, 1996) Aminokyselinové zvyšky v pozíciách 141 až 184, ktoré reprezentujú N-koncovú časť HD, boli taktiež cieľným vektorom odstránené, čím bol spôsobený posun čítacieho rámca.

K získavaniu potomstva sa pripúšťajú páry v kolóniách 2 samcov a približne 10 samíc, z čoho všetci majú heterozygotný genotyp. Po opakovanom pomnožovaní sa samci krížili s WT samicami, z ktorých potomstva sa heterozygotní potomkovia nechávali na ďalšie kríženie. Po pripúšťaní sa odpočítavajú vaginálne zátky a denne sa samice vážia. V deviatom dni po párení (poldeň po odčítaní zátky, páranie prebiehalo v noci) by mali pribrať aspoň 2 g, aby sa zvýšila pravdepodobnosť tehotenstva a nehubili sa netehotné myši.

2.2. Disekcia myších embryí

Toto vývojové štádium myších embryí je na hranici zlyhania srdca a následnej smrti, keďže na základe morfológických porúch nie je schopné nesprávne sformované srdce pumpovania krvi celým telom embrya. Preto bolo dôležité správne načasovanie disekcie. Keďže hlavnou náplňou tejto práce je zistiť vplyv dávkovania génu *Nkx2.5* na elektrofyziológiu myšieho srdca, potreboval som čo najväčšie množstvo srdc z heterozygotných a mutantne homozygotných jedincov.

Po usmrtení tehotnej myši cervikálnou dislokáciou som disekoval brušnú oblasť, z ktorej som vybral embryonálne vaky. Tie som udržiaval v roztoku TYRODES (zloženie podľa (Benes Jr., a iní, 2014): NaCl 145 mmol/l, KCl 5,9 mmol/l, CaCl₂ 1,1 mmol/l, MgCl₂ 1,2 mmol/l, glukóza 11mmol/l, HEPES 5 mmol/l; pH = 7,4) na vychladenej podložke. Otváranie vakov prebiehalo jednotlivo, pričom vzhľadom k veľmi malej veľkosti embryí (2-5 mm) celá ďalšia disekcia prebiehala pod osvetlenou lupou. Po vybraní embrya z vaku nasledovalo odstránenie embryonálnych obalov a odstránenie hlavovej a chvostovej časti. Následne som odstránil hrudnú stenu, vrchnú membránu tvorenú bunkami, ktoré delia okolité prostredie od samotného vyvíjajúceho sa srdca, aby sa farbiaca látka mohla dostať ku kardiomyocytom.

2.3. Farbenie

Existuje množstvo optických metód na štúdium prevodu elektrickej aktivácie excitovateľnými tkanivami, fungujúcimi na princípe supravitálneho farbenia pomocou napäťovo citlivých farieb. (Fujii, et al., 1980; Kamino, et al., 1981) Toto farbenie musí poskytovať dostatočný signál ukazujúci na zmenu napätia. Hlavným problémom pri optickom mapovaní je nestabilita farieb, s čím súvisí tvorba cytotoxických rozpadových

produktov. Kvôli tomuto vedľajšiemu efektu použitej farby boli zafarbené srdcia vystavované excitačnému žiareniu po čom najkratší potrebný čas.

V tejto práci je použitá farbiaca látka di-4-ANEPPS (Calbiochem), ktorá sa inkorporuje do bunkovej membrány kardiomyocytov na základe svojej lipofilnej časti molekuly. Zmena elektrického napätia je nepriamo úmerná excitovanému žiareniu tejto farby, preto sú tieto rozdiely snímané kamerou a vyhodnocované ako prechod elektrického vzruchu kardiomyocytmi. (Hassner, Birnbaum, & Loew, 1983) Táto farba bola vybraná na základe komerčnej dostupnosti a dobrých fluorescenčných vlastností.

Ďalším problémom sú artefakty spôsobené samotným pohybom srdca počas snímania obrázkov. Aby som zabránil nadmernému množstvu pohybových artefaktov vo výsledných optických mapách, použil som pohybový inhibítor blebbistatin. Blebbistatin je inhibítor myozínu typu II (Straight, a iní, 2003) a aktín-myozínových interakcií. Je to silný inhibítor aktín-myozínových interakcií. Kontrakcie stimulovaného papilárneho svalu a skracovanie izolovaných kardiomyocytov bolo zastavené blebbistatínom v mikromolárnych koncentráciách (1,3 – 2,8 μM). Inhibičné konštanty sú podobné ako srdcových myozínových fragmentov, čo naznačuje, že blebbistatín funguje podobne v rámci vlákňitého myozínu srdcového kontraktilného aparátu a izolovaných proteínov. Inhibícia nie je spojená so zmenou akčných potenciálov alebo znížením prietoku v Ca^{2+} kanáloch. Potvrdzujú to pokusy na permeabilizovanom srdcovom svale, pretože inhibícia nebola na základe zmeny citlivosti Ca^{2+} kontraktilných vlákien. 1 μM koncentrácia blebbistatínu nespôsobila skrátenie maximálnej kontraktilnej rýchlosti. (Dou, Arlock, & Arner, 2006)

Srdcia boli farbené po dobu 5 minút v jamkovej podložke, v ktorej bol pripravený roztok z 1 ml TYRODES, 25 μl farbiacej látky di-4-ANEPPS a 10 μl blebbistatínu. Po uplynutí danej doby boli embryá s oddelenou hlavovou a chvostovou časťou s odhaleným srdcom prišpendlené do silikónom vystlanej misky, v ktorej prebieha samotné mikroskopovanie. Nachádzal sa v nej roztok TYRODES s 25 μl blebbistatínu, aby sa kompletne zabránilo kontraktilným pohybom ešte žijúceho srdca. Celá miska bola prekysličovaná bublaním kyslíku, ktoré bolo prerušené len počas samotného snímania. Miska bola kontinuálne vyhrievaná na 37 °C, aby boli napodobnené podmienky živého organizmu. Takto pripravené embryá boli pripravené na optické mapovanie.

2.4. Optické mapovanie

Pre mikroskopovanie väčších objektov než sú bunkové kultúry sa používa osvetľujúce systémy využívajúce typicky žiarivé diódy, v tomto prípade 150W xenónová výbojka. Na rozdiel od iných techník optického mapovania, mnou použitý spôsob redukoval trojdimenzionálnu štruktúru srdca do rovinatej plochy. Sploštenie a natiahnutie srdca, ktoré sa pri týchto technikách niekedy používa, by mohlo viesť k zmene prevodových vlastností myokardu na základe ovplyvnenia mechanických iontových kanálov, ktoré menia svoj stav na princípe mechanického ťahovania bunecnej membrány (Dou, Arlock, & Arner, 2006), preto som tento spôsob nepoužil.

Použitý kamerový senzor CMOS má vysokú citlivosť a rýchlosť do 10 000 fps (obrázkov za sekundu) v spojení s príslušnými systémami, ako je vysokorýchlostná Ultima L kamera (SciMedia Ltd., Japan). Snímky boli získané pri 1 kHz. Vzorky boli ožarované zeleným svetlom (480-530 nm). Zníženie intenzity emitovanej fluorescence koreluje so zmenou membránového potenciálu kardiomyocytov. (Sedmera D. , a iní, 2002)

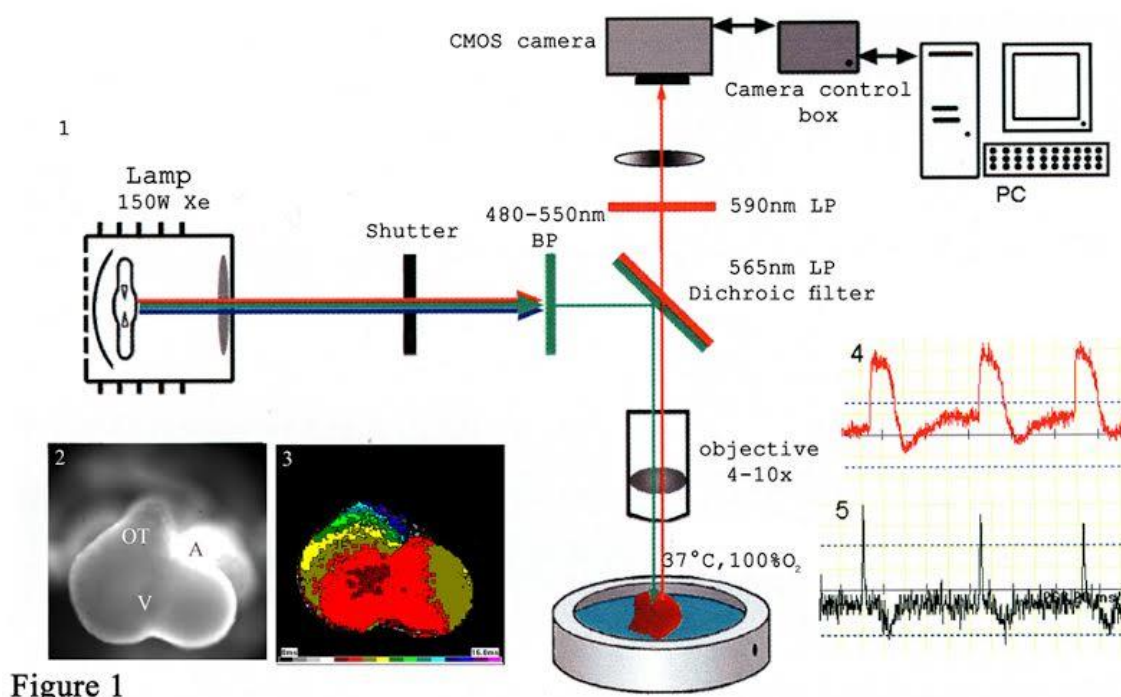


Figure 1

Obrázok 5: Princíp optického mapovania: schématický diagram mikroskopu (1), mikroskopická fotografia embryonálneho srdca (2) a jeho aktivačná mapa (3), optický „surový“ záznam signálu a akčného potenciálu (4), rovnaký signál spracovaný príslušným filtrovaním a prvou deriváciou (5). (Sedmera D. , a iní, 2005)

Po získaní obrázkov boli torzá odstránené z misky, vložené do eppendorfových skúmaviek s 4% paraformaldehydom a uložené v chlade, pripravené na prejasňovanie za účelom konfokálnej mikroskopie.

2.5. Analýza dát

Na analýzu surových dát bol použitý software BV_Analyzer. Po digitálnom filtrovaní pomocou low pass filtru, ktorý odstraňuje vysokofrekvenčný šum, a mediánovým filtrom bola numericky vypočítaná prvá derivácia, a jej najvyšší vrchol v každom pixely bol použitý ako indikátor času jeho aktivácie. (Vostarek, Sankova, & Sedmera, 2014) Následne boli vytvorené optické mapy korešpondujúce s čiernobielymi fotografiami, kde množstvo izochrón zodpovedá rýchlosti vedenia vzruchu – každá izochrona značí vzdialenosť prevodu elektrického vzruchu za danú jednotku času (1 alebo 2 ms). Čím viac izochrón, tým bol potrebný dlhší čas na prechod danej oblasti.

Vzhľadom k trojrozmernému srdcu boli srdcia smerované takým spôsobom, aby sa optickým mapovaním dosiahla analýza plochy komôr, ktoré sa už v tomto štádiu u wild-type myší začínajú morfologicky diferencovať.

2.6. Prejasňovanie

Pre určenie genotypu som zvolil jednoduchú a presnú metódu určovania na základe morfológie myšieho srdca spolu s expresiou GFP v mutantných alelách. Pre potreby konfokálneho mikroskopovania je potrebné čo najviac zabrániť možnosti rozptylu svetla prechodom cez opticky nie úplne priechodné materiály, medzi ktoré patrí aj organické bunkové tkanivo. Tomuto rozptylu je možné zabrániť tzv. prejasňovaním, ktoré zvyšuje transparentnosť tkaniva a zjednocuje refraktilný index v rôznych populáciách buniek.

Na prejasňovanie som použil roztok s názvom *Scale*, ktorý spriehľadňuje celé myšie embryá a na rozdiel od organických rozpúšťadiel typu BABB (Miller, a iní, 2005) zachováva plnú fluorescenciu fluorescenčných proteínov. Týmto spôsobom je možné snímať obrázky až do hĺbky niekoľkých milimetrov do tkaniva. Najlepšie aplikovateľný roztok sa skladá z 4 M močoviny, 10% glycerolu a 0,1% Triton X-100. (Hama, a iní, 2011)

2.7. Konfokálna mikroskopia

Trojdimenzionálne získavanie obrázkov organických tkanív vyžaduje optické „rezanie“ po vertikálnej ose, aby sa dosiahla dostatočná presnosť obrazu. V súčasnosti sa štandardná laserová skenovacia konfokálna mikroskopia dostane do hĺbky približne 150 μm pod povrch tkaniva. Vďaka použitiu prejasňovacieho roztoku Scale som sa pri snímaní obrazu dostal do hĺbky niekoľkých milimetrov, čo na určenie fenotypu bolo postačujúce.

V mutantných srdciach bol taktiež dramaticky zhoršený vývoj trabekulového systému a cievneho systému srdca. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) Tento fakt sa prejavoval už u mutantne heterozygótnych embryách, kde napriek dostatočne sformovanému trabekulovému systému bolo vďaka jednej mutantnej alele *Nkx2.5* exprimované GFP v štruktúrach, kde sa bežne vyskytuje. Preto ako forma určenia fenotypu bola fluorescenčná konfokálna mikroskopia dostačujúca.

Na konfokálnu mikroskopiu som používal konfokálny mikroskop Olympus s rozlíšením 1024x1024, objektív s 10-násobným zväčšením s NA0.4, excitácia 488 nm, GFP emisia pri 546 nm a autofluorescenciu tkaniva pre kontrast tkanív. Princíp práce spočíval v urobení niekoľkých desiatkov hĺbkových rezov a vybranie tých obrázkov, ktoré najjednoduchšie určujú, že srdce má alebo nemá trabekulový systém a prípadne exprimuje GFP.

