



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών



ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

In vitro και *in vivo* μελέτες για τη διερεύνηση του
ρόλου του οξειδωτικού στρες στη διαφοροποίηση
μυοκαρδίου χρησιμοποιώντας κυτταρικές σειρές και
το ζωικό μοντέλο zebrafish (*Danio rerio*)

Μαρία Κουφάκη

ΑΜ 1113201300060

Επιβλέποντες:

Καθηγήτρια κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη, τμήμα Βιολογίας
Ε.Κ.Π.Α.

Ερευνητής Γ' Δρ. Δημήτρης Μπέης, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών
Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΑΘΗΝΑ 2017

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στον Τομέα Φυσιολογίας Ζώων και Ανθρώπου του τμήματος Βιολογίας, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, σε συνεργασία με το εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας του Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών.

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της διπλωματικής μου εργασίας, κ. Αικατερίνη Γαϊτανάκη για την αμέριστη υποστήριξη, την έμπειρη καθοδήγηση, αλλά και την ανάθεση του θέματος, καθώς μου έδωσε την ευκαιρία να συνδέσω τη θεωρία με την πράξη και να εγκλιματιστώ στις απαιτήσεις της έρευνας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες και την ευγνωμοσύνη μου στον Ερευνητή Γ', κ. Δημήτρη Μπέη για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της χρονιάς. Οι ουσιώδεις παρατηρήσεις και συμβουλές του με κατεύθυναν σ' ένα σωστό, οργανωμένο τρόπο σκέψης και συνέβαλαν καθοριστικά στις μετέπειτα επιλογές μου στο τομέα της Επιστήμης.

Επιπρόσθετα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη της ερευνητικής ομάδας του κ. Μπέη, τη μεταδιδάκτορα Μαντώ Αγάλου, τους υποψήφιους διδάκτορες Ματίνα Κατράκη – Παύλου, Αντωνία Κατσούδα και Πάνο Σαράντη και τη μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Δελικούρα, για την ανιδιοτελή προσφορά τους, τον σημαντικό χρόνο που μου αφιέρωσαν και τις ωφέλιμες γνώσεις που μου μετέδωσαν καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην επίκουρη καθηγήτρια κ. Ιωάννα Αγγελή, στην τεχνικό του εργαστηρίου Αναπτυξιακής Βιολογίας Γιασεμή Κουτμάνη και τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Γαμπιεράκη για τις συμβουλές και την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχαν για τη διεξαγωγή του *in vitro* πειραματικού μέρους.

Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να επισημάνω την απέραντη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου που ήταν δίπλα μου ανά πάσα στιγμή, όχι μόνο στην προσπάθεια ολοκλήρωσης αυτής της εργασίας, αλλά σε όλη την πορεία μου μέχρι σήμερα, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.

Συντμήσεις

Σύντμηση	Αγγλικός όρος	Ελληνικός όρος
3-MP	3-mercaptopyruvate	3-μερκαπτοπυροσταφυλικό
3-MST	3-mercaptopyruvate sulphurtransferase	Θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού
Akt	Protein kinase B	Πρωτεϊνική κινάση B
ALPM	Anterior lateral plate mesoderm	Μεσόδερμα της πρόσθιας πλευρικής πλάκας
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
AV valve	Atrioventricular valve	Κολποκοιλιακή βαλβίδα
BMP	Bone morphogenetic proteins	Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine	Βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη
BV valve	Bulbus ventricular valve	Αορτική βαλβίδα
CAT	Cysteine aminotransferase	Αμινομεταφοράση της κυστεΐνης
CBE	Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ exchanger	Φορέας ανταλλαγής Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻
CBS	Cystathionine β synthase	β-συνθετάση της κυσταθειονίνης
CMs	Cardiomyocytes	Καρδιομυοκύτταρα
CoCl ₂	Cobalt chloride	Χλωριούχο κοβάλτιο
CPCs	Cardiac progenitor cells	Καρδιακά προγονικά κύτταρα
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Μικρές ομαδοποιημένες παλίνδρομες επαναλήψεις
crRNA	CRISPR relative RNA	RNA που συντίθεται από την τεχνολογία CRISPR
CSE	Cystathionine γ lyase	γ-λύαση της κυσταθειονίνης
Cyt c	Cytochrome c	Κυτόχρωμα c

