

Shox2对窦房结发育和起搏细胞命运的遗传调控

宋颖楠 李华 胡雪峰*

(福建师范大学生命科学学院, 福建省发育与神经生物学重点实验室, 福州 350108)

摘要 窦房结控制着心脏跳动的节律, 是心脏传导系统中电生理信号产生及传导的初级起搏点, 该结构的缺陷可能会导致各种类型的心律失常。矮小身材同源异型框基因2(short stature homeobox 2, *Shox2*)是同源异型框基因家族的一个成员, 对窦房结的发育和正常功能的行使至关重要。研究表明, *Shox2*的突变会导致小鼠窦房结发育不全, 并产生窦性心动过缓和心律失常的症状。人类和小鼠*Shox2*的突变还被发现与心房颤动(房颤)的发生紧密相关。另外, *Shox2*可以通过抑制NK2型同源异型框基因5(NK2 homeobox 5, *Nkx2.5*)的表达来调控遗传网络, 以维持窦房结中起搏细胞的命运, 是起搏细胞分化的关键基因。该文综述了*Shox2*基因对窦房结发育和起搏细胞命运的调控机制, 进一步探究房颤发生的原因, 为研发新型生物起搏器提供理论依据。

关键词 *Shox2*; 窦房结; 房颤; 起搏细胞; 生物起搏器

Genetic Regulation of *Shox2* on Sinoatrial Node Development and Pacemaker Cell Fate

Song Yingnan, Li Hua, Hu Xuefeng*

(Fujian Key Laboratory of Developmental and Neural Biology, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China)

Abstract The sinoatrial node controls heart rate, which is the primary pacemaker for the generation and conduction of electrocardiosignals in the cardiac conduction system. Defect of this structure will lead to various types of cardiac arrhythmias. *Shox2* (short stature homeobox 2), a member of the homeobox gene family, is critical for the development of sinoatrial node and its normal biological function. Mutations of *Shox2* can lead to sinus node hypoplasia in mice, which contribute to the symptoms of severe sinus bradycardia and cardiac arrhythmia. The mutations in mice and human *Shox2* are also closely related to atrial fibrillation. In addition, *Shox2* regulates a genetic network through the repression of *Nkx2.5* (NK2 homeobox 5) to maintain the pacemaker cell fate in sinoatrial node and thus plays key roles in pacemaker cells differentiation. This review summarizes the regulation mechanism of *Shox2* in sinoatrial node development and pacemaker cell fate, further explores the causes of atrial fibrillation, and provides a theoretical basis for biological pacemaker therapies.

Keywords *Shox2*; sinoatrial node; atrial fibrillation; pacemaker cells; biological pacemaker

心脏的搏动由窦房结、房室结和希氏-浦肯野纤维等组成的心脏传导系统控制, 其心电传导信号最初由窦房结发出, 而后传递到房室结。因此窦房

结也被称为初级起搏器, 房室结则被称为次级起搏器。起搏细胞是窦房结和房室结的主要细胞组分, 由其所产生的生理性电刺激信号, 通过希氏-浦肯野

收稿日期: 2018-10-10 接受日期: 2018-12-03

福建省科技厅重点项目(批准号: 201510011)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0591-22868208, E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

Received: October 10, 2018 Accepted: December 3, 2018

This work was supported by Key Program of Department of Science and Technology of Fujian Province (Grant No.201510011)

*Corresponding author. Tel: +86-591-22868208, E-mail: bioxfh@fjnu.edu.cn

网络出版时间: 2019-04-01 13:48:50

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190401.1348.028.html>

纤维传导到心肌细胞,保持心房和心室节律搏动^[1-2]。因此,窦房结中的起搏细胞是保持心脏电兴奋,维持心脏正常搏动节律的源头,这些细胞的损伤和功能衰退是导致心脏房室传导阻滞、心律失常和功能衰竭的根本原因。近年来,随着发育生物学、分子遗传学和生物信息学等学科的飞速发展,已经有越来越多的转录因子被证实在窦房结的发育过程中起着非常重要的作用。研究发现,矮小身材同源异型框基因2(short stature homeobox 2, *Shox2*)编码的*Shox2*转录因子对窦房结中的形成和分化是至关重要的,另外还有研究证实,小鼠和人*Shox2*基因和房颤的发生紧密相关^[3-7]。因此,本文综述了*Shox2*的基因结构、基本功能、在窦房结发育过程中的表达模式及对窦房结发育和正常功能的维持,为更进一步研究探索房颤发生的分子机制和为生物起搏器治疗寻找新的方向奠定基础。