3. VÝSLEDKY

3.1. Genotypizácia

Určenie genotypu je dôležité kvôli správne definovaniu vplyvu dávkovania génu na príslušný fenotyp. V prípade myší, ktoré boli na tieto pokusy použité, sa v ich alele pre gén *Nkx2.5* nachádzala dopĺňajúca informácia pre expresiu génu pre GFP. (Biben, a iní, 2000) Vďaka vloženiu tohto génu do znefunkčneného *Nkx2.5* bolo GFP exprimované na mieste a v čase, kedy by bol vo wild-type embryu exprimovaný funkčný transkripčný faktor *Nkx2.5*. Ide o srdcový mezoderm, mezokard a časti myokardu. (Gittenberger-de Groot, et al., 2007; Bruneau, 2002) Disekované embryá boli najskôr vystavené fluorescenčnému svetlu, vďaka ktorému sa určila prvotná genotypová informácia – buď boli negatívne na exprimované GFP a nevykazovali žiadnu fluorescenciu v srdci, alebo boli fluorescenčne aktívne a teda mali aspoň jednu alelu tohto génu vloženú do pôvodnej verzie *Nkx2.5*.

Druhé a potvrdzujúce určovanie mutantného genotypu bolo použitím konfokálnej mikroskopie, kedy sa na jednotlivých rezoch prejasnených embryí hľadal trabekulový systém. Tento systém je u heterozygótov a wild-type homozygótov zachovaný v morfolologickej podobe zdravých myší, ale je dramaticky zredukovaný až úplne chýbajúci v embryách homozygotne mutantných. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

Vďaka silnému prejasneniu embrya pomocou roztoku *Scale* mi bolo umožnené vytvárať konfokálne rezy do veľkej hĺbky, a tak pomocou mikroskopu určiť do akej miery sú vnútorné morfologické štruktúry srdca narušené alebo zachované. Bez tohto roztoku by bolo určovanie genotypu pomocou tejto techniky mikroskopovanie náročnejšie a s menšou mierou relevantnosti, preto práve jeho zavedenie do metodiky mi dovolilo zjednodušiť určovanie dávkovania génu na dvojkrokový a rýchly proces, kým iné genotypizačné techniky sú náročnejšie na čas, materiál aj energiu.

3.1.1. Wild-type

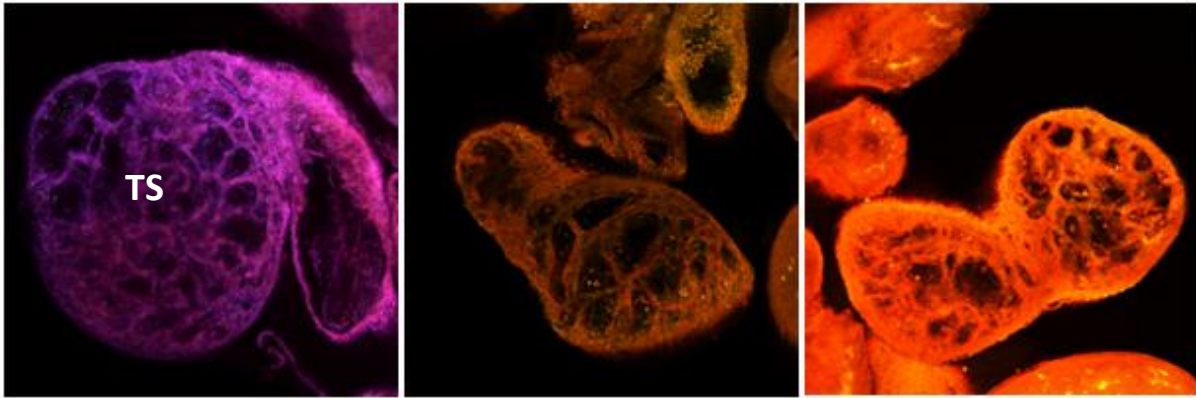
Wild-type myši mali obe alely pre gén *Nkx2.5* pôvodné, tzn. bez vloženého *GFP* génu. Tieto embryá sú plne životaschopné s nezmenenou funkčnosťou reprodukcie.

Expresia *Nkx2.5* sa nedá sledovať značením GFP, keďže ten je exprimovaný iba v heterozygotných alebo homozygotne mutantných embryách. Určenie genotypu je priame, pretože ak nedochádza k expresii GFP, jednoznačne to poukazuje na to, že sa v organizme nachádzajú obe alely génu *Nkx2.5* v neporušenej, wild-type verzii.

V pokusoch s disekciou ešte žijúcich embryí zohrával jednu z hlavných úloh čas. Bolo nevyhnutné čo najrýchlejšie odobrať, pripraviť a nafarbiť embryá, aby sa zachovala elektrická činnosť srdca – tá bola cieľom optického mapovania. Kvôli tejto skutočnosti som pre porovnanie a kontrolu dávkovania sledovaného génu zmapoval srdcia 42 wild-type myších embryí. Následne všetky ďalšie pokusy prebiehali s pridaním ďalšieho kroku do metodiky práce, ktorým bola kontrola fluorescenčnej emisie v mikroskope, v ktorom prebiehalo aj samotné optické mapovanie. Keď boli embryá negatívne na expresiu GFP, boli následne vylúčené z pokusu za účelom ušetrenia času, pretože homozygotne mutantné aj heterozygotné mutanty sa ukázali byť veľmi citlivé na dlhodobé udržiavanie mimo tela matky, napriek fyziologickým podmienkam, v ktorých som ich udržoval.

Na konfokálnom mikroskope tieto srdcia vykazovali morfológickú štruktúru fenotypu typického pre wild-type myšie modely pre dané vývojové štádium, ako bolo opísané v štúdií (Webb, Brown, & Anderson, 1998). Srdcová trubica bola správne ohnutá a začalo sa jej rozčleňovanie do komôr, s ustupujúcimi stranami trubice, neskôr tvoriace predsieni a výtokové cievne systémy. Trabekulová sieť tvorila štruktúry podporujúce správnu morfológiu a fyziológiu srdca. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

V týchto prípadoch určenie genotypu na základe korelácie genotyp-fenotyp bolo jednoznačné. V prípadoch neprítomnej expresie GFP morfológické určenie na konfokálnom mikroskope vždy potvrdilo fenotyp wild-type myšieho modelu. Myšie embryá mali veľkosť od 3 do 5 mm s dobre vyvíjajúcou sa morfológiou všetkých častí tela.



Obrázok 6: Na obrázkoch sú fotografie srdcí s wild-type fenotypom z konfokálneho mikroskopu, vykazujúce typické štruktúry srdca – trabekulovú sieť (TS).

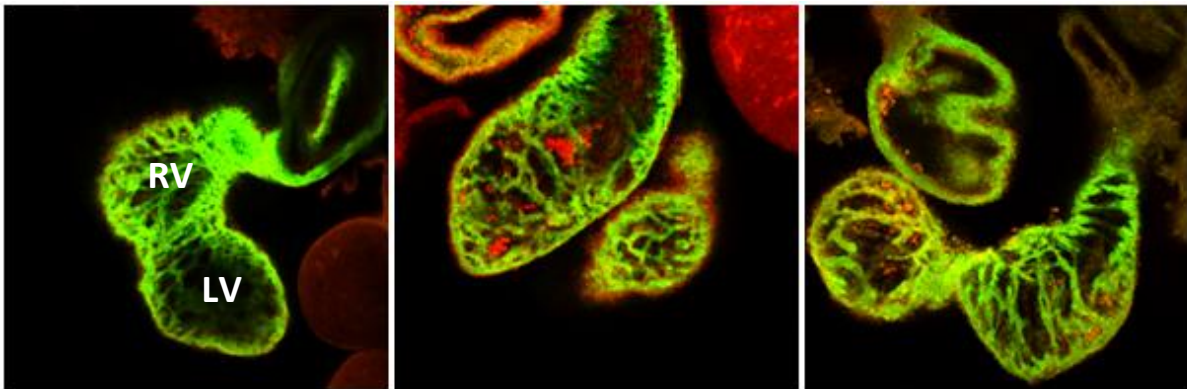
3.1.2. Heterozygoti

Pri kontrole fluorescenčnej emisie v mikroskope na optické mapovanie emitovali heterozygotne a homozygotne mutantné embryá žiarenie súhlasiace s GFP proteínom. V prípade heterozygótov je množstvo transkribovanej mRNA polovičné ako v prípade wild-type, (Jay, a iní, 2004) na tomto mikroskope však nebolo možné určiť rozdiel v žiarivosti GFP a porovnať tak množstvá exprimovaného GFP, čím by sa podarilo určiť dávkovanie génu *Nkx2.5* v každom GFP exprimujúcom embryu. V prípade heterozygótov je jedna alela narušená vložení *GFP* génu a druhá je pôvodná, typu wild-type.

Pri disekcii bolo možné približne rozpoznať heterozygotný fenotyp embryí na základe morfológie takmer rovnakej s morfológiou wild-type srdcí aj embryí. Srdcia boli už na pohľad pod lupou viditeľne rozdelené na časti, z ktorých sa neskôr vyvíjajú srdcové komory s vyvíjajúcou sa prepážkou medzi nimi. Jediným rozdielom oproti wild-type bola práve fluorescencia GFP v srdci. Konfokálne mikroskopovanie v týchto prípadoch potvrdilo exprimovanie génu *GFP* na základe fluorescencie tkanív, v ktorých je *Nkx2.5* exprimované.

Morfológia srdca bola takmer identická s morfológiou wild-type srdcí, s vyvinutými štruktúrami (Webb, Brown, & Anderson, 1998) ako sú trabekulový systém, fragmentácia a ohyb srdcovej trubice so začiatkom vývoja komôr, predsiení aj výtokových častí cievneho systému. Tieto srdcia vo väčšine prípadov vykazovali kontrakčnú aktivitu počas disekcie, čo potvrdzovalo ich životaschopnosť.

V niektorých prípadoch bol svetelný signál z konfokálneho mikroskopu nedostačujúci, a preto napriek prvotnému pozorovaniu fluorescencie GFP proteínu počas optického mapovania, som pre čo najväčšie vylúčenie ľudskej chyby tieto embryá nezaradil ani medzi wild-type ani medzi heterozygótov. Trabekulová sieť a rozdelenie srdca do kompartmentov určila, že sa nejedná o knock-out fenotyp, ale jednoznačné určenie nebolo možné. Táto nedostatočnosť fluorescenčného signálu bola pravdepodobne spôsobená časovým oddelením medzi konfokálnou mikroskopiou a optickým mapovaním, kedy časové rozhranie medzi týmito dvomi úkonmi bolo aj niekoľko dní. Počas nich mohlo dôjsť k vyžiareniu GFP na základe skladovania v nesprávnych podmienkach.



Obrázok 7: Na obrázkoch sú snímky z konfokálneho mikroskopu zobrazujúce heterozygotný fenotyp. Tento fenotyp sa vyznačuje prítomnosťou trabekulovej siete a súčasne expresiou GFP proteínu v tkanivách, kde je normálne exprimovaný *Nkx2.5*. (LV – ľavá komora, RV – pravá komora)

3.1.3. Knock-out

V embryách, kde sú obe alely *Nkx2.5* narušené vloženíím *GFP* génu, dochádza k poruche expresie funkčného *Nkx2.5* proteínu. To ma za následok narušenie morfológie vyvíjajúceho sa embrya aj elektrofyziológie prevodového systému.

Embryá už na prvý pohľad neboli dostatočne vyvinuté, v prevažnej väčšine prípadov boli menšej veľkosti (1,5-3,5 cm) s nesprávne vyvinutou morfológiou hlavovej aj trupovej časti tela. V niektorých prípadoch boli embryá deformované spôsobom, ktorý zabraňoval ďalším krokom pokusu, alebo boli tak krehké, že samotná extrakcia pri disekcii ich narušila do úrovne nepoužiteľnosti pre optické mapovanie. Napriek deštrukcii tkanív som sa snažil aspoň približne určiť genotyp, a vo väčšine prípadov aj poškodené a neurčiteľné tkanivá vykazovali GFP fluorescenciu, takže išlo o aspoň

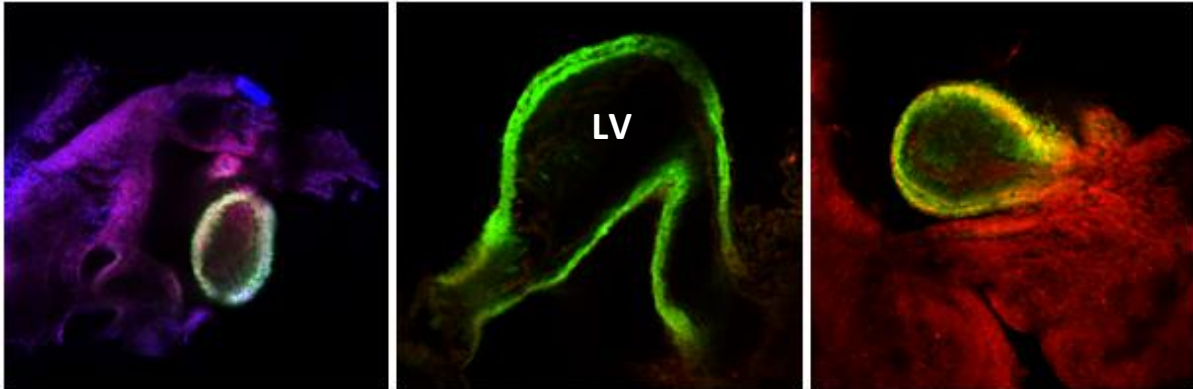
čiasočnú expresiu GFP namiesto funkčného Nkx2.5. To naznačuje, že heterozygótne alebo homozygótne embryá mali tendenciu prenatálnej smrti.