DADS	Diallyl disulfide	Διαλλυλ-δισουλφίδιο
DAO	D-amino acid oxidase	Οξειδάση των D-αμινοξέων
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole	4',6-Διαμινο-2-φαινυλινδόλιο
DbD	Debutyl-dronedarone	Αποβουτυλ-δρονεδάρωνη
ddH ₂ O	Double deionized water	Δις-απιονισμένο νερό
dH ₂ O	Deionized water	Απιονισμένο νερό
DHLA	Dihydrolipoic acid	Διϋδρολιποϊκό οξύ
DIO	Deiodinase	Ένζυμο αφαίρεσης ιωδίου
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
dNTPs	Deoxynucleotides	Δεοξυριβονουκλεοτίδια
dpf	Days post fertilization	Ημέρες μετά την γονιμοποίηση
DSB	Double-stranded breaks	Δίκλιωνα θραύσματα
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
EMT	Epithelial-to-mesenchymal transition	Μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases	Ρυθμιζόμενες από εξωκυττάριο σήμα κινάσες 1/2
EW	Egg Water	Νερό που χρησιμοποιείται για την ανατροφή των αυγών zebrafish
FHF	First heart field	Πρώτο καρδιακό πεδίο
GCL	Glutamate-cysteine ligase	Λιγάση γλουταμικού - κυστεΐνης
GFP	Green Fluorescent Protein	Πράσινη Φθορίζουσα Πρωτεΐνη
GLT-1	Glial glutamate transporter 1	Μεταφορέας γλουταμικού γλοίας 1
GPx	Glutathione peroxidase	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
gRNA	Guide RNA	RNA-οδηγός

GSH	Glutathione	Γλουταθειόνη
H ₂ S	Hydrogen sulfide	Υδρόθειο
HCl	Hydrochloric acid	Υδροχλωρικό οξύ
HDR	Homology-directed repair	Επιδιόρθωση βασιζόμενη στην ομολογία
HF	Heart failure	Καρδιακή ανεπάρκεια
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 α	Επαγόμενος από υποξία παράγοντας 1 α
hiPSC-CMs	Human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells	Ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα
hpf	Hours post fertilization	Ώρες μετά την γονιμοποίηση
hpt	Hours post treatment	Ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου
HRE	HIF-responsive elements	Ανταποκρινόμενα σε HIF στοιχεία
IGF	Insulin-like growth factor	Αυξητικός παράγοντας τύπου ινσουλίνης
JNK	c-Jun-nuclear kinase	c-Jun πυρηνική κινάση
KCl	Potassium chloride	Χλωριούχο κάλιο
KH ₂ PO ₄	Potassium Dihydrogen Phosphate	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
LDL	Low density lipoprotein	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LOF	Loss of-function mutations	Μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας
LTCC	L-type Ca ²⁺ channels	Κανάλια ασβεστίου L-τύπου
MAPKs	Mitogen – activated protein kinases	Επαγόμενες από μιτογόνα κινάσες πρωτεΐνης
MBE	Moving boundary electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση κινουμένων ορίων
MBT	Midblastula transition	Μετάβαση μεσοβλαστιδίου

MEF2	Myocyte enhancer factor 2	Αυξητικός παράγοντας μυοκυττάρων 2
MgCl ₂	Magnesium chloride	Χλωριούχο μαγνήσιο
MMPs	Matrix metalloproteinases	Μεταλλοπρωτεϊνάσες
Mtz	Metronidazole	Μετρονιδαζόλη
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide	Νικοτιναμιδο – αδενινο – δινουκλεοτίδιο
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Φωσφορικό νικοτιναμιδο – αδενινο – δινουκλεοτίδιο
Na ₂ HPO ₄	Disodium phosphate	Φωσφορικό δινάτριο
NHE	Na ⁺ /H ⁺ exchanger	Φορέας ανταλλαγής Na ⁺ /H ⁺
NGS	Normal Goat Serum	Φυσιολογικός ορός κατσίκας
NHEJ	Non-homologous end-joining	Επιδιορθωτικός μηχανισμός μη ομόλογης ένωσης άκρων
NOX	NADPH oxidases	NADPH οξειδάσες
NRCs	Notch-responsive cells	Κύτταρα αποκρινόμενα στο Notch σηματοδοτικό μονοπάτι
NTR	Nitroreductase	NO ₂ αναγωγή
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase-1	Poly (ADP-ριβόζη) πολυμεράση-1
PBS	Phosphate-buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων
PCR	Polymerase Chain Reaction	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης
PDE4	Phosphodiesterase 4	Φωσφοδιεστεράση 4
PDE5	Phosphodiesterase 5	Φωσφοδιεστεράση 5
PFA	Paraformaldehyde	Παραφορμαλδεΐδη
PI3K	Phosphatidylinositol-3 kinase	Κινάση της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3
PKCδ	Protein kinase C delta	Πρωτεϊνική κινάση C δ