1 *Shox2*基因的结构和基本功能

*SHOX2*是*SHOX*基因家族的成员,定位于人3号染色体上(3q25-26.1),有6个外显子,其编码的产物为含有60个氨基酸残基的保守的DNA结合结构域的转录因子。小鼠*Shox2*和人类的*SHOX2*在氨基酸水平上具有99%的同源性^[8]。核苷酸序列分析表明,*Shox2*基因通过可变剪切可产生三种亚型的转录调控因子:即*Shox2a*、*Shox2b*和*Shox2c*。*Shox2a*所编码的蛋白序列最长,*Shox2c*次之,*Shox2b*最短^[9]。如图1所示,*Shox2b*蛋白缺少对应于*Shox2a*的N-端前131个氨基酸序列和C-端的第235到第246位的氨基酸序列,*Shox2c*蛋白的N-端则比*Shox2a*的N-端少了99个氨基酸序列。这三种亚型均含有编码同源异型框基因的氨基酸序列,其中包括SH3结合结构域,P-Loop环核苷酸结合位点和C-端含有14个氨基酸残基序列的OAR(otp, aristaless, ras)结构域^[7,9]。已有研究证明,*Shox2*蛋白的调控基因转录的活性结构域在C-端,在人胚胎肾细胞系HEK-293T和人胚胎癌细胞系P19细胞中*Shox2a*和*Shox2b*表现为转录过程的阻遏物,并且它们的转录活力不同,*Shox2b*的转录抑制作用低于*Shox2a*,但是缺乏OAR结构域的*Shox2a*则完全丧失了抑制活性^[9]。这表明,OAR结构域对靶基因的转录调控起着至关重要的作用。除此以外,*Shox2*在人骨肉瘤细胞系U2Os中表现为激活转录的作用^[10],说明*Shox2*调控靶基因的转录活性取决于组

织或细胞特异性因子。另外,酵母双杂交系统检测结果发现,*Shox2a*能够与自身形成同源二聚体或与*Shox2b*形成异源二聚体,但是*Shox2b*本身不能形成同源二聚体,证明*Shox2a*的N-端具有将两个亚单位形成相互作用的复合物的独特功能^[3]。因而可以推测,*Shox2*是通过这些保守结构域与靶基因调节区中的特定位点进行蛋白质-蛋白质的相互作用、识别与结合,从而激活、抑制或增强靶基因的表达,进而最终对组织和器官的生长发育进行调控。

2 *Shox2*在心脏中的表达模式

在心脏的早期发育过程中,在胚胎期6.5天(E6.5),位于身体两侧的生心板(cardiogenic plates)融合为线性的心管,该结构也称为第一心区(first heart field)^[11],来自脏壁中胚层特定区域的前体细胞,也称之为第二心区(second heart field),这些前体细胞不断地从周围的间充质中募集细胞并形成原始心管的动脉极(arterial pole)和静脉极(venous pole)^[11-12]。其中,嵌入到静脉极中的前体细胞也被称为后心区(posterior heart field),这些细胞最终会发育形成包括以后将形成窦房结和冠状窦(coronary sinus)的静脉窦(sinus venosus)、肺静脉(pulmonary vein)和房间隔(atrial septum)等流入道结构(inflow tract)^[11,13]。

小鼠窦房结的发育起始于E9.5,由后心区静脉窦的部分细胞开始分化,膨出形成窦房结原基。Espinoza-Lewis等^[5]通过原位杂交技术检测了*Shox2*在小鼠心脏早期发育过程的表达模式。结果发现,*Shox2*最早在E8.5小鼠胚胎颈总动脉和原始心房的交界处表达。到E9.5,*Shox2*的表达局限在流入道,并特异地在颈总动脉和静脉窦的交界处形成的窦角(sinus horn)区域中表达。从E10.5至E11.5,*Shox2*仅在窦房结和窦瓣(sinus valve)表达^[7]。当小鼠胚胎发育到E12.5后,随着窦房结原基中细胞的不断增殖和分化,并沿着右侧静脉瓣逐渐延伸,窦房结形成了“头部”和“尾部”区域^[4,7,12,14],*Shox2*将持续在窦房结的“头部”和“尾部”中表达^[4,6-7],而工作心肌细胞特异标记物*Nkx2.5*的表达局限于窦房结的“尾部”区域^[4,7,12,14](图2)。Espinoza-Lewis等^[5]的研究还进一步证明了*Shox2*敲除小鼠的窦房结中的细胞不能正常分化为起搏细胞,表现为*Hcn4*、*Tbx3*及*Islet1*等起搏细胞的标记基因在窦房结上的表达消失,而*Cx40*、*Cx43*及*Nppa*等心肌细胞的特异性标记基因在此处的异