Srdcia knock-outových embryí mali poruchy v ohybe srdcovej trubice, v ktorej taktiež neboli dostatočne vyvinuté stredové oblasti, z ktorých sa neskôr zväčšením vyvíjajú srdcové komory. (Lyons, a iní, 1995) V niektorých prípadoch, kedy sa mi podarilo disekovať homozygotne mutantné embryá v čase, kým ešte vykazovali aktivitu, bolo vidieť kontraktilné vlnenie v srdcovej trubici. To poukazuje na to, že v tomto štádiu ešte srdce čiastočne spĺňa funkciu pumpovania krvi v embryu. Podarilo sa mi teda odhadnúť správne obdobie, po ktorom dochádza k odumieraniu embrya následkom ďalšej neschopnosti srdca spĺňať svoje fyziologické funkcie následkom absencie morfológických štruktúr ako sú trabekulová sieť, ktoré sa podieľajú na správnom fungovaní orgánu. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999)

Tieto embryá boli náročné na zachovanie v správnych fyziologických podmienkach, aby sa zachovalo bijúce srdce. Z viac než 140 disekovaných embryí boli fenotypu knock-out približne 30 jedincov. Z toho väčšia časť po farbení nevykazovala normálnu funkčnú aktivitu. Bolo to spôsobené buď cytotoxickým efektom blebbistatínu, farbivacej látky di-4-ANEPPSu alebo produktmi ich degradácie následkom svetelnej aktivácie, či samotným zákrokom, ktorý napriek dodržaním čo najjemnejšieho mechanického zaobchádzania mohlo spôsobiť poškodenie prevodového systému srdca. (Dou, Arlock, & Arner, 2006) Pri mechanickom roztvorení hrudnej steny aj pri jemnom nesprávnom uchopení tejto bunkovej vrstvy na srdci dochádzalo často k poškodeniu, ktoré viedlo k porušeniu kontrakčnej funkcie srdca. Preto bola jemnosť a detailnosť práce jedným z najdôležitejších faktorov, a popri krátkosti času, ktorý bol potrebný na prípravu na optické mapovanie, jedným z najčastejších krokov, pri ktorých dochádzalo k poškodeniu.

Konfokálne mikroskopovanie potvrdilo expresiu GFP v srdcovej časti torza. Morfológia mutantného srdca knock-outových embryí odpovedala popisu fenotypu s mutáciou narušujúcou obe alely v jednom organizme. (Tanaka, Chen, Bartunkova, Yamasaki, & Izumo, 1999) Týmto mutantom chýbala takmer celá trabekulová sieť, čo môže byť jedna z hlavných príčin skolabovania kontraktilných a pumpovacích funkcií srdca. Tieto srdcia boli na konfokálnych rezoch menšieho priemeru a neboli dostatočne diferencované do komorového systému ako srdcia heterozygótov alebo wild-type

embryí. V porovnaní s normálnymi srdcami sú vnútorné štruktúry aj komorový systém deformované. Expresia GFP a závažné narušenie morfológie srdca odhalené konfokálnym mikroskopom jednoznačne určuje homozygotne mutantný fenotyp embrya.



Obrázok 8: Na týchto obrázkoch sú snímky homozygotne mutantných srdcí, ktoré vykazujú exprimáciu GFP a jasne ukazujú na chýbajúcu štruktúru trabekulového systému. Hlavná štruktúra je ľavá komora (LV).

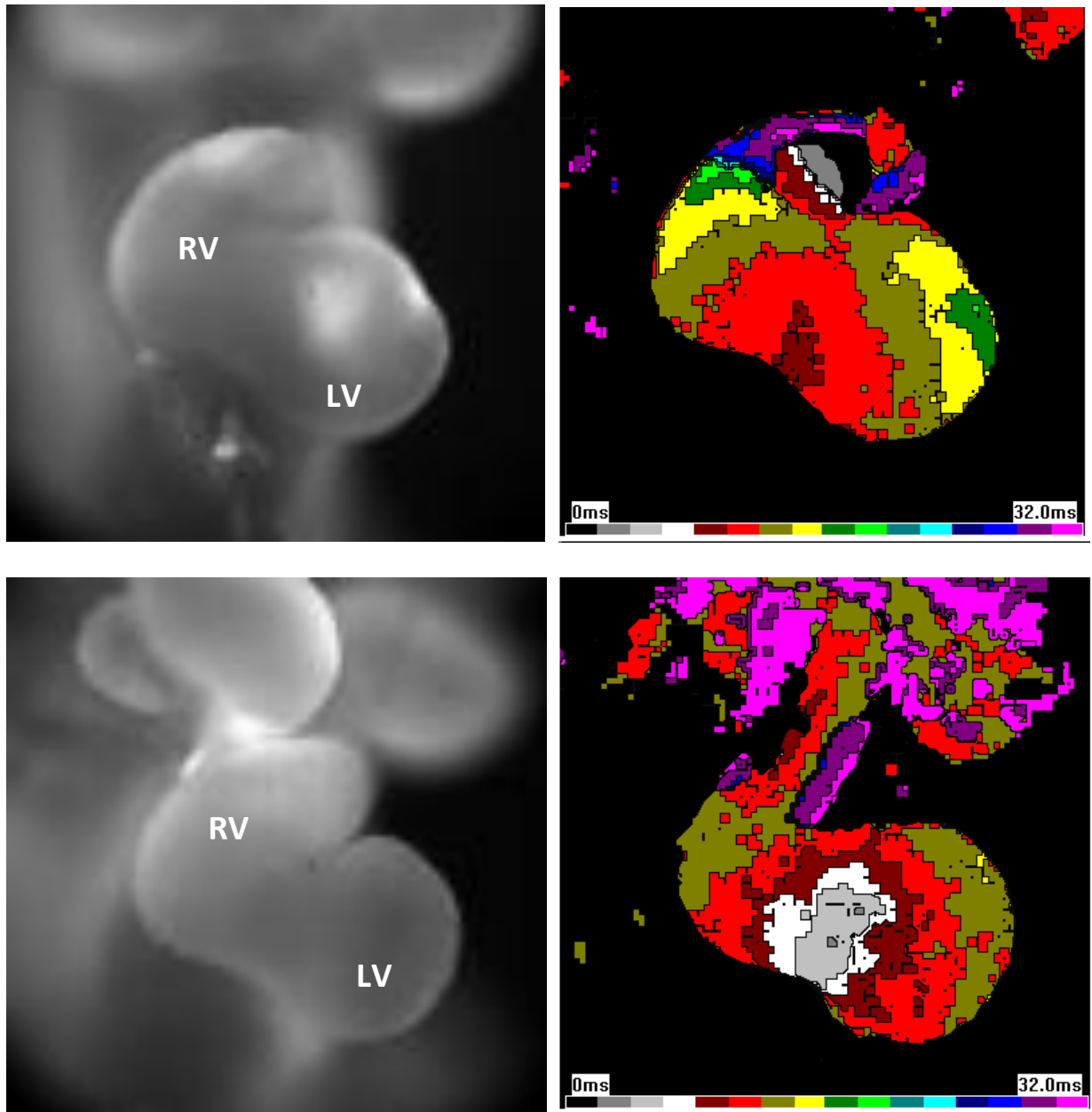
3.1.4. Mendelovská dedičnosť

V prípade génu *Nkx2.5* pri porovnaní pomeru homozygótov, heterozygótov a wild-type ide o úplnu dominanciu, pri ktorej ich pomer vychádzal približne na 1:2:1, ale fenotypový prejav je v štiepnom pomere 3:1. Je tak potvrdené, že tento gén sa nachádza vo forme jednej alely v každej chromozomálnej sade.

3.2. Optické mapovanie

Ektopická aktivácia embryonických srdcí začína typicky buď v interventrikulárnom prstenci, alebo z pravej apikálnej časti. (Vostarek, Sankova, & Sedmera, 2014) Meranie zmien Ca^{2+} v epikarde srdcí prebiehalo získavaním obrázkov farbených srdcí pomocou vysokorýchlostnej kamery a sledovaním zmien fluorescence napäťovo citlivej farby di-4-ANEPPS. V nasledujúcej časti tejto práce sú ukázané príklady získaných optických máp k daným genotypom.

3.2.1. Wild-type



Obrázok 9: Ľavý stĺpec predstavuje fotografie sŕdc myších embryí s fenotypom wild-type, pravý ich optické mapy už so spracovanými dátami. V oboch optických mapách predstavuje každá farebná vlna (izochrona) 2 ms, za ktoré prejde elektrický vzruch vzdialenosť šírky farebného pruhu. (RV – pravá komora, LV – ľavá komora)

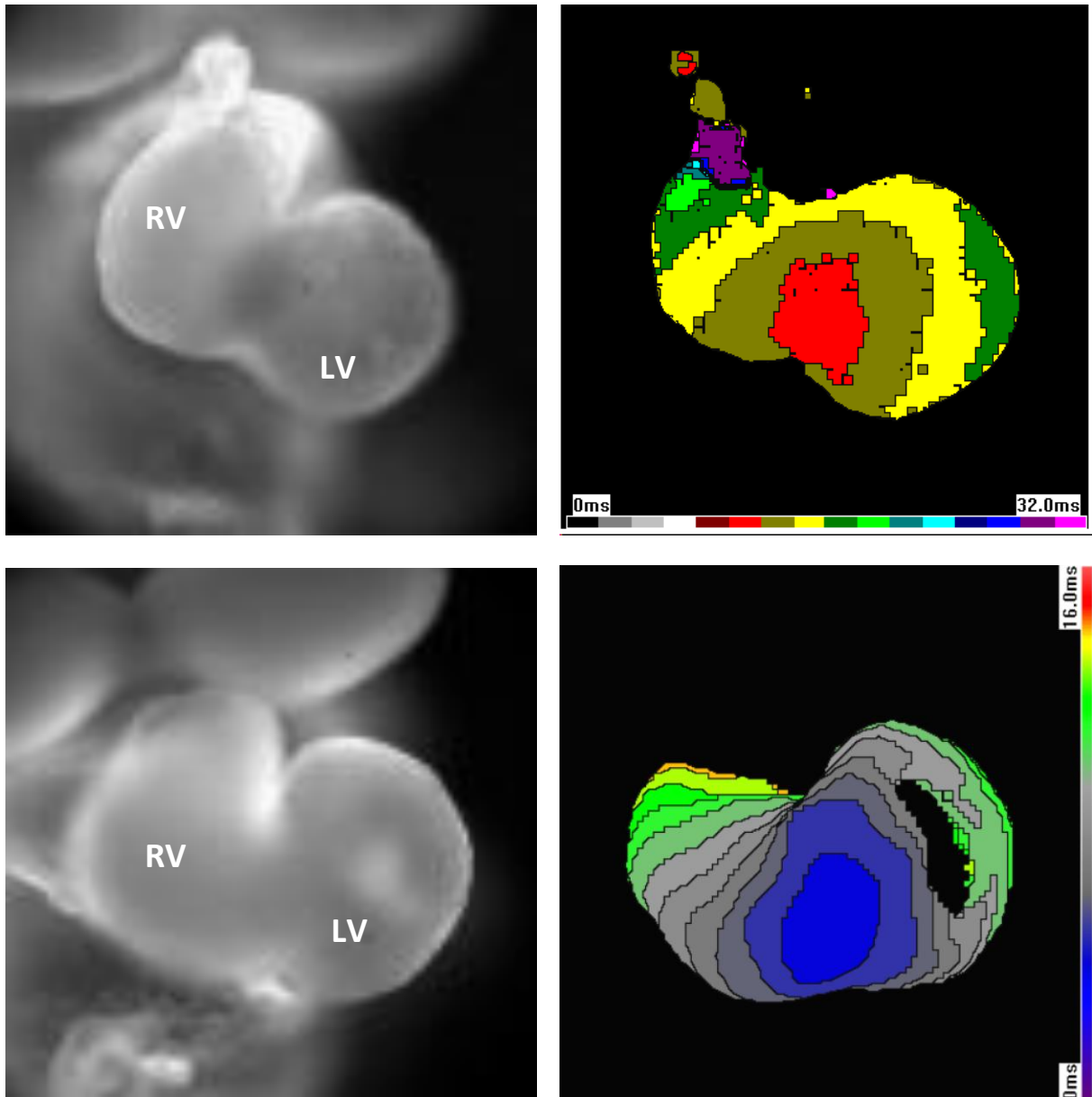
Na obrázku 9 je viditeľná ektopická aktivácia v interventrikulárnom uzle, ktorá prechádza cez komorové časti do oboch strán smerom k budúcim predsieňam. Trvanie prechodu elektrického vzruchu komorou zachytené optickým mapovaním odpovedá izochronám s trvaním približne 8-20 ms. Presun elektrického signálu prechádza z prstenca medzi budúcimi komorami do strán. Tam sa srdce zaoblúje, a keďže optické

mapovanie sleduje najlepšie zmeny vo fluorescencii v plochom, dvojdimenzionálnom zobrazení, okraje srdca na objektívne meranie rýchlosti neposkytuje dostatok relevantných dát. Napriek tomu je na optických mapách aj na videách, ktoré software BV_Analyzer vytvára, jasne vidieť postupné spomalenie signálu, čím je ďalej od pôvodného miesta aktivácie.

Porovnanie s inými skupinami, ktoré pracovali s optickým mapovaním v obdobných časových vývojových štádiách myší, poukazuje na normalizovanú formu prenosu elektrického signálu. Toto sa môže líšiť od merania tlkotu srdca neinvazívnymi metódami, hlavne kvôli náročnému spôsobu spracovania srdcí, ich vyťahnutím z podmienok *in vivo* do síce podobných, ale nie identických podmienok *ex vivo*. Napriek náročnosti zákroku pre tkanivá rozmedzie ich funkčnej elektrofyziológie ukazuje na dobrú metodiku, kedy sa napriek technike zákroku zachovávajú funkcie do merateľných a reprodukovateľných výsledkov.

Rozpätie rýchlostí šírenia elektrického vzruchu môže byť spôsobené rozdielom v mechanickej separácii hrudnej steny od srdca, rovnako ako poškodením vnútorného prevodového systému blebbistatínom alebo di-4-ANEPPS farbiacou látkou či ich rozpadovými produktmi. Dĺžka pobytu *ex vivo* srdcí bude taktiež rozhodujúcim faktorom, keďže srdcia, ktoré boli v poradí prvé na optické mapovanie, boli častejšie s fungujúcou pozorovateľnou kontrakciou srdca. Čím neskôr bolo srdce pripravené a nasnímané, tým sa znižovala šanca jeho normálnej funkcie.