PLN	Phospholamban	Φωσφολαμπάνη
PLP	Pyridoxal 5-phosphate	5-φωσφορική πυριδοξάλη
PQ	Paraquat	Παρακουάτ
PTP	Permeability transition pore	Πόρος μετάβασης διαπερατότητας
PTU	Propylthiouracil	Προπυλ-θιουρακίλη
pVHL	Von Hippel-Lindau tumor suppressor protein	Πρωτεΐνη καταστολέας όγκου von Hippel-Lindau
P	Postnatal day	Ημέρα μετά τη γέννηση
RA	Retinoic acid	Ρετινοϊκό οξύ
REM	Cardiac remodeling	Καρδιακή αναδιαμόρφωση
ROS	Reactive Oxygen Species	Δραστικές μορφές οξυγόνου
RXRs	Retinoid acid X receptors	Υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος X
SERCA2	Sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase 2	Ca ²⁺ -ΑΤΡάση του σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου 2
SHF	Second heart field	Δεύτερο καρδιακό πεδίο
SOD	Superoxide dismutase	Υπεροξειδική δισμουτάση
Tg	Transgenic line	Διαγονιδιακή σειρά
TracrRNA	Trans-activating crRNA	Trans-ενεργοποιό crRNA
T ₃	Triiodo-L-Thyronine	Τριωδοθυρονίνη
T ₄	Tetraiodothyronine	Τετραιωδοθυρονίνη
TH	Thyroid hormones	Θυρεοειδικές ορμόνες
THR _s	Thyroid hormone receptors	Υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών
TRE	TH response elements	Στοιχεία αποκρινόμενα στις θυρεοειδικές ορμόνες
YSL	Yolk syncytial layer	Λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	1
1.1 Το ζωικό μοντέλο zebrafish	1
1.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση, ενδιαίτημα και βιολογία	1
1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	2
1.1.3 Κύκλος ζωής και αναπτυξιακά στάδια	3
1.1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης του ζωικού μοντέλου zebrafish	5
1.1.5 Το zebrafish ως μοντέλο μελέτης του Καρδιαγγειακού συστήματος.....	7
1.2 Αναγέννηση του μυοκαρδίου στο zebrafish	11
1.2.1 Μηχανισμός καρδιακής αναγέννησης	13
1.2.2 Σύστημα NO ₂ αναγωγής – Μετρονιδαζόλης (NTR-Mtz)	14
1.3 Τεχνολογία Ομαδοποιημένων Μικρών Παλίνδρομων Επαναλήψεων (CRISPR)/Κασπάσης (Cas9)	16
1.4 Το υδρόθειο (H₂S)	19
1.4.1 Βιοσύνθεση του υδρόθειου.....	20
1.4.2 Θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (3-MST).....	22
1.4.3 Η ανθρώπινη ασθένεια MCDU	24
1.5 Η δράση του υδρόθειου στο Καρδιαγγειακό σύστημα	24
1.5.1 Επιδράσεις του H ₂ S στην καρδιά	24
1.5.2 Η λειτουργία του H ₂ S στα αγγεία.....	27
1.6 Οξειδωτικό στρες	28
1.6.1 Παραγωγή και εξισορρόπηση δραστικών μορφών οξυγόνου	28
1.6.2 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην καρδιακή δομή και λειτουργία.....	30
1.7 Οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των θυρεοειδικών ορμονών	32
2. Σκοπός	35
3. Υλικά και Μέθοδοι	36
3.1 Βιολογικό υλικό	36
3.1.1 Πειραματόζωα	36
3.1.2 Κυτταρική σειρά H9c2	38
3.2 Υλικά	39
3.2.1 Διαβίωση του ζωικού μοντέλου zebrafish.....	39