位表达, 这是导致小鼠心动过缓及胚胎致死的原因。该实验结果与Liu等^[9]和Blaschke等^[15]的结果一致, 这提示, *Shox2*对窦房结的发育和功能维持具有极其重要作用。

3 *Shox2*对窦房结发育的调控

调控窦房结发育的分子信号网络十分复杂, 涉及*Shox2*、*Nkx2.5*、*Hcn4*、*Tbx3*、*Cx40*、*Cx43*等多种基因的多重调控和相互作用。我们实验室的前期研究发现, 敲除*Shox2*会导致E12.5小鼠由于心动过缓和严重发育不良的窦房结而死亡^[5]。*Shox2*通过

抑制*Nkx2.5*在窦房结的“头部”的表达, 确保窦房结细胞不向心房心肌方向进行分化, 从而维持窦房结的正常形态和功能^[5-7]。此外, Wiese等^[14]的研究证明, *Tbx3*也具有抑制*Nkx2.5*在窦房结“头部”中表达, 并抑制心房特异标记物*Cx40*、*Cx43*等在窦房结的表达, 确保窦房结细胞不向心肌分化的功能。这提示, *Shox2*和*Tbx3*可能通过协同作用来共同抑制*Nkx2.5*在窦房结“头部”的表达, 从而确保窦房结的正常发育。另外, 我们还发现, 利用*Nkx2.5^{IresCre}*、*Shox2^{lox/lox}*小鼠在*Nkx2.5*所表达的细胞中条件性敲除*Shox2*后, 会导致窦房结“尾部”*Hcn4*表达消失, 工作心肌细

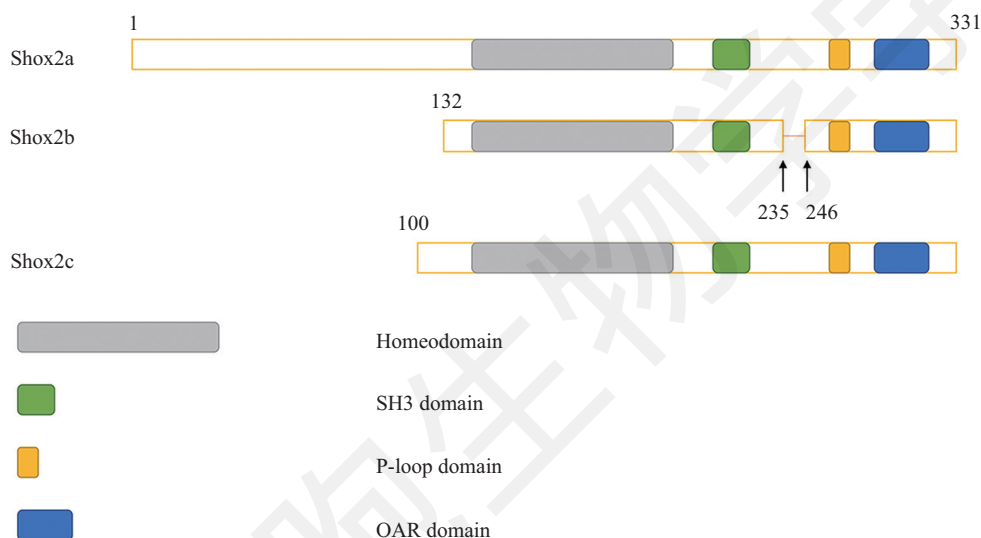
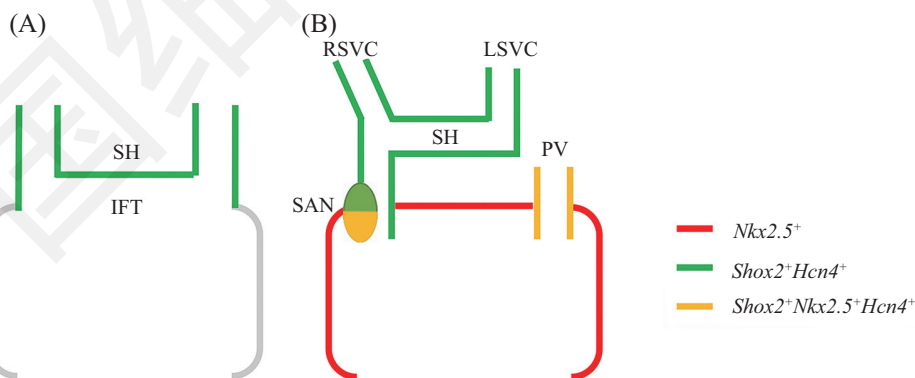