3.2.2. Heterozygoti

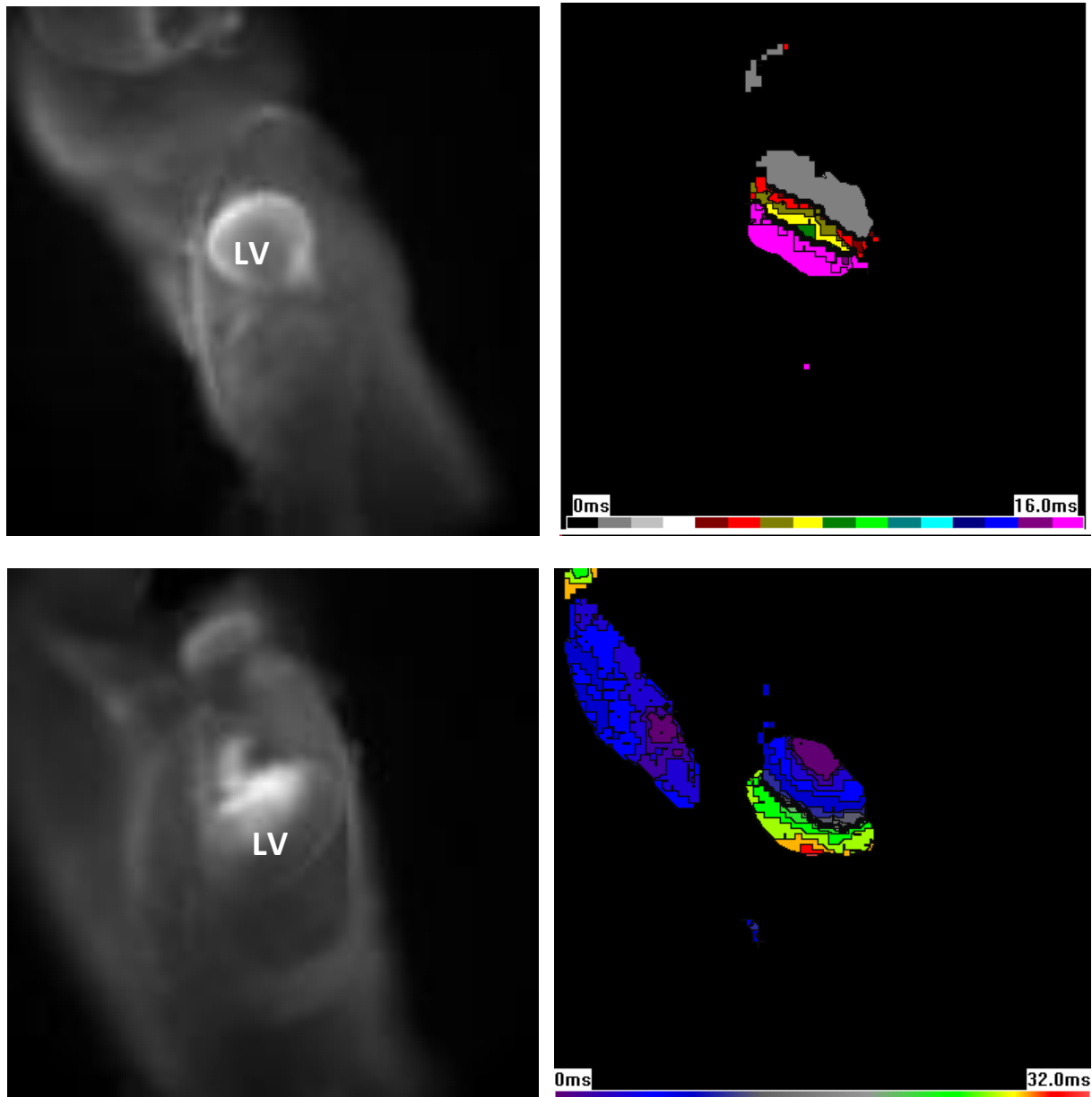


Obrázok 10: Ľavý stĺpec odpovedá fotografiam srdcí počas optického mapovania, pravý stĺpec sú spracované optické mapy. V hornej mape odpovedá jedna izochrona dĺžke úseku, ktorý prejde elektrický vzruch za 2 ms. V dolej mape jedna farebná izochrona odpovedá vzdialenosti prekonanej za 1 ms. (RV – pravá komora, LV – ľavá komora)

Optické mapy vytvorené z mikroskopovania heterozygotných mutantov ukazujú na rýchlosť šírenia v heterozygotných srdciach, ktoré sú morfológicky často nerozlíšiteľné od tých wild-type. Táto rýchlosť napriek morfológickým podobnostiam prebieha v takmer rovnakom rozpätí hodnôt, a to medzi 5-26 ms od začiatku vzruchu v interventrikulárnom prstenci po prechod do budúcich predsieňových častí.

Spôsob aktivácie, rýchlosť šírenia a smerovanie elektrického vzruchu je takmer identických s homozygotnými nemutovanými embryami. Vyskytli sa dve anomálie v porovnaní s normálnym spôsobom prevodového systému. Jedna bola aktivácia z budúcej ľavej komory, kde sa ďalej vzruch šíril do oboch strán až k apikálnym koncom jednoduchého srdca. Druhá anomália bola aktivácia prevodového systému s dvoch bodov. Prvý bol interventrikulárny prstenec, kde je aktivácia normálnym spôsobom začiatku elektrického vzruchu, druhý bod sa nachádzal v ľavej komore. Ďalšie šírenie prechádzalo normálnym spôsobom, a časť signálu sa stretne medzi interventrikulárnym prstencom a ľavou komorou.

3.2.3. Knock-out



Obrázok 11: Ľavý stĺpec sú fotografie srdcí počas optického mapovania a pravý spracované optické mapy. Jedna izochrona hornej mapy odpovedá úseku, ktorý prekoná elektrický vzruch za 1 ms. Izochrony dolnej mapy odpovedajú 2 ms. (LV – ľavá komora)

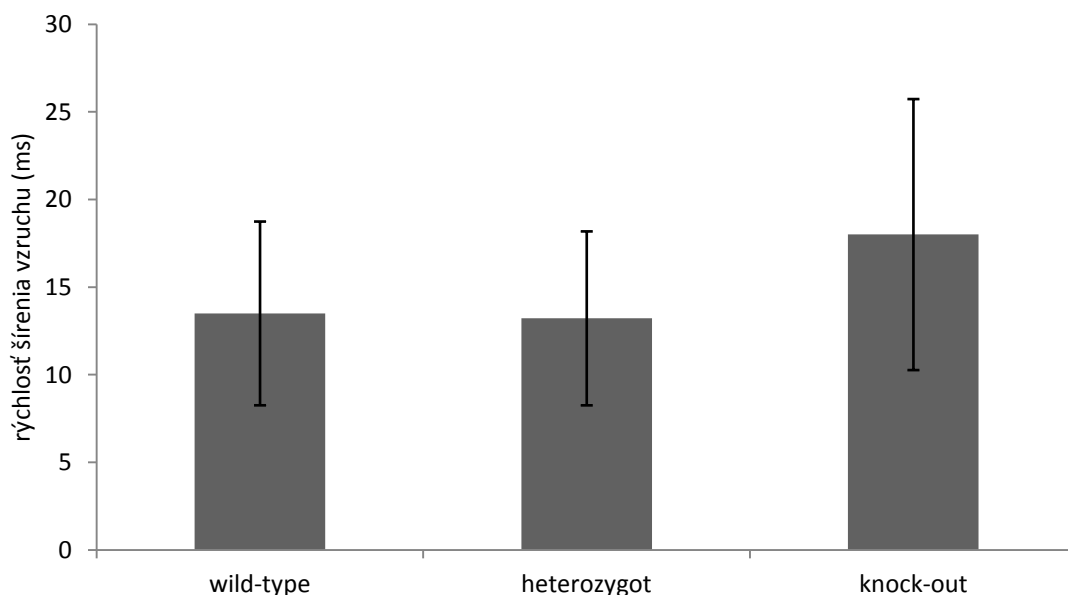
Morfológia knock-outového embryového srdca je dramaticky odlišná od morfológie wild-type a heterozygotov. Preto je porovnanie s normálnym šírením vzruchu náročné. Väčšina máp, ktoré v signály ukazovala istú formu periodicity vlnenia, po mnohých analýzach dopomohla oddeliť artefakty od skutočného elektrického vzruchu. Tento vzruch bol malý v porovnaní s prenosom vzruchu v normálnom srdci a často prehliadnuteľný, ale opakované púšťanie softwarom vygenerovaných videí jasne ukázalo na opakovanú formu elektrického impulzu v oblasti srdca.

Rýchlosť prechodu vzruchu bola medzi v rozmedzí 9 a 30 ms, čo znamená, že sa elektrický signál šíri srdcom pomalšie než v normálnom srdci. Keď zoberieme do úvahy veľkosť srdca, ktoré je niekoľkonásobne menšie než srdce s normálnou stavbou, ukáže nám to na niekoľkonásobné predĺženie doby, počas ktorej cez celé srdce prejde elektrický vzruch.

Tieto vlnenia majú dramatický iný priebeh a smer v porovnaní s normálnym srdcom. Kým normálne fungujúce srdcia začínajú s aktiváciou prevažne interventrikulárnym prstencom, v prípade homozygotných mutantov sa vzruch šíri z koncovej časti srdcovej trubice, ktorá odpovedá budúcej pravej predsieni.

Mutantné srdcia boli náročné na prípravu na optické mapovanie, veľa z nich pri disekcii vykazovalo kontraktilnú aktivitu ale po farbení optické mapy neniesli žiadne známky elektrickej aktivity, ani pri rôznych rýchlostiach snímania. Uprednostnenie GFP exprimujúcich srdcí pomohlo znížiť čas potrebný pre prípravu srdca, čo dramaticky zlepšilo množstvo homozygotne mutantných srdcí, ktoré mali aj po farbení ešte aktivitu. Ich citlivosť na prípravu aj samotnú manipuláciu zrejme súvisí s priblížením sa času úmrtia embryí s týmto fenotypom. (Jay, a iní, 2004)

3.3. Rýchlosť šírenia elektrického vzruchu



Obrázok 12: Na obrázku sú vynesené hodnoty rýchlosti šírenia elektrického vzruchu myokardom myšieho embryonálneho srdca v ms podľa genotypu jedincov.

Na obrázku 12 sú porovnané rýchlosti šírenia elektrického vzruchu v srdci embryí. Wild-type a heterozygotne mutantné srdcia vykazujú veľmi podobné dĺžky rýchlosti šírenia v pozorovateľných častiach srdcia, zvyčajne od interventrikulárneho prstenca po začiatky srdcovej trubice. Smerodatné odchyľky ukazujú na minimálne a maximálne rozpätie, ktoré sa pri množstve srdcí vyskytovalo.

Podobnosť heterozygotných srdcí v rýchlosti šírenia elektrického vzruchu jasne ukazuje, že napriek zmenšenému množstvu vlákien v Hisovom zväzku ako jasný fenotyp (Jay, a iní, 2004) v neskorších vývojových štádiách, rýchlosť vzruchu to v tomto štádiu žiadnym viditeľným spôsobom mapovaním povrchového šírenia vzruchu nie je zmenená. Jedno z možných vysvetlení je nedostatočné vyvinutie týchto a ďalších štruktúr, ktoré v budúcich vývojových štádiách usmerňujú a napomáhajú správne vedeniu impulzu v rámci prevodového systému srdca.

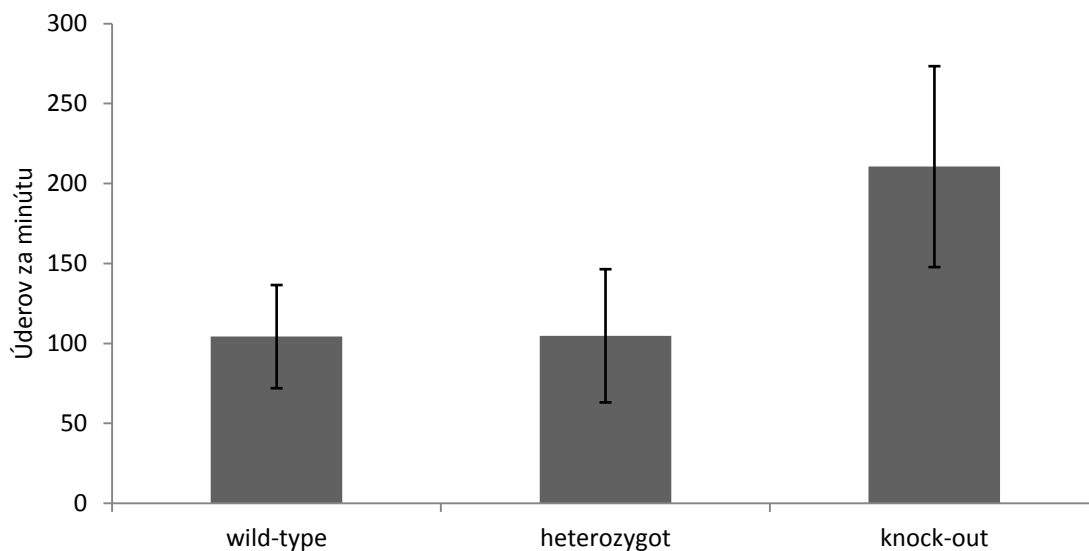
Rýchlosti šírenia vzruchu v knock-outových srdciach sa v tomto štádiu zväčšuje. Z toho vyplýva, že na prechod elektrického vzruchu menším srdcom je potrebné väčšie množstvo času, takže pomer medzi dĺžkou času a vzdialenosťou prechodu tohto vzruchu je priamo úmerný. Preto je na mieste predpokladať, že transkripčný faktor Nkx2.5 sa okrem homeoboxovej úlohy vývoj srdca ako takého podieľa tiež na správnom vývoji prvkov, ktoré súvisia s šírením elektrického vzruchu myokardiom ešte pred vytvorením podporných štruktúr prevodového systému srdca. Krátku dobu pred úmrtím, ešte pred vývojom týchto štruktúr v homozygotne mutovaných embryách kolabuje prevodová funkcia týchto srdcí. Úlohu v tom môže zohrávať aj absencia trabekulového systému, ktorý nemá len morfológickú a kontraktilne fyziologickú funkčnú úlohu sťahovania komôr pri pumpovaní krvi do krvného riečiska, ale aj elektrofyziologickú úlohu v napomáhaní vedenia elektrického vzruchu komorami, čo bolo predpokladané už v roku 1976 (Clerc, 1976) Preto sa v heterozygotných a knock-out srdciach cez komorové časti presúva vzruch väčšou rýchlosťou a spomaľuje keď sa dostáva na hranicu komôr s predsieňami. Takéto morfológické hranice sa u knock-outových srdcí nenachádzajú, a presun elektrického vzruchu je v týchto srdciach homogénnejšieho charakteru. Rýchlosť je pomalšia v porovnaní s normálnymi srdcami a vzruch prechádza rovnomerne celou viditeľnou plochou srdca.