3.2.2 Χειρισμός των εμβρύων zebrafish.....	39
3.2.3 Απομόνωση DNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	39
3.2.4 Χημικές δοκιμές	40
3.2.5 Διατήρηση κυττάρων, ανακαλλιέργεια και στέρηση ορού	41
3.2.6 Επίδραση παραγόντων.....	42
3.2.7 Ανοσοκυτταροχημεία	42
3.3 Προγράμματα λογισμικού	43
3.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός – Αναλώσιμα.....	43
3.5 Μέθοδοι	45
3.5.1 Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου zebrafish	45
3.5.2 Διασταυρώσεις και χειρισμός εμβρύων zebrafish.....	47
3.5.3 Απομόνωση DNA από ουραία πτερύγια ενήλικων ψαριών zebrafish	50
3.5.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	51
3.5.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση	54
3.5.6 Καθαρισμός προϊόντος PCR.....	56
3.5.7 Χημικές δοκιμές	57
3.5.8 Δοκιμασία θιγμοτακτισμού	60
3.5.9 Μέτρηση καρδιακού ρυθμού.....	62
3.5.10 Κυτταροκαλλιέργειες – Διατήρηση σε άσηπτες συνθήκες	63
3.5.11 Ανακαλλιέργεια φλάσκας.....	64
3.5.12 Καταμέτρηση κυττάρων – Ετοιμασία πλάκας.....	65
3.5.13 Στέρηση ορού – Επίδραση με T ₃ και BrdU	67
3.5.14 Ανοσοκυτταροχημεία	68
4. Αποτελέσματα.....	72
4.1 In vivo διερεύνηση της έλλειψης του ενζύμου 3MST στο ζωικό μοντέλο zebrafish	72
4.1.1 Παρατήρηση της ανάπτυξης σε συνθήκες υποξίας	74
4.1.2 Μελέτη της απόκρισης προνυμφών στο οξειδωτικό στρες	75
4.1.3 Παρατήρηση σήμανσης με μιτοχονδριακή φθορίζουσα χρωστική σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.....	78
4.1.4 Μελέτη της αναγεννητικής ικανότητας εμβρύων zebrafish με τη χρήση του συστήματος NTR-Mtz	80
4.1.5 Συμπεριφορική δοκιμασία θιγμοτακτισμού	85
4.2 In vitro μελέτη της επίδρασης της T₃ στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της H9c2 κυτταρικής σειράς.....	88

5. Συζήτηση	92
5.1 <i>In vivo</i> διερεύνηση της έλλειψης του ενζύμου 3MST στο ζωικό μοντέλο zebrafish	92
5.2 <i>In vitro</i> μελέτη της επίδρασης της T₃ στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση H9c2 καρδιακών μυοβλαστών	105
6. Βιβλιογραφία	114
Περίληψη	131
Summary	132

1. Εισαγωγή

1.1 Το ζωικό μοντέλο zebrafish

1.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση, ενδιαίτημα και βιολογία

Το zebrafish, *Danio rerio*, αποτελεί τροπικό ψαρί του γλυκού νερού και ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερυγίων, στην οικογένεια Cyprinidae (Nelson, 2006). Προέρχεται από τα ηπειρωτικά ύδατα της Ινδίας και εμφανίζει ευρεία γεωγραφική εξάπλωση σε ολόκληρη την ινδική χερσόνησο, μέσω των ποταμών Γάγγη και Βραχμαπούτρα που διασχίζουν το Μπαγκλαντές, την Ινδία και το Νεπάλ. Εισαχθέντες πληθυσμοί του είδους εντοπίζονται στα ηπειρωτικά ύδατα των Ηνωμένων Πολιτειών της Αμερικής (Καλιφόρνια, Κονέκτικατ, Φλόριντα και Νέο Μεξικό) και στην Κολομβία.