图1 *Shox2*蛋白结构的示意图(根据参考文献[7,9]修改)

Fig.1 Schematic representation of *Shox2* proteins (modified from references [7,9])



A: E9.5天, *Shox2*的表达局限于流入道和窦角区域。B: E14.5, *Shox2*和*Hcn4*在窦房结“头部”区域, 左、右上腔静脉, 窦角以及肺静脉共表达。同时检测到*Shox2*、*Nkx2.5*和*Hcn4*在窦房结的“尾部”和肺静脉中共同表达。IFT: 流入道; SH: 窦角; SAN: 窦房结; RSVC: 右上腔静脉; LSVC: 左上腔静脉; PV: 肺静脉。

A: *Shox2* expression is restricted to the inflow tract and sinus horn regions at E9.5. B: At E14.5, *Shox2* and *Hcn4* are co-expressed in the SAN head region, left and right superior vena cava, sinus horn and the pulmonary vein. Meanwhile, *Shox2*, *Nkx2.5* and *Hcn4* are co-expressed in the “tail” region of the sinus node and in the pulmonary vein. IFT: inflow tract; SH: sinus horn; SAN: sinoatrial node; RSVC: right superior vena cava; LSVC: left superior vena cava; PV, pulmonary vein.

图2 *Shox2*在胎鼠心脏中的表达模式(根据参考文献[4,7]修改)

Fig.2 Schematic illustration of the expression pattern of *Shox2* in mouse embryonic heart (modified from references [4,7])

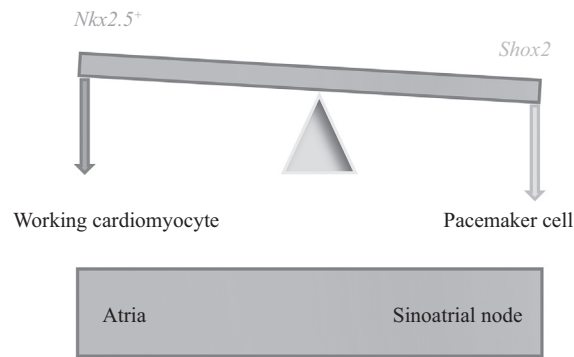


图3 *Shox2*和*Nkx2.5*在窦房结发育过程中的关系(根据参考文献[6]修改)

Fig.3 The relationship between *Shox2* and *Nkx2.5* during sinoatrial node development (modified from reference [6])

胞标记物*Cx40*等表达上升。通过三维重构技术的进一步检查,发现相对于野生型小鼠,突变型小鼠的窦房结体积显著变小。对8周龄同窝出生的野生型小鼠和突变型小鼠的心电图进行进一步检测发现突变型小鼠出现严重的窦性心动过缓和心律失常的现象^[6]。这说明,在*Nkx2.5*表达的区域条件性敲除*Shox2*后造成起搏细胞向工作心肌方向进行分化,导致窦房结功能紊乱。另外,在*Nkx2.5*亚效等位基因小鼠中条件性敲除*Shox2*后,会发现在窦房结起搏细胞的标记物*Hcn4*、工作心肌细胞的标记物*Cx40*等均恢复正常表达水平。这表明,*Shox2*和*Nkx2.5*两者在窦房结中通过互相拮抗的作用来调控细胞的命运,*Shox2*能促进细胞向起搏细胞的分化,*Nkx2.5*则抑制其分化^[6]。

为进一步确认*Shox2-Nkx2.5*的拮抗机制,我们通过染色质免疫共沉淀技术结合第二代测序分析技术(ChIP-Seq)比较了*Shox2*和*Nkx2.5*在全基因组范围上和其他基因的结合位点,结果发现,*Shox2*和*Nkx2.5*具有大量相同的靶基因DNA结合位点,经推测,*Shox2*可能通过占据共同的DNA模体(motif)与*Nkx2.5*竞争靶基因DNA结合位点,或者与*Nkx2.5*共同结合到DNA模体上,达到调控*Nkx2.5*表达的功能,从而诱导细胞向起搏细胞方向分化^[6]。Boogaard等^[16]的ChIP-Seq结果则证明,*Tbx3*和*Nkx2.5*在全基因组范围上也和许多和起搏/工作心肌细胞分化相关的基因有相同的结合位点,例如*Tbx3*和*Nkx2.5*就可以通过竞争结合工作心肌细胞的标记物*Scn5a*的相同增强子位点,从而调控细胞的命运。