Expresia určitých typov konexínov, ktoré sa s najväčšou pravdepodobnosťou podieľajú na vedení elektrického vzruchu myokardiom, je v mutantných srdciach

znížená. (Jay, et al., 2004; Dupays, et al., 2005) To môže byť ďalším dôvodom zníženej rýchlosti vzruchu v plne mutantných srdciach, a teda nedostatočne vyvinuté prevodové schopnosti samotných buniek skladajúcich vodivé tkanivo srdca.

Spoločne s chýbajúcou sieťou trabekúl sa týmito dvoma hypotetickými modelmi dá vysvetliť rovnomerné plynutie elektrického vzruchu aj jeho znížená rýchlosť. Presun vzruchu je rovnomerný vďaka nerozdelenej štruktúre srdcového tkaniva a spomalený vďaka zníženej expresie génov, ktoré sa podieľajú na správnej bunkovej stavbe, ktorá zabezpečuje správny prechod elektrického vzruchu, a ktorým Nkx2.5 slúži ako regulačný faktor.

3.4. Rýchlosť kontrakcií



Obrázok 13: Na obrázku sú v grafe vynesené hodnoty množstva úderov za minútu myších embryonálnych srdcí u jednotlivých genotypov.

Rovnako ako v prípade rýchlosti šírenia elektrického vzruchu srdcami, tak aj v prípade množstva kontrakcií srdca za časový úsek sa wild-type a heterozygotné srdcia podobali v rozpätí množstva úderov za minútu. Tieto hodnoty boli vypočítané pomocou snímkov získaných z optického mapovania, kde je srdce snímané po dobu 2 alebo 4 sekúnd. Za tento časový úsek je srdce aktivované do kontrakcie, a množstvo týchto potenciálnych kontrakcií sa započíta do rozmedzia páuz medzi nimi.

Rýchlosť tlkotu srdca u dospelých myší je v intervale medzi 450 až 750 bpm (www.merckvetmanual.com). Tento počet je na začiatku vývoja menší a postupne sa

každou ďalšou vývojovou fázou sa množstvo úderov za minútu zväčšuje. (Srinivasan, a iní, 1998) V prípade metodiky, ktorá bola pri všetkých pokusoch použitá, bola frekvencia tlkotu srdca v rozmedzí 72 až 147 dpm u wild-type srdcí a takmer v rovnakom rozmedzí v prípade mutantných heterozygotov. Tieto výsledky súhlasia s fenotypom a jeho morfológickým nálezom, kde sú v oboch typoch srdcí dostatočne vyvinuté trabekulové siete, prenos elektrického vzruchu v rámci tkanív je podobný až rovnaký v oboch prípadoch a okrem zmenšeného počtu buniek v AV uzle a Hisovom zväzku. (Jay, a iní, 2004) Je to potvrdenie dostatočnosti Nkx2.5 na regulačné funkcie tvorby morfológických a elektrofyziologických štruktúr. Neskoršie možné poruchy ako je AV blok sa teda napriek vrodenej prejavujú postnatálne, čo môže znamenať že potenciál vzniku poruchy je daný vnútornou vývojovou predizpozíciou, ktorá sa môže prejaviť len v niektorých prípadoch v závislosti na podmienkach prostredia.

Homozygotní mutanti mali omnoho vyššiu mieru tlkotu srdca, čo sa môže pripísať tomu, že sa embryá nachádzali v období kedy srdce kolabovalo. Trabekulová sieť sa podieľa aj na fyzickej pomoci pri pumpovaní srdca, preto je možné že bez nej srdce síce bilo viac, ale len kvôli snahe vypumpovať dostatočné množstvo krvi, čo sa s najväčšou pravdepodobnosťou nedeje. Tomu odpovedá aj letálnosť homozygotnej mutácie v tomto géne.

4. DISKUSIA

Cielené mutácie v géne *Nkx2.5* napomáhajú bližšiemu pochopeniu mechanizmov vývoja srdca a jeho elektrofyziologických funkcií. Rôzne formy mutácií majú rôzne prejavy a penetrancie. Skúmaniu bodových mutácií sa venuje veľa štúdií, hlavne ich následkov na heterozygotné a homozygotne mutantné potomstvo. (Reamon-Buettner & Borlak, 2010; Benson, et al., 1999; Liu, et al., 2009; Dinesh, et al., 2010; Peng, et al., 2010; Liu, et al., 2011; Ritchie, et al., 2012; Xie, et al., 2013; Yu, et al., 2014) Tieto výskumy sa orientujú na vrodené alebo postnatálne prejavujúce sa poruchy, pretože ich skúmanie sa zakladá na porovnávaní fenotypovo normálnych jedincov s tými s určitou poruchou. V týchto prípadoch sa skúma viac vplyv poškodenie genetickej informácie a jej translácie do proteínu transkripčného faktoru *Nkx2.5*, kým dávkovanie génu je sekundárne, a niekedy sa na neho vôbec nedáva dôraz.

Táto práca bola zameraná na dávkovanie génu *Nkx2.5* a jeho vplyv na elektrofyziologické defekty, ktoré sprevádzajú myši s touto mutáciou. Cieľom bolo sledovať, akým spôsobom sa šíri vzruch v komore bez tabekúl. Prvotným predpokladom bolo, že elektrický vzruch sa bude šíriť komorou primitívnymi spôsobom. Vzhľadom k tomu, že okrem narušenej tvorby trabekulového systému je porušený vývoj aj ďalších štruktúr, spomalenie šírenia vzruchu nebude jediným problémom. Taktiež je možné že sa tam nachádzajú aj ektopické pacemakery. Gén bol kompletne deaktivovaný jeho rozrušením vložením génom *GFP*, a jeho dávkovanie bolo skúmané na potomkoch z množenia heterozygotov. Toto závažné poškodenie celej siete regulácie vývoja srdca spôsobuje neschopnosť mutantných homozygotov správne sa vyvinúť a preto prenatálne umierajú už *in utero*. Toto dramaticky zhoršuje možnosť skúmania následkov dávkovania génu pri haploinsuficiencii. Kým heterozygoti prežívajú a v určitej forme sa u nich prejavujú poruchy v prevodovom systéme (Biben, a iní, 2000), predčasná smrť homozygotov zabraňuje dostatočnému preskúmaniu týchto porúch.

Hlavný morfológický fenotyp homozygotných mutantov, a to neprítomnosť trabekúl, je možné skúmať aj na iných modelových organizmoch. Medzi ďalšie spôsoby narušenia vývoja trabekulovej siete je napríklad narušenie signálnej dráhy neuregulínu, ktorý je pravdepodobne zodpovedný za prvotný presun kardiomyocytov do lumenu

srdca spoločne s tokom krvi (Peshkovsky, Totong, & Yelon, 2011) a poškodenie alebo odstránenie neuregulínových receptorov ErbB2 a ErbB4. (Zhao, a iní, 1997)

Najväčšou výzvou tejto práce bola práve technická náročnosť prípravy a udržiavania tkanív v živom stave. Snažil som sa o vystihnúť hraničné obdobie, približne v 9,5 d.p.c., kedy už srdcia homozygotných mutantov dosahujú obdobia tesne pred skolabovaním fyziologických funkcií. Vzhľadom k jednoznačným morfológickým defektom sa predpokladá, že je to hlavný dôvod smrti spôsobenej touto mutáciou. Možnosti techník optického mapovania a metodiky, ktorá dokáže udržať srdcové tkanivo pri živote dostatočne dlhý čas, aby sa dalo nasnímať príslušným spôsobom otvára možnosti skúmania, či nemôže strata *Nkx2.5* pôsobiť abnormality v prevodovom systéme srdca a tak negatívne ovplyvňovať správne elektrofyziologické funkcie srdca. To môže mať za následok zlyhanie srdca a smrť jedinca buď v kooperácii so disfunkciou spôsobenou morfológickými defektmi. Práve vďaka optickému mapovaniu je možné preskúmať ďalšiu možnosť, a to že srdcia mutantov prestávajú fungovať v závislosti na porušenej schopnosti prevodového systému.

Vo vývoji kostrových svaloch transkripčný faktor *Nkx2.5* nie je dôležitý. (Jamali, Rogerson, Wilton, & Skerjane, 2001) Namiesto toho je nevyhnutný pre správnu diferenciáciu srdcových buniek. V období myších embryí dva dni po období, ktoré bolo skúmané v tejto práci, sa stále ešte nachádza pomerne veľké množstvo myokardiálnych buniek, ktoré nie sú diferencované a exprimujú množstvo *Nkx2.5*. (Bartlett, Veenstra, & Weeks, 2010) Prevažná väčšina buniek exprimujúcich *Nkx2.5* v tomto štádiu *in vitro* sa diferencuje práve do srdcových buniek a buniek prevodného systému. (Wu, a iní, 2006) Tieto informácie korelovali s výsledkami tejto práce. Exprimácia GFP na miestach, kde sa malo nachádzať *Nkx2.5*, súhlasí s umiestnením kardiomyocytov alebo ich prekursorov. To poukazuje na správny výber konštruktov mutovaných alel pri štúdiu dávkovania tohto génu, keďže niektoré iné techniky konštrukcie mutantov nemusia byť dostatočne účinné a majú chybovosť v deaktivácii tohto génu. (Harvey, 1996) Tento spôsob konštrukcie mutantných alel by sa dal použiť aj na ďalšie gény potrebné pri kardiogenéze, ako sú ďalšie proteíny triedy NK2 (Kasahara, a iní, 2000), iné transkripčné faktory dôležité pre diferenciáciu myocytov do špecializovaných buniek prevodového systému (Moskowitz, a iní, 2007), faktory tvoriace komplexy s *Nkx2.5* ako sú proteíny rodiny GATA (Durocher & Nemer, 1998) a ďalšie kardiomyoblastové gény.

Pomocou vloženia rôznych fluorescenčných proteínov do rôznych týchto génov je možné ďalej skúmať ich umiestnenie a interakciu s Nkx2.5, čím je možné ďalej odhaliť regulačné siete, ktorých je tento proteín súčasťou. Ich komplexnosť sa totiž každým rokom ukazuje byť silnejšia, a je možné že ešte neboli odhalené všetky proteíny a gény, s ktorými tento gén interaguje. V prípade tejto práce sa tak GFP vloženie do tohto génu a jeho deaktivácia ukázala byť veľmi funkčná a raz ako je línia myší s touto mutáciou ustálená, poskytuje dlhodobu reprodukovateľnú fenotypy.

Spôsob disekcie použitý v tejto práci bol dostačujúci na získanie dostatočného množstva dát. Napriek tomu sú spôsoby ako sa v budúcnosti môže daný spôsob vylepšiť. Kým možnosť ľudskej chyby spôsobovalo pri mikromanipulácii v niektorých prípadoch poškodenie srdcí, hlavne u knock-outoch, použitie jemnejších nástrojov alebo mikromanipulačných nástrojov by mohlo viesť k zjemneniu práce o obmedzení poškodenia, ktoré sa v niektorých prípadoch vyskytlo. Jemnosť hrudnej steny u wild-type a heterozygótov, ktoré bolo v tesnej blízkosti samotného srdca, spôsobovalo komplikácie v jej roztváraní pre potreby prístupnosti myokardia farbivým látkam. V prípade knock-outov bolo perikardium od srdca oddelené tekutinou, čím bolo tiež na prvý pohľad rozpoznateľné homozygotne mutantné srdce od iných genotypov. Vďaka tomu bolo roztvorenie hrudnej steny s nižšou pravdepodobnosťou poškodenia srdca, čo v mnohých prípadoch dramaticky ovplyvnilo kvalitu získaných vzoriek. Prišpendlovanie tórz k silikónovému podkladu misky bolo vďaka použitiu tenkých špendlíkov dostatočne jemné.

Prekysličovanie Tyrodes roztoku v mikroskopovacej miske spolu s blebbistatínom pomohlo udržať dostatočné oxidatívne prostredie pre elektrofyziologické fungovanie srdca napriek rozpraženiu elektrického vzruchu od kontraktálnych funkcií myokardu. Vzhľadom ku cytotoxicite blebbistatínu je dôležité pokračovať v hľadaní rozprahovačov, ktoré by nemali silu bunkovej odpovede a množstvo Ca^{2+} alebo mali menšie cytotoxické efekty. V porovnaní s v minulosti používanými rozprahovačmi ako diltiazem (Nakajima, Hoshiyama, Yamashita, & Kiyomoto, 1975), 2,3-butanedion monoxime (BDM) (Gwathmey, Hajjar, & Solaro, 1991) alebo cytochalasin D má používanie blebbistatínu výhodu v nižšom efekte na možnosť odpovede a prístupnosti vápenatých iontov v myokarde. Napriek tomu cytotoxicita tejto látky a jej rozpadových produktov znižuje objektivitu v pozorovaní optickým

mapovaním, a preto je ďalší výskum zameraný na hľadanie rozprahačov s čo najnižším množstvom vedľajších efektov zvýši efektivitu a objektivnosť zbierania dát.

Jednoznačný fenotyp homozygotných mutantov vyvstávajúci v raných vývojových štádiách (Takeda, a iní, 2009) spôsobuje náročnú úlohu v hľadaní možnosti nápravy u mutantných jedincov, či už ide o modelové organizmy alebo ľudí, ktorí sa rodia s poruchami srdcovej činnosti na základe tejto mutácie. Záchranné techniky, ktoré by bolo možné použiť v prípadoch homozygotných mutantov v čase, kedy sa aktivácia génu *Nkx2.5* začína zapájať do vývoja srdca, by museli byť aktivované v raných prenatálnych štádiách. V prípade homozygotných mutantov by záchrana aspoň jednej mutovanej alely viedla k prežitiu jedinca, ale s vedľajšími poruchami sprevádzajúcimi haploinsuficienciu ako sú bloky AV uzla, poruchy priehradky medzi predsieňami a komorami alebo Fallotovu tetralógiu (Jay, et al., 2004; Reamon-Buettner & Borlak, 2010) V prípade haploinsuficie by bolo vhodné zvážiť možnosť utlmenia expresie poškodeného proteínu a zvýšenie až nadexpresiu proteínu *Nkx2.5* v tkanivách vyžadujúcich tento transkripčný faktor pre dostatočný vývoj a vytvorenie správnych funkcií. Štúdie sledujúce nadexpresiu *Nkx2.5* v hypertrofovaných srdciach ukazuje na zvýšenú aktiváciu ďalších génov spojených v regulačnej sieti spolu s *Nkx2.5*. (Wakimoto, et al., 2003; Akazawa & Komuro, 2003) Umelá nadexpresia tohto proteínu v heterozygotných mutantoch by však nemusela vyústiť v nadexpresiu ďalších génov, ak by bolo množstvo exprimovaného *Nkx2.5* v normálnych hodnotách v porovnaní s wild-type fenotypom. (George, Colombo, & Targoff) Množstvo exprimovaného proteínu je možné zmerať a presne tak určiť vplyv dávkovania *Nkx2.5* na ďalšie proteíny a fenotypy súvisiace s rôznymi typmi genotypov. Je to ďalší možný smer hľadania príčin a spôsobu nápravy porúch spôsobených poruchami v dávkovaní tohto génu.

Vývoj SA uzla, ktorý slúži ako hlavný srdcový pacemaker, sa začína už v skorých vývojových štádiách srdca. Terapia nadexpresiou tohto génu by mohla negatívne ovplyvniť práva formovanie tejto štruktúry, keďže je to práve represia *Nkx2.5* ktorá dopomáha správne formovaniu SA uzla. (Kasahara, Barunkova, Schinke, Tanaka, & Izumo, 1998) Terapeutické narušenie represorov alebo enhancerov tohto génu by mohlo narušiť jemnú regulačnú štruktúru aktivácie a represie, ktorá sa podieľa na ovplyvňovaní vývoja viacerých štruktúr v srdci.

Prejasňovanie roztokom *Scale* podľa (Hama, a iní, 2011) bola jedna z najprínosnejších techník použitých v práci. Tento roztok a jeho prejasňovacie schopnosti dopomohli k zisteniu dvoch informácií pomocou jednej techniky. Prvou bolo genotypové určenie srdca na základe porovnania expresie GFP v embryách s rôznym dávkovaním génu *Nkx2.5* vďaka expresii v rôznych štruktúrach, druhou bolo jednoznačné potvrdenie neprítomnosti trabekulovej siete ako fenotyp mutantných homozygotov. Tento spôsob spoločného použitia konfokálnej mikroskopie a jednoduchého a veľmi účinného prejasňovania môže dopomôcť k detailnému anatomickému skúmaniu v súčasnosti možno ešte neurčitých abnormalít v srdci aj iných tkanivách v modelových organizmoch s poruchami v expresii *Nkx2.5*.

Jedna opakovane sa objavujúca sa anomália bola priehlbina vo vznikajúcej ľavej komore. Táto priehlbina bola viditeľná ako na fotografiách pod mikroskopom, tak aj na optických mapách. V kontexte prenosu elektrického vzruchu srdcom nevykazovala táto priehlbeň žiadnu aktivitu. Pôvodne som predpokladal mechanickú deformáciu srdca počas manipulácie s embryom v rámci prípravy na mikroskopovanie, ale táto anomália sa objavovala často už od začiatku pokusov. Tento úkaz som našiel aj v prípade malého množstva wild-type embryí, ale v omnoho menšej miere. Aj pripustenie ľudskej chyby poškodenia srdcí počas prípravy by nevysvetľovalo veľký nepomer tejto deformácie medzi heterozygotmi a nemutantnými homozygotmi. Je ťažko určiteľné, či neprítomnosť dát z tejto oblasti v optickom mapovaní je spôsobené umiestnením priehlbne, ktorá sa vďaka svojmu konvexnému tvaru dostala pod plošnú úroveň najjasnejšieho snímania optickej mapy. Avšak ani pri zvýšení threshold hodnôt, ktoré vďaka softwaru zvýraznia aj nezaostrené a jemné zmeny vo fluorescencii tkanív, neodhalili aktivitu v tejto oblasti. To podporuje hypotézu morfolologickej deformácie, ktorá má odpovedajúcu elektrofyziologickú poruchu. Rezy na konfokálnom mikroskope neposkytli indíciu, čo môže stáť za touto deformáciou. V prípade, že bude ktorákoľvek z týchto možností pravdivá, poukazuje to na ďalší výrazný rozdiel u haploinsuficientných jedincov. To môže naznačovať ďalší dôvod, ktorý spôsobuje poruchy prevodového systému u takto postihnutých jedincov a zaslúži si ďalšie skúmanie.

V ľudskej populácii sa už mutácia v jednom nukleotide v dôležitej regulačnej alebo štruktúrnej časti *Nkx2.5* môže prejaviť závažnou poruchou v prevodovom systéme v priebehu života. (Schott, et al., 1998; Balci & Akdemir, 2011; Belvis, et al., 2009; Liu,

et al., 2009) V rámci vrodených porúch sa somatické mutácie v géne *Nkx2.5* podieľajú taktiež podieľajú na ich vytváraní, avšak štúdia sledujúca tieto mutácie bola robená na srdciach, ktoré boli často viac než 20 rokov naložené vo formaldehydovej fixácii. Sami autori priznávajú možnosť poškodenia DNA formaldehydom a teda zníženú dôveryhodnosť ich nálezov, avšak väčšina týchto somatických mutácií bola odhalená v štruktúrach, ktoré boli deformované. V nepoškodených tkanivách tieto mutácie nájdené neboli, čo na druhú stranu poukazuje na skutočný vplyv somatických funkcií na srdcové poruchy. (Draus Jr., et al., 2008; Reamon-Buettner & Borlak, 2004)

Jednonukleotidové mutácie, či už somatické alebo gametické, sa v mnohých výskumoch objavujú v genetických štúdiách ľudí s vrodenými poruchami srdca. Vo väčšine z nich sa pri screeningu a hľadaní poškodenej genetickej informácie génu *Nkx2.5* našlo menšie percento jedincov, ktorí skutočne túto mutáciu mali. (Liu, et al., 2009; Liu, et al., 2009; Dinesh, et al., 2010; Peng, et al., 2010) Pre veľa porúch, ako je napríklad Fallotova tetralógia, ASD alebo syndróm náhleho srdcového úmrtia (Perera, Johnson, Judge, & Crosson, 2014) neexistujú sú samostatné gény. Rovnako členovia rodiny dediaci rovnaký defekt v géne môžu vykazovať rôzne fenotypy, ktoré nemusia byť presne definovateľné klinickými ohraničeniami. Je to práve fenomén heterogenity, zníženej penetrancie a variabilnej expresivity, na ktorý sa musí brať v prípade ľudských srdcových porúch, či už dedičných alebo nie, dostatočný zreteľ. Napriek tomu je možné, že samostatná mutácia v *Nkx2.5* nemusí byť dostatočná na spôsobenie prejavu celej choroby. (Benson & Martin, 2010)

S veľkou pravdepodobnosťou súvisia rôzne typy mutácií, či už jednonukleotidové zmeny, delécie alebo inzercie, s demografiou. Veľa štúdií sa orientuje na skúmanie mutácií v *Nkx2.5* u určitej populácie ľudí alebo u danej národnosti, prípadne u uzatvorených populácií v rôznych oblastiach daného štátu. Je niekoľko štúdií orientujúcich sa na Čínsku populáciu (Zhang, et al., 2009; Ding, et al., 2009; Liu, et al., 2009; Peng, et al., 2010; Wang, et al., 2011; Wang, et al., 2013; Liu, et al., 2015; Feng, et al., 2015), obyvateľov Indie (Dinesh, a iní, 2010), Talianska (Beffagna, a iní, 2013), Mexika (Alcantara-Origoza, et al., 2015; Aguayo-Gomez, et al., 2015), Turecka (Akcaboy, a iní, 2008) a Tuniska (Nouira, a iní, 2008). Napriek tomu v súčasnosti nie sú k dispozícii žiadne štúdie, ktoré by sa zameriavali hlavne na rozdiel alebo opakované objavovanie sa mutácií, ktoré by jednoznačne súviseli s prostredím alebo s krajinou, v ktorej sa pacienti

s vrodenými srdcovými poruchami žili. Hľadanie podobnosti mutácii v rôznych populáciách myší odhalilo rozdielnosť súvisiacu práve s určitou líniou (Rosenthal & Harvey, 1999), a napriek možným rozdielom vo fenotypoch medzi týmto modelovým organizmom a človekom by súvislosti s demografiou mohli dopomôcť špecifikovať riziká a nájsť terapiou aplikovateľnú pre špecifické populácie ľudí.

Vedeckou a klinickou výzvou v prípade kardiovaskulárnej regeneratívnej medicíny je vytvorenie nových terapeutických stratégií ktoré podporia obnovu a opravu srdcového svalu. Častejšie používanie kmeňových buniek a regeneratívnej biológie je smerovanie do budúcnosti, kde je inžinierstvo srdcového svalu a používanie buniek schopných diferencovania do myokardiocytov vhodným smerovaním ďalšieho výskumu. Úspech tohto typu regeneratívnej medicíny spočíva v určení vhodného bunkového typu, ktorý by bol použiteľný na opravu srdca. V tomto prípade je použitie autológnych srdcových kmeňových buniek, získaných z diferencovaného dospelého srdcového svalu, neinvazívnym spôsobom terapie. Využitie embryonálnych buniek nájdených pomocou určenia kardiovaskulárnych progenitorov ukazuje na možný vhodný smer potenciálnej terapie. (Yi, Wernet, & Chien, 2010) Používanie správnych reportérových systémov pre zisťovanie expresie srdcových progenitorov môže dopomôcť k rýchlemu vývoju techník na vyhľadávanie správneho typu buniek vhodných pre regeneratívnu terapiu. (Hsiao, a iní, 2008) Nevýhodami použitia ľudských kmeňových buniek je nízka efektivita kardiomyogenickej diferenciácie, nízka úroveň prežitia po transplantácii, tendencia tvorby teratómov a imunologické odmietnutie transplantátu. (Segers & Lee, 2008) Práve aj použitím metodiky opísanej v tejto práci by bolo možné sledovať prijatie a smerovanie transplantovaných buniek do žiadaných častí srdca, či už do funkčných častí prevodového systému ako SA alebo AV uzol alebo na vytvorenie funkčných štruktúr podporujúcich správne fungovanie elektrofyziológie srdca. V týchto prípadoch sa problémy spojené s dávkovaním génu *Nkx2.5* nedostávajú na vrchol zoznamu priorít, ktoré treba vyriešiť, keďže by sa bolo možné práve týmto spôsobom vyhnúť potrebou úpravy genetickej úpravy alebo regulácie tohto génu, alebo zmeny jeho expresie.

Genetická modifikácia ľudských embryí je v súčasnosti veľmi diskutovanou témou. Etické otázky vyvstávajúce z využívania kmeňových buniek získaných z embryí sa stretávajú so silne negatívnou odozvou, preto zmena základného bloku ľudského biologického života môže viesť k ešte dramatickejšej spätnej väzbe nie len zo strany

etických komisií, ale aj od širokej verejnosti. Preto pred začatím genetickej terapie samotnou modifikáciou ešte v ranom embryonálnom štádiu je dôležité naplno objasniť všetky prvky komplexnej regulačnej siete, ktorej je *Nkx2.5* súčasťou. Až po získaní čo najväčšieho pochopenia účasti tohto transkripčného faktoru vo vývoji nie len srdca, ale aj ostatných orgánov a tkanív, bude možné začať skúmať možnosti modifikácie schopné dopomôcť riešiť problémy vyvstávajúce z mutácií v tomto géne alebo v rôznych spôsobov jeho dávkovania. Napriek tomu by bola možnosť genetickej modifikácie embryí, ktoré vykazujú široké rozpätie poškodenia proteínového produktu tohto génu, vhodným a trvalým riešením problémom, ktoré vyvstávajú v budúcnosti v prípade niektorých typov mutácií. Na to je však potrebné vyvinúť presnejšie metódy editovania ľudského genómu, keďže ani súčasné moderné techniky takýchto zmien vykazujú veľké nedostatky a nízku výnosnosť. (Liang, a iní, 2015)

Ukázanie na problémy súvisiace s dávkovaním *Nkx2.5* vďaka tejto práci poukazujú na potrebu ďalšieho skúmania dôvodov srdcového zlyhania u týchto mutantov. Metodická príprava vzoriek v štádiu, kedy funkcie srdca myšieho embrya prichádzajú ku kolapsu, je technicky náročná a je potreba veľkého množstva vzoriek, z ktorých je len menšia časť dostatočne aktívna aby vyniesla výsledky vhodné k objektívnemu použitiu do štatistického spracovania. Vďaka tomuto obdobiu skúmania je však možné nájsť abnormality v elektrofyziológii aj kontraktálnych či morfológických vlastnostiach srdca, ktoré sa u mutantných homozygotov postnatálne skúmať nedajú, keďže sa jedná o letálnu mutáciu v takomto dávkovaní. Vďaka dátam získaných z knock-outových optických máp je možné nájsť koreláciu medzi heterozygotným fenotypom a homozygotne mutantným, ku ktorému by sa porovnávaním heterozygotov a wild-type modelov nebolo možné dopracovať.