由此我们提出在窦房结发育的过程中,存在一种由*Shox2*和*Nkx2.5*的拮抗机制调控的跷跷板模型^[6]

(图3)。在该模型中,*Shox2*和*Nkx2.5*转录输出之间的“重量变化”决定了起搏器命运或心肌命运,*Nkx2.5*活性越强则促进细胞转变为心肌细胞,而*Shox2*的活性越强则促进细胞转变为起搏细胞。同时,异常的重量变化会改变细胞的命运并可能导致发生各种类型的心律不齐。

4 *Shox2*与房颤

心房颤动简称为房颤(atrial fibrillation),是持续性心律失常最为常见的形式,可能导致运动能力受损、痴呆、低血压、晕厥、呼吸困难和心力衰竭等问题,房颤症状严重时会有很高的致死率^[17]。房颤的发生通常与异位起搏点的形成密切相关,绝大部分的房颤是由于肺静脉心肌袖中形成了异位起搏点而引发的^[18-19]。对房颤的致病机制的深入研究有助于为将来有效而安全的治愈房颤提供理论研究基础。

我们的前期研究发现,*Shox2*、*Nkx2.5*和起搏细胞标记物*Hcn4*不仅在窦房结的“尾部”区域中共表达,也同时在肺静脉心肌束中共表达(图2)。在E14.5,分离出携带能对*Shox2*的表达进行实时荧光标记报告蛋白DsRed的转基因小鼠的肺静脉细胞,并通过膜片钳技术检测肺静脉中*Shox2*阳性细胞的电生理情况,发现这些细胞的电生理特性与起搏细胞相似^[6]。Huang等^[20]证明了*Nkx2.5*亚效等位基因突变导致异位起搏点的形成。我们的研究则进一步证明,在*Nkx2.5*亚效等位基因小鼠中异位起搏点的形成是由于*Shox2*的表达在肺静脉心肌层中显著提升,造成肺静脉心肌细胞命运转变分化为起搏细胞,从而导致了异位起搏点的形成,造成房颤。而在*Nkx2.5*亚

效等位基因小鼠中特异地敲除*Shox2*后, 异位起搏点消失, 肺静脉心肌细胞的命运也被挽救^[6]。这提示, 肺静脉中异位起搏点的形成可能与窦房结发育过程一样, 由*Shox2*和*Nkx2.5*的拮抗机制共同调控。Wang等^[21]的研究也支持这一观点, 他们发现, 作为心脏发育左/右不对称通路中的左侧转录因子*Pitx2*在肺静脉心肌层中表达, 可与*Shox2*直接结合并抑制*Shox2*的表达, *Pitx2*单倍体表达不足会导致*Shox2*在左侧肺静脉心肌层中表达显著提升, 致使该位置心肌细胞的命运转变为起搏细胞, 形成了异位起搏点, 导致有房颤发生的风险。另外, 我们根据*Shox2*和*Nkx2.5*的ChIP-Seq的结果进行基因本体论(Gene Ontology)分析, 结果表明, 与心房颤动相关生物学术语在*Shox2*和*Nkx2.5*共同占据的DNA结合位点中高度富集, 而如果能证明*Shox2*和*Nkx2.5*之间的拮抗机制也存在于成人体内, 则可能从新的角度进一步解析房颤的病因^[4]。