5. ZÁVER

Táto práca, zameraná na fenotypový prejav rôzneho dávkovania génu *Nkx2.5* na elektrofyzikálne vlastnosti embryonálneho myšieho srdca, bola založená na technicky náročnom spôsobe skúmania prenosu elektrického impulzu na živých srdciach. Optické mapovanie slúžilo ako hlavná technika získavania optických máp, ktoré jasne ukazujú rýchlosť, smer a vzdialenosť, ktorú prejde elektrický vzruch. Vďaka tomu bolo možné určiť základné elektrofyzikálne vlastnosti mutantných myších srdcí v ranom embryonálnom vývoji štádiu.

Veľa prác tohto typu sa nedá dohľadať, keďže náročnosť techniky a nízka výťažnosť dát pomocou tejto metódy odrádza veľa vedeckých pracovníkov. Napriek tomu je dôležité zamerať sa v hľadaní príčin vrodených srdcových porúch u ľudí aj týmto smerom, pretože skúmaním srdcí tesne pred ich kolapsom a následným úmrtím jedinca v tejto práci pomohlo odhaliť poruchy vo vedení elektrického impulzu. To môže dopomôcť hlbšiemu pochopeniu vzniku srdcových porúch, ktoré majú buď celoživotné prejavy, alebo sa prejavujú až v určitom veku. Keďže tieto poruchy môžu byť pre ľudí smrteľné, je dôležité zamerať sa na hľadanie príčin ich vzniku, pochopenie dráh, ktoré za ich vznikom stoja a následne skúmanie terapeutických možností ich nápravy alebo zmiernenia ich príznakov.

Smerovanie ďalšieho výskumu by malo byť sústredené na čo najdetailnejšie pochopenie komplexných regulačných dráh, ktoré stoja za morfológickým a fyziologickým vývojom srdca na modelových organizmoch blízkych človeku a aj na ľudských príkladoch. Táto metóda má potenciál objavenia ďalších anomálií vo fyziológii srdca a je možné že práve skúmanie homozygotného genotypu tohto génu a jeho fenotypu, napriek jeho letálnosti, ukazuje na skutočnú silu a prejavy poškodenia tohto génu a transkripčného faktora ktorý kóduje. Až silné pochopenie vzniku porúch a jasné popísanie fenotypových prejavov môže bádanie posunúť smerom k zisťovaniu možností ich nápravy u ľudských pacientov.

6. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Aguayo-Gomez, A., Arteaga-Vazquez, J., Svyryd, Y., Calderon-Colmenero, J., Zamora-Gonzales, C., Vargas-Alarcon, G., & Mutchinick, O. M. (2015). Identification of Copy Number Variations in Isolated Tetralogy of Fallot. *Pediatric Cardiology*.
- Akazawa, H., & Komuro, I. (2003). Roles of Cardiac Transcription Factors in Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*.
- Akazawa, H., & Komuro, I. (2005). Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, s. 252-268.
- Akcaboy, M. I., Cengiz, F. B., Inceoglu, B., Ucar, T., Atalay, S., Tutar, E., & Tekin, M. (2008). The effect of p.Arg25Cys alteration in NKX2-5 on conotruncal heart anomalies: mutation or polymorphism? . *Pediatric Cardiology*.
- Alcantara-Origoza, M. A., De Rubens-Figueroa, J., Reyna-Fabian, M. E., Estandia-Ortega, B., Gonzalez-del Angel, A., Molina-Alvarez, B., . . . Garcia-Diaz, L. (2015). Germline mutations in NKX2-5, GATA4, and CRELD1 are rare in a Mexican sample of Down syndrome patients with endocardial cushion and septal heart defects. *Pediatric Cardiology*.
- Balci, M. M., & Akdemir, R. (2011). NKX2.5 mutations and congenital heart disease: Is it a marker of cardiac anomalies? *International Journal of Cardiology*.
- Bartlett, H., Veenstra, G. J., & Weeks, D. L. (2010). Examining the Cardiac NK-2 Genes in Early Heart Development. *Pediatric Cardiology*.
- Beffagna, G., Cecchetto, A., Dal Bianco, L., Lorenzon, A., Angelini, A., Padalino, M., . . . Deliento, L. (2013). R25C mutation in the NKX2.5 gene in Italian patients affected with nonsyndromic and syndromic congenital heart disease. *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md.)*.
- Belvis, R., Tizzano, E. F., Marti-Fabregas, J., Leta, R. G., Baena, M., Carreras, F., . . . Marti-Vilalta, J. L. (2009). Mutations in the NKX2-5 gene in patients with stroke and patent foramen ovale. *Clinical Neurology and Neurosurgery*.
- Benes Jr., J., Ammirabile, G., Sankova, B., Campione, M., Krejci, E., Kvasilova, A., & Sedmera, D. (2014). The role of connexin40 in developing atrial conduction. *FEBS Letters*.
- Benson, W. D., & Martin, L. J. (2010). Complex Story of the Genetic Origins of Pediatric Heart Disease. *Circulation*.
- Benson, W. D., Sharkey, A., Fatkin, D., Lang, P., Basson, C. T., McDonough, B., . . . Seidman, C. E. (1998). Reduced Penetrance, Variable Expressivity, and Genetic Heterogeneity of Familial Atrial Septal Defects. *Circulation*.
- Benson, W., Silberbach, M., Kavanaugh-McHugh, A., Cottrill, C., Zhang, Y., Riggs, S., . . . Kugler, J. D. (1999). Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *The Journal of Clinical Investigation*.

- Biben, C., & Harvey, R. P. (1997). Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes & Development*.
- Biben, C., Weber, R., Kesteven, S., Stanley, E., McDonald, L., Elliott, D. A., . . . Harvey, R. P. (2000). Cardiac Septal and Valvular Dymorphogenesis in Mice Heterozygous for Mutations in the Homeobox Gene Nkx2-5. *Circulation Research*.
- Bruneau, B. G. (2002). Transcriptional Regulation of Vertebrate Cardiac Morphogenesis. *Circulation Research*.
- Bruneau, B. G., Nemer, G., Schmitt, J. P., Charron, F., Robitaille, L., Caron, S., . . . Seidman, J. G. (2001). A Murine Model of Holt-Oram Syndrome Defines Roles of the T-Box Transcription Factor Tbx5 in Cardiogenesis and Disease. *Cell*.
- Clark, C. D., Zhang, B., Lee, B., Evans, S. I., Lassar, A. B., & Lee, K.-H. (2013). Evolutionary Conservation of Nkx2.5 Autoregulation in the Second Heart Field. *Developmental Biology*.
- Clerc, L. (1976). Directional Differences of Impulse Spread in Trabecular Muscle from Mammalian Heart. *The Journal of Physiology*.
- Costa, M. W., Lee, S., Furtado, M. B., Xin, L., Sparrow, D. B., Martinez, C. G., . . . Harvey, R. P. (2011). Complex SUMO-1 Regulation of Cardiac Transcription Factor Nkx2-5. *PLoS ONE*.
- Crick, S. J., Sheppard, M. N., Ho, S. Y., Gebstein, L., & Anderson, R. H. (1998). Anatomy of the pig heart: comparisons with normal human cardiac structure. *Journal of Anatomy*.
- Dinesh, S. M., Kusuma, L., Smitha, R., Savitha, M. R., Krishnamurthy, B., Narayanappa, D., & Ramachandra, N. B. (2010). Single-nucleotide polymorphisms of NKX2.5 found in congenital heart disease patients of Mysore, South India. *Genetic testing and molecular biomarkers*.
- Ding, J. D., Li, K. R., Zhang, X. L., Yao, Y. Y., Reng, L. Q., Tao, S. Y., . . . Ma, G. S. (2009). Preliminary exploration of transcription factor Nkx2.5 mutations and congenital heart diseases. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*.
- Dou, Y., Arlock, P., & Arner, A. (2006). Blebbistatin specifically inhibits actin-myosin interaction in mouse cardiac muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*.
- Draus Jr., J. M., Hauck, M. A., Goetsch, M., Austin III, E. H., Tomita-Mitchell, A., & Mitchell, M. E. (2008). Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics*.
- Dupays, L., Jerry-Guichard, T., Mazurais, D., Calmels, T., Izumo, S., Gros, D., & Theveniau-Ruissy, M. (2005). Dysregulation of connexins and inactivation of NFATc1 in the cardiovascular system of Nkx2-5 null mutants. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*.
- Durocher, D., & Nemer, M. (1998). Combinatorial Interactions Regulating Cardiac Transcription. *Developmental Genetics*.
- Durocher, D., Charron, F., Warren, R., Schwartz, R. J., & Nemer, M. (1997). The cardiac transcription factors Nkx2-5 and GATA-4 are mutual cofactors. *The EMBO Journal*.

- Elliot, D. A., Solloway, M. J., Wise, N., Biben, C., Costa, M. W., Furtado, M. B., . . . Harvey, R. P. (2006). A tyrosine-rich domain within homeodomain transcription factor Nkx2-5 is an essential element in the early cardiac transcriptional regulatory machinery. *Development*.
- Espinoza-Lewis, R. A., Yu, L., He, F., Liu, H., Tang, R., Shi, J., . . . Chen, Y. (2009). Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Developmental Biology*.
- Feng, Z., Lian, P., Li, Q., Nie, Y., & Zhang, Y. (2015). Association between NKX2-5 rs29784 and infantile hypertrophic pyloric stenosis in Chinese Han population. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*.
- Ferdous, A., Caprioli, A., Iacovino, M., Martin, C. M., Morris, J., Richardson, J. A., . . . Garry, D. J. (2009). Nkx2-5 transactivates the Ets-related protein 71 gene and specifies an endothelial/endocardial gate in the developing embryo. *PNAS*.
- Fujii, S., Hirota, A., & Kamino, K. (1980). Optical recording of development of electrical activity in embryonic chick heart during early phases of cardiogenesis. *The Journal of Physiology*.
- Gazit, A. Z., Li, A., Choi, J. S., Miquerol, L., & Jay, P. Y. (2014). Ex vivo, microelectrode analysis of conduction through the AV node of wild-type and Nkx2-5 mutant mouse hearts as guided by a Cx40-eGFP transgenic reporter. *Physiological Reports*.
- Genis, C., Scone, P., Kasahara, H., & Nam, H.-J. (2008). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the NKX2.5 homeodomain in complex with DNA. *Structural Biology and Crystallization Communications*.
- George, V., Colombo, S., & Targoff, K. L. (dátum neznámy). An early requirement for nkx2.5 ensures the first and second heart field ventricular identity and cardiac function into adulthood. *Developmental Biology 2015*.
- Gioli-Pereira, L., Pereira, A. C., Mesquita, S. M., Xavier-Neto, J., Lopes, A. A., & Krieger, J. E. (2010). NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *International Journal of Cardiology*.
- Gittenberger-de Groot, A. C., Mahtar, E. A., Hahurij, N. D., Wisse, L. J., Deruiter, M. C., Wijffels, M. C., & Poelmann, R. E. (2007). Nkx2.5-Negative Myocardium of the Posterior Heart Field and Its Correlation With Podoplanin Expression in Cells From the Developing Cardiac Pacemaking and Conduction System. *The Anatomical Record*.
- Gutierrez-Roelens, I., De Roy, L., Ovaert, C., Sluysmans, T., Devriendt, K., Brunner, H. G., & Viskula, M. (2006). A novel CSX/NKX2-5 mutation causes autosomal dominant AV block: are atrial fibrillation and syncopes part of the phenotype? *European Journal of Human Genetics*.
- Gwathmey, J. K., Hajjar, R. J., & Solaro, R. J. (1991). Contractile Deactivation and Uncoupling of Crossbridges. *Circulation Research*.
- Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., . . . Miyawaki, A. (2011). Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature*.

- Harvey, R. P. (1996). NK-2 Homeobox Genes and Heart Development. *Developmental Biology*.
- Hassner, A., Birnbaum, D., & Loew, L. M. (1983). Charge-Shift Probes of Membrane Potential. Synthesis. *The Journal of Organic Chemistry*.
- Hsiao, E. C., Yoshinaga, Y., Nguyen, T. D., Musone, S. L., Kim, J. E., Swinton, P., . . . Conklin, B. R. (2008). Marking Embryonic Stem Cells with a 2A Self-Cleaving Peptide: A NKX2-5 Emerald GFP BAC Reporter. *PLoS ONE*.
- Chen, C. Y., & Schwartz, R. J. (1995). Identification of Novel DNA Binding Targets and Regulatory Domains of a Murine Tinman Homeodomain Factor, nkx-2.5. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Chen, C. Y., Croissant, J., Majesky, M., Topouzis, S., McQuinn, T., Frankovsky, M. J., & Schwartz, R. J. (1996). Activation of the cardiac alpha-actin promoter depends upon serum response factor, Tinman homologue, Nkx-2.5, and intact serum response elements. *Developmental Genetics*.
- Chi, X., Chatterjee, P. K., III, W. W., Zhang, S.-X., DeMayo, F. J., & Schwartz, R. J. (2005). Complex cardiac Nkx2-5 gene expression activated by noggin-sensitive enhancers followed by chamber-specific modules . *PNAS*.
- Christoffels, V. M., Keijser, A. G., Houweling, A. C., Clout, D. E., & Moorman, A. F. (2000). Patterning the Embryonic Heart: Identification of Five Mouse Iroquois Homeobox Genes in the Developing Heart. *Developmental Biology*.
- Jamali, M., Karamboulas, C., Rogerson, P. J., & Skerjanc, I. S. (2001). BMP signaling regulates Nkx2-5 activity during cardiomyogenesis. *FEBS letters*.
- Jamali, M., Rogerson, P. J., Wilton, S., & Skerjanc, I. S. (2001). Nkx2-5 Activity Is Essential for Cardiomyogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Jay, P. Y., Harris, B. S., Buerger, A., Rozhitskaya, O., Maguire, C. T., Barbosky, L. A., . . . Izumo, S. (2004). Function Follows Form: Cardiac Conduction System Defects in Nkx2-5 Mutation . *The Anatomical Record*.
- Jay, P. Y., Harris, B. S., Maguire, C. T., Buerger, A., Wakimoto, H., Tanaka, M., . . . Izumo, S. (2004). Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Kamino, K., Hirota, A., & Fujii, S. (1981). Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltagesensitive dye. . *Nature*.
- Kasahara, H., Barunkova, S., Schinke, M., Tanaka, M., & Izumo, S. (1998). Cardiac and Extracardiac Expression of Csx/Nkx2.5 Homeodomain Protein. *Circulation Research*.
- Kasahara, H., Usheva, A., Ueyama, T., Aoki, H., Horikoshi, N., & Izumo, S. (2000). Characterization of Homo- and Heterodimerization of Cardiac Csx/Nkx2.5 Homeoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*.

- Kim, E. Y., Chen, L., Ma, Y., Yu, W., Chang, J., Moskowitz, I. P., & Wang, J. (2011). Expression of Sumoylation Deficient Nkx2.5 Mutant in Nkx2.5 Haploinsufficient Mice Leads to Congenital Heart Defects. *PLoS ONE*.
- Li, J., Cao, Y., Wu, Y., Chen, W., Yuan, Y., Ma, X., & Huang, G. (2014). The expression profile analysis of NKX2-5 knock-out embryonic mice to explore the pathogenesis of congenital heart disease. *Journal of Cardiology*.
- Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., . . . Huang, J. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & Cell*.
- Lints, T. J., Parsons, L. M., Hartley, L., Lyons, I., & Harvey, R. P. (1993). Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*.
- Liu, X. Y., Wang, J., Yang, Y. Q., Zhang, Y. Y., Chen, X. Z., Zhang, W., . . . Chen, Y. H. (2009). Novel NKX2-5 mutations in patients with familial atrial septal defects. *Pediatric Cardiology*.
- Liu, X. Y., Yang, Y. Q., Yang, Y., Lin, X. P., & Chen, Y. H. (2009). Mutation of NKX2-5 gene in patients with atrial septal defect. *Zhonghua Er Ke Za Zhi. Chinese journal of pediatrics*.
- Liu, Z., Li, T., Liu, Y., Jia, Z., Li, Y., Zhang, C., . . . Zhou, C. (2009). WNT signaling promotes NKX2.5 expression and early cardiomyogenesis via downregulation of Hdac1. *Biochimica et Biophysica*.
- Liu, Z., Wang, J., Liu, S., Deng, Y., Liu, H., Li, N., . . . Zhu, J. (2015). Copy number variation of GATA4 and NKX2-5 in Chinese fetuses with congenital heart disease. *Pediatrics International*.
- Lyons, I., Parsons, L. M., Hartley, L., Li, R., Andrews, J. E., Robb, L., & Harvey, R. P. (1995). Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes & Development*.
- McElhinney, D. B., Geiger, E., Blinder, J., Benson, W., & Goldmuntz, E. (2003). NKX2.5 Mutations in Patients With Congenital Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology*.
- Miller, C. E., Thompson, R. P., Bigelow, M. R., Gittinger, G., Trusk, T. C., & Sedmera, D. (2005). Confocal Imaging of the Embryonic Heart: How Deep? *Microscopy and Microanalysis*.
- Mohun, T., & Sparrow, D. (1997). Early steps in vertebrate cardiogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development*.
- Moorman, A. F., & Christoffels, V. (2003). Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiological Reviews*.
- Moskowitz, I. P., Kim, J. B., Moore, M. L., Wolf, C. M., Peterson, M. A., Shendure, J., . . . Seidman, C. E. (2007). A Molecular Pathway Including Id2, Tbx5, and Nkx2-5 Required for Cardiac Conduction System Development. *Cell*.

- Nagel, S., Kaufmann, M., Drexler, H. G., & MacLeod, R. A. (2003). The Cardiac Homeobox Gene NKX2-5 Is Deregulated by Juxtaposition with BCL11B in Pediatric T-ALL Cell Lines via a Novel t(5;14)(q35.1;q32.2). *Cancer Research*.
- Naito, A. T., Tominaga, A., Oyamada, M., Oyamada, Y., Shiraishi, I., Monzen, K., . . . Takamatsu, T. (2003). Early stage-specific inhibitions of cardiomyocyte differentiation and expression of Csx/Nkx-2.5 and GATA-4 by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002. *Experimental Cell Research*.
- Nakajima, H., Hoshiyama, M., Yamashita, K., & Kiyomoto, A. (1975). Effect of diltiazem on electrical and mechanical activity of isolated cardiac ventricular muscle of guinea pig. *Japanese journal of pharmacology*.
- Nouira, S., Kamoun, I., Ouragini, H., Charfeddine, C., Mahjoub, H., Ouechtati, F., . . . Kachboura, S. (2008). Clinical and Genetic Investigation of Atrial Septal Defect with Atrioventricular Conduction Defect in a Large Consanguineous Tunisian Family. *Archives of Medical Research*.
- Pearson, J. C., Lemons, D., & McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nature Reviews - Genetics*.
- Peng, T., Wang, L., Zhou, S. F., & Li, X. (2010). Mutations of the GATA4 and NKX2.5 genes in Chinese pediatric patients with nonfamilial congenital heart disease. *Genetica*.
- Perera, J. L., Johnson, N. M., Judge, D. P., & Crosson, J. E. (2014). Novel and highly lethal NKX2.5 missense mutation in a family with sudden death and ventricular arrhythmia. *Pediatric Cardiology*.
- Peshkovsky, C., Totong, R., & Yelon, D. (2011). Dependence of Cardiac Trabeculation on Neuregulin Signaling and Blood Flow in Zebrafish. *Developmental Dynamics*.
- Pradhan, L., Genis, C., Scone, P., Weinberg, E. O., Kasahara, H., & Nam, H.-J. (2012). Crystal Structure of the Human NKX2.5 Homeodomain in Complex with DNA Target. *Biochemistry*.
- Prall, O. W., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., . . . Harvey, R. P. (2007). An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls second heart field progenitor specification and proliferation. *Cell*.
- Reamon-Buettner, S. M., & Borlak, J. (2004). Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *Journal of Medical Genetics*.
- Reamon-Buettner, S. M., & Borlak, J. (2010). NKX2-5: An Update on this Hypermutable Homeodomain Protein and its Role in Human Congenital Heart Disease (CHD). *Official journal - Human genome variation society*.
- Riazi, A. M., Takeuchi, J. K., Hornberger, L. K., Zaidi, S. H., Amini, F., Coles, J., . . . Van Arsdell, G. S. (2009). NKX2-5 Regulates the Expression of b-Catenin and GATA4 in Ventricular Myocytes. *PLoS ONE*.

- Ritchie, M. D., Rowan, S., Kucera, G., Stubblefield, T., Blair, M., Roden, D. M., & Darbar, D. (2012). Chromosome 4q25 variants are genetic modifiers of rare ion channel mutations associated with familial atrial fibrillation. *Journal of American College of Cardiology*.
- Rosenthal, N., & Harvey, R. P. (1999). Single allele mutations at the heart of congenital disease. *The Journal of Clinical Investigation*.
- Sarkozy, A., Conti, E., Neri, C., D'Agostino, R., Digilio, M. C., Esposito, G., . . . Dallapiccola, B. (2005). Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors. *Journal of Medical Genetics*.
- Searcy, R. D., Vincent, E. B., Liberatore, C. M., & Yutzey, K. E. (1998). A GATA-dependent nkx-2.5 regulatory element activates early cardiac gene expression in transgenic mice. *Development*.
- Sedmera, D., Reckova, M., deAlmeida, A., Sedmerova, M., Biermann, M., Volejnik, J., . . . Thompson, R. P. (2002). Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. *American journal of physiology. Heart and circulation physiology*.
- Sedmera, D., Reckova, M., Rosengarten, C., Torres, M. I., Gourdie, R. G., & Thompson, R. P. (2005). Optical mapping of electrical activation in the developing heart. *Microscopy and microanalysis: the official journal of Microscopy Society of America*.
- Segers, V. F., & Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*.
- Sepulveda, J. L., Vlahopoulos, S., Iyer, D., Belaguli, N., & Schwartz, R. J. (2002). Combinatorial Expression of GATA4, Nkx2-5, and Serum Response Factor Directs Early Cardiac Gene Activity. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Shiojima, I., Komuro, I., Inazawa, J., Nakahori, Y., Matsushita, I., Abe, T., . . . Yazaki, Y. (1995). Assignment of Cardiac Homeobox Gene CSX to Human Chromosome 5q34. *Genomics*.
- Shiojima, I., Komuro, I., Mizuno, T., Aikawa, R., Akazawa, H., Oka, T., . . . Yoshio, Y. (1996). Molecular Cloning and Characterization of Human Cardiac Homeobox Gene CSX1. *Circulation Research*.
- Schott, J.-J., Benson, W. D., Basson, C. T., Pease, W., Silberbach, M. G., Moak, J. P., . . . Seidman, J. G. (1998). Congenital Heart Disease Caused by Mutations in the Transcription Factor NKX2-5. *Science*.
- Sizarov, A., Ya, J., de Boer, B. A., Lamers, W. H., Christoffels, V. M., & Moorman, A. F. (2011). Formation of the Building Plan of the Human Heart - Morphogenesis, Growth, and Differentiation. *Circulation*.
- Srinivasan, S., Baldwin, S., Aristizabal, O., Kwee, L., Labow, M., Artman, M., & Turnbull, D. H. (1998). Noninvasive, In Utero Imaging of Mouse Embryonic Heart Development With 40-MHz Echocardiography. *Circulation*.
- Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., & Mitchison, T. J. (2003). Dissecting Temporal and Spatial Control of Cytokinesis with a Myosin II Inhibitor. *Science*.

- Takeda, M., Briggs, L. E., Wakimoto, H., Marks, M. H., Warren, S. A., Lu, J. T., . . . Kasahara, H. (2009). Slow progressive conduction and contraction defects in loss of Nkx2–5 mice after cardiomyocyte terminal differentiation. *Laboratory Investigation; a journal of technical methods and pathology*.
- Tanaka, M., Chen, Z., Bartunkova, S., Yamasaki, N., & Izumo, S. (1999). The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development*.
- Turbay, D., Wechsler, S. B., Blanchard, K. M., & Izumo, S. (1996). Molecular Cloning, Chromosomal Mapping, and Characterization of the Human Cardiac-Specific Homeobox Gene hCsx. *Molecular Medicine*.
- Vostarek, F., Sankova, B., & Sedmera, D. (2014). Studying dynamic events in the developing myocardium. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*.
- Wakimoto, H., Kasahara, H., Maguire, C. T., Moskowitz, I. P., Izumo, S., & Berul, C. I. (2003). Cardiac Electrophysiological Phenotypes in Postnatal Expression of Nkx2.5 Transgenic Mice . *Genesis*.
- Wang, J., Chen, Q., Wang, L., Zhou, S., Cheng, L., Xie, X., . . . Ma, X. (2011). Identifying novel mutations of NKX2-5 congenital heart disease patients of Chinese Minority Groups . *International Journal of Cardiology*.
- Wang, J., Zhang, H., Iyer, D., Feng, X.-H., & Schwartz, R. J. (2008). Regulation of Cardiac Specific nkx2.5 Gene Activity by Small Ubiquitin-like Modifier. *The Journal of Biological Chemistry*.
- Wang, Z., Zou, L., Zhong, R., Zhu, B., Chen, W., Shen, N., . . . Miao, X.-P. (2013). Associations between Two Genetic Variants in NKX2-5 and Risk of Congenital Heart Disease in Chinese Population: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*.
- Warren, S. A., Terada, R., Briggs, L. E., Cole-Jeffrey, C. T., Chien, W.-M., Seki, T., . . . Kasahara, H. (2011). Differential Role of Nkx2-5 in Activation of the Atrial Natriuretic Factor Gene in the Developing versus Failing Heart. *Molecular and Cellular Biology*.
- Webb, S., Brown, N. A., & Anderson, R. H. (1998). Formation of the Atrioventricular Septal Structures in the Normal Mouse. *Circulation Research*.
- Winston, J. B., Schulkey, C. E., Chen, I.-B. D., Regmi, S. D., Efimova, M., Erlich, J. M., . . . Jay, P. Y. (2012). Complex Trait Analysis of Ventricular Septal Defects Caused by Nkx2-5 Mutation. *Circulation. Cardiovascular Genetics*.
- Wu, S. M., Fujiwara, Y., Cibulsky, S. M., Clapham, D. E., Lien, C.-I., Schultheiss, T. M., & Orkin, S. H. (2006). Developmental Origin of a Bipotential Myocardial and Smooth Muscle Cell Precursor in the Mammalian Heart. *Cell*.
- Xie, W.-H., Chang, C., Xu, Y.-J., Li, R.-G., Qu, X.-K., Fang, W.-Y., . . . Yang, Y.-Q. (2013). Prevalence and spectrum of Nkx2.5 mutations associated with idiopathic atrial fibrillation. *Clinics*.
- Xin, M., Olson, E. N., & Bassel-Duby, R. (2013). Mending broken hearts: cardiac development as a basis for adult heart regeneration and repair . *Nature Reviews Molecular Cell Biology*.

- Yi, B. A., Wernet, O., & Chien, K. R. (2010). Preegenerative medicine: developmental paradigms in the biology of cardiovascular regeneration . *The Journal of Clinical Investigation*.
- Yu, H., Xu, J.-H., Song, H.-M., Zhao, L., Xu, W.-J., Wang, J., . . . Yang, Y.-Q. (2014). Mutational Spectrum of the NKX2-5 Gene in Patients with Lone Atrial Fibrillation . *International Journal of Medical Sciences*.
- Zhang, W., Li, X., Shen, A., Jiao, W., Guan, X., & Li, Z. (2009). Screening NKX2.5 mutation in a sample of 230 Han Chinese children with congenital heart diseases. . *Genetic testing and molecular biomarkers*.
- Zhao, Y.-y., Sawyer, D. R., Baliga, R. R., Opel, D. J., Han, X., Marchionni, M. A., & Kelly, R. A. (1997). Neuregulins Promote Survival and Growth of Cardiac Myocytes . *The Journal of Biological Chemistry*.

Tento projekt bol vypracovaný s podporou Ministerstva školstva, PRVOUK P35 a GA ČR
13-12412S