在2016年, Sandra Hoffmann等^[22]首次报道了*SHOX2*与人类早发性的房颤发生具有直接关系。他们通过对378名不到60岁的早发性房颤患者和1 870名未发现房颤的对照人群的*SHOX2a*作单核苷酸多态性(SNP)对比分析, 发现了两个错义突变: 即p.G81E和p.H283Q^[22]。随后他们构建了载体将这两个突变引入斑马鱼中, 验证这两个突变在模式动物中的功能^[22]。结果发现, p.H283Q位点的突变会造成斑马鱼的心率严重下降, 即使在过表达斑马鱼*Shox2*后也无法挽救这种现象。这证明, 该位点的突变会对*SHOX2*对心脏的起搏功能造成不可逆转的影响。他们还发现, 当*SHOX2*基因的3'端非编码区中第28位碱基T如果变为C(c.*28T>C)后, 持有该突变的发颤病人的心电图表现为具有超过200 ms的P-R间期, 这表明, 心房到房室结的传导受阻, 同时也会影响窦房结、心房、房室结的电生理特性。通过进一步与人类的miRNA数据库比对分析, 他们发现, c.*28T>C位点能识别并结合*hsa-miR-92b-5p*的功能位点, 而携带该位点突变的房颤患者, 血浆中的*hsa-miR-92b-5p*表达水平显著降低, 同时*SHOX2*在右心耳中的表达水平也显著降低^[22]。以上结果表明, 无论在小鼠或者人身体中, *Shox2*都与房颤的发生有紧密的关系, 并且*Shox2*的表达水平对维持窦房结正常功能的行使至关重要。

5 *Shox2*与生物起搏

人造电子心脏起搏器自1958年问世以来, 一直是临床上治疗一些心脏疾病的重要技术手段, 其可以替代窦房结, 使心脏有节律地收缩, 并不断泵出血液以供应供给身体所需^[23]。尽管人工心脏起搏器的技术已经逐渐改进, 临床适应症也不断拓宽, 但也暴露了一些缺点, 如电池寿命有限、价格昂贵、感染、出血、电极脱位及缺乏对神经激素的自身反应性等。从心脏生理功能和人体适应性的角度来看, 理想的起搏器应该是生物起搏器。近年来随着分子生物学和干细胞技术的发展, 生物起搏心脏技术不断取得突破^[24-25]。目前生物起搏器的研究主要集中于两个方向, 即基于干细胞技术的细胞替代疗法和基因治疗技术, 二者有望成为防治心脏疾病的新颖、高效的治疗策略^[26]。

目前构建生物起搏器的关键主要是使其起搏活动和人体正常的生理性起搏一致^[27]。因此, 通过对与窦房结起搏细胞发育相关的转录因子的深入研究, 研究者们通过这些转录因子导入到成体或多潜能性干细胞中, 诱导这些细胞进一步分化, 从而得到形态和生理功能都与窦房结起搏细胞类似的生物起搏器, 已经取得了很大进展。例如, Hoogaars等^[28]和Bakker等^[29]的研究均证实, 过表达*Tbx3*可以分别将工作心肌细胞和终末分化的心肌细胞重编程为具有起搏细胞生理特性的细胞。Kapoor等^[30]则证实, 将载有*Tbx18*的腺病毒注射到有房室结心脏传导阻滞的猪体内, 发现注射部位的心肌细胞产生了与窦房结起搏细胞类似的生理活动。

目前, 尚未有研究证实, *Shox2*可以直接诱导终末分化的细胞转变为起搏细胞。我们的前期研究结果证实, 在胚胎干细胞的体外分化过程中, 经过*Nkx2.5* microRNA处理, 可以促进胚胎干细胞向起搏细胞方向进行分化, 并且分化的细胞中*Shox2*的表达显著提升, 均表现出起搏细胞类似的生理学特性^[6]。该研究也证实了*Shox2*和*Nkx2.5*的拮抗作用也适用于体外诱导分化过程, 从而决定细胞的命运。Ionta等^[31]则通过比较*Shox2*、*Tbx3*和*Tbx18*在心脏发育过程中的各组成部分(窦房结、右心房、左心房、左心室)中的表达情况, 期望通过过表达该转录因子来获得均一性的起搏细胞。结果发现, 相较于*Tbx3*和*Tbx18*, 只有*Shox2*是在胚胎发育过程中高度特异地在窦房结中表达的转录因子。在将小鼠胚胎干

细胞聚合在一起形成类胚体的方法诱导细胞自发进行分化3天后,加入携带*SHOX2*的腺病毒,在分化7天后可以得到富集的起搏细胞类群。通过免疫荧光实验,发现在跳动的类胚体细胞中能检测到*Shox2*的表达,同时这些*Shox2*阳性细胞能表达心脏传导标志物*Hcn4*和心脏标志物*cTnT*。用膜片钳技术检测跳动的类胚体细胞的膜电位信号,结果显示,*Shox2*⁺的跳动细胞表现出起搏细胞相类似的动作电位,并且*Nkx2.5*表达水平显著降低。将这些起搏细胞类群移植到大鼠心室心肌中,发现这些细胞仍然具有起搏细胞的特性。这些结果表明,过表达单个起搏细胞特有的转录因子,或利用转录因子之间的相互作用诱导细胞向起搏细胞方向分化都为未来生物起搏器的功能完善提供了很好的基础。此外,越来越多的研究已经证实,可以利用化学小分子混合物替代转录因子高效诱导成纤维细胞向心肌细胞方向进行分化,例如转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路的抑制剂A83-01、Rho/Rho激酶信号通路的抑制剂Y-27632和丙戊酸钠等^[27,32]。虽然目前还没有研究报道具有高效诱导成纤维细胞或多潜能干细胞向起搏细胞方向分化的化学小分子混合物,但毫无疑问这将是未来探索生物起搏器研发的新方向。

6 存在的问题和研究展望

*Shox2*已经被越来越多的学者认为是窦房结发育和功能维持过程中必不可少的转录调控因子,并且与房颤的发生紧密相关。*Shox2*和*Nkx2.5*对起搏细胞和工作心肌细胞命运决定的拮抗机制仅仅是目前研究得比较明确的很小部分,受该机制调控的下游基因及调控的时空位点等是否还存在着复杂的基因调控网络有待研究。此外,尽管通过过表达起搏细胞特有的转录因子或利用microRNA敲低工作心肌细胞谱系特有的基因可以高效诱导细胞向起搏细胞方向分化,并且得到表型均一、生物特性稳定的起搏细胞,但是基因操作的潜在威胁可能会对未临床治疗的安全性带来隐患。随着对*Shox2*的调控机制的深入研究,*Shox2*也可能作为房颤的治疗靶点之一,并且寻找到更安全的方法,例如用化学小分子混合物替代转录因子诱导细胞向起搏细胞方向进行分化,同时可望以此为基础研制出性能持久稳定的新型生物起搏器。

参考文献 (References)

- 1 Van Weerd JH, Christoffels VM. The formation and function of the cardiac conduction system. *Development* 2016; 143(2): 197-210.
- 2 Park DS, Fishman GI. Development and function of the cardiac conduction system in health and disease. *J Cardiovasc Dev Dis* 2017; 4(2): 7-30.
- 3 Liu HB, Chen CH, Ye W, Espinoza-Lewis RA, Hu XF, Zhang YD, *et al.* Phosphorylation of Shox2 is required for its function to control sinoatrial node formation. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(3): e000796-810.
- 4 Ye W, Song Y, Huang Z, Zhang Y, Chen YP. Genetic regulation of sinoatrial node development and pacemaker program in the venous pole. *J Cardiovasc Dev Dis* 2015; 2(4): 282-98.
- 5 Espinoza-Lewis RA, Yu L, He FL, Liu HB, Tang RH, Shi JL, *et al.* Shox2 is essential for the differentiation of cardiac pacemaker cells by repressing Nkx2-5. *Dev Biol* 2009; 327(2): 376-85.
- 6 Ye W, Wang J, Song Y, Yu D, Sun C, Liu C, *et al.* A common *Shox2-Nkx2-5* antagonistic mechanism primes the pacemaker cell fate in the pulmonary vein myocardium and sinoatrial node. *Development* 2015; 142(14): 2521-32.
- 7 Hu W, Xin Y, Zhao Y, Hu J. Shox2: The role in differentiation and development of cardiac conduction system. *Tohoku J Exp Med* 2018; 244(3): 177-86.
- 8 Blaschke RJ, Monaghan AP, Schiller S, Schechinger B, Rao E, Padilla-Nash H, *et al.* SHOT, a SHOX-related homeobox gene, is implicated in craniofacial, brain, heart, and limb development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(5): 2406-11.
- 9 Liu H, Chen CH, Espinoza-Lewis RA, Jiao Z, Sheu I, Hu X, *et al.* Functional redundancy between human shox and mouse shox2 genes in the regulation of sinoatrial node formation and pacemaking function. *J Biol Chem* 2011; 286(19): 17029-38.
- 10 Yu L, Liu H, Yan M, Yang J, Long F, Muneoka K, *et al.* Shox2 is required for chondrocyte proliferation and maturation in proximal limb skeleton. *Dev Biol* 2007; 306(2): 549-59.
- 11 Liang X, Evans S M, Sun Y. Development of the cardiac pacemaker. *Cell Mol Life Sci* 2017; 74(7): 1247-59.
- 12 Liang X, Wang G, Lin L, Lowe J, Zhang Q, Bu L, *et al.* HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors. *Circ Res* 2013; 113(4): 399-407.
- 13 Christoffels VM, Mommersteeg MT, Trowe MO, Prall OW, de Gier-de Vries C, Soufan A T, *et al.* Formation of the venous pole of the heart from an Nkx2-5-negative precursor population requires Tbx18. *Circ Res* 2006; 98(12): 1555-63.
- 14 Wiese C, Grieskamp T, Airik R, Mommersteeg MTM, Gardiwal A, de Gier-de Vries C, *et al.* Formation of the sinus node head and differentiation of sinus node myocardium are independently regulated by Tbx18 and Tbx3. *Circ Res* 2009; 104(3): 388-97.
- 15 Blaschke RJ, Hahurij ND, Kuijper S, Just S, Wisse LJ, Deissler K, *et al.* Targeted mutation reveals essential functions of the homeodomain transcription factor Shox2 in sinoatrial and pacemaking development. *Circulation* 2007; 115(14): 1830-38.
- 16 Van den Boogaard M, Wong LYE, Tessadori F, Bakker ML, Dreizehnter LK, Wakker V, *et al.* Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer. *J Clin Invest* 2012; 122(7): 2519-30.
- 17 Bond R, Olshansky B, Kirchhof P. Recent advances in rhythm

- control for atrial fibrillation. *F1000Res* 2017; 6: 1796-1804.
- 18 Douglas YL, Jongbloed MRM, DeRuiter MC, Gittenberger-de Groot AC. Normal and abnormal development of pulmonary veins: State of the art and correlation with clinical entities. *Int J Cardiol* 2011; 147(1): 13-24.
- 19 Haissaguerre M, Jais P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, *et al.* Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *New Engl Med* 1998; 339(10): 659-66.
- 20 Huang RT, Xue S, Xu YJ, Zhou M, Yang YQ. A novel NKX2.5 loss-of-function mutation responsible for familial atrial fibrillation. *Int J Mol Med* 2013; 31(5): 1119-26.
- 21 Wang J, Klysik E, Sood S, Johnson RL, Wehrens XH, Martin JF. *Pitx2* prevents susceptibility to atrial arrhythmias by inhibiting left-sided pacemaker specification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(21): 9753-58.
- 22 Hoffmann S, Clauss S, Berger IM, Weiss B, Montalbano A, Roth R, *et al.* Coding and non-coding variants in the *SHOX2* gene in patients with early-onset atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2016; 111(3): 36-51.
- 23 Hu YF, Dawkins JF, Cho HC, Marban E, Cingolani E. Biological pacemaker created by minimally invasive somatic reprogramming in pigs with complete heart block. *Sci Transl Med* 2014; 6(245): 245ra94.
- 24 Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 2008; 453(7193): 322-29.
- 25 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 26 Protze SI, Liu J, Nussinovitch U, Ohana L, Backx PH, Gepstein L, *et al.* Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nat Biotechnol* 2017; 35(1): 56-68.
- 27 Adepu S, Oosterwerff EFJ, Christoffels VM, Boink GJJ. Direct Reprogramming to regenerate myocardium and repair its pacemaker and conduction system. *Medicines (Basel)* 2018; 5(2): 48-63.
- 28 Hoogaars WM, Engel A, Brons JF, Verkerk AO, de Lange FJ, Wong LY, *et al.* *Tbx3* controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* 2007; 21(9): 1098-1112.
- 29 Bakker ML, Boink GJJ, Boukens BJ, Verkerk AO, van den Boogaard M, den Haan AD, *et al.* T-box transcription factor *TBX3* reprogrammes mature cardiac myocytes into pacemaker-like cells. *Cardiovasc Res* 2012; 94(3): 439-49.
- 30 Kapoor N, Liang W, Marban E, Cho HC. Direct conversion of quiescent cardiomyocytes to pacemaker cells by expression of *Tbx18*. *Nat Biotechnol* 2013; 31(1): 54-62.
- 31 Ionta V, Liang WB, Kim EH, Rafie R, Giacomello A, Marban E, *et al.* *SHOX2* Overexpression favors differentiation of embryonic stem cells into cardiac pacemaker cells, improving biological pacing ability. *Stem Cell Reports* 2015; 4(1): 129-42.
- 32 Fu YB, Huang CW, Xu XX, Gu HF, Ye YQ, Jiang CZ, *et al.* Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails. *Cell Res* 2015; 25(9): 1013-24.