Τα άτομα του είδους *Danio rerio* απαντώνται συνήθως σε αβαθείς λίμνες ή σε στάσιμα ύδατα, συμπεριλαμβανομένων και ορυζώνων (Spence et al., 2007). Επίσης εντοπίζονται σε ρυάκια και ποτάμια γλυκού νερού με χαμηλή ροή (McClure et al., 2006).

Όσον αφορά την αναπαραγωγή τους, πραγματοποιείται με εξωτερική γονιμοποίηση καθ' όλη τη διάρκεια του έτους όταν βρίσκονται εντός του εργαστηρίου. Σε γενικές γραμμές είναι ετήσιο είδος στην φύση, με την περίοδο της ωοτοκίας να αρχίζει λίγο πριν την έναρξη των μουσώνων. Η αναπαραγωγική συμπεριφορά επηρεάζεται σημαντικά από τη διαθεσιμότητα τροφής και από τη φωτοπερίοδο. Η ωορρηξία εξαρτάται από την έκθεση του θηλυκού ατόμου σε εκκρινόμενες φερομόνες του αρσενικού (Eaton and Farley, 1974). Τα διαφανή αυγά του zebrafish δεν προσκολλώνται στο υπόστρωμα και έχουν διάμετρο περίπου 0.7 mm. Η επαφή με το νερό ενεργοποιεί τα αυγά και ακόμα και αυτά που δεν έχουν γονιμοποιηθεί αναπτύσσουν έναν περιβιτελλινικό χώρο αλλά αποτυγχάνουν να διαιρεθούν (Lee et al., 1999). Η εκκόλαψη των αυγών πραγματοποιείται στο διάστημα μεταξύ 48 και 72 ωρών μετά τη γονιμοποίηση στους 28.5°C και εξαρτάται από το πάχος του χορίου και τη μυϊκή δραστηριότητα του εμβρύου (Kimmel et al., 1995). Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες έχουν μήκος περίπου 3mm και αρχίζουν να προσκολλώνται σε σκληρές επιφάνειες μέσω μικρών εκκριτικών κυττάρων της επιδερμίδας της κεφαλής τους (Laale, 1977). Η προσκόλληση σε σταδιακά υψηλότερα επίπεδα, τους δίνει τη δυνατότητα να φθάσουν στην επιφάνεια του νερού και να γεμίσουν τη νηκτική τους

κύστη με αέρα, γεγονός απαραίτητο για την περαιτέρω επιβίωση τους (Goolish and Okutake, 1999). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται από τις 72 περίπου ώρες μετά τη γονιμοποίηση, το χρονικό σημείο που ξεκινούν επίσης δραστηριότητες όπως η κολύμβηση και η διατροφή (Kimmel et al., 1995).

Στην φύση, ο μέσος όρος ζωής των ατόμων zebrafish είναι ένα έτος, ωστόσο εντός του εργαστηρίου η μέση διάρκεια ζωής αυτών ανέρχεται στα 3,5 χρόνια. Τα άτομα που ζουν υπό συνθήκες αιχμαλωσίας αναπτύσσουν συχνά κύρτωση στη σπονδυλική τους στήλη μετά το δεύτερο έτος της ζωής τους, φαινόμενο που δεν παρατηρείται στους φυσικούς πληθυσμούς. Ο φαινότυπος αυτός προκαλείται από εκφυλισμό των μυών και συνήθως συνδέεται με τη γήρανση (McClure et al., 2006; Spence et al., 2007).

Ως προς τις διατροφικές τους συνήθειες, τα zebrafish είναι ζώα παμφάγα και τρέφονται με ζωοπλαγκτόν, έντομα, προνύμφες εντόμων, σκώληκες και μικρά καρκινοειδή. Επιπλέον έχουν εντοπιστεί σε αναλύσεις πεπτικού περιεχομένου φυτοπλαγκτόν, φύκη με νηματώδη θαλλό, υλικό αγγειωδών φυτών, λέπια ιχθύων, αραχνοειδή και οργανικά θρύμματα (McClure et al., 2006; Spence et al., 2007).

1.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Τα άτομα του είδους *Danio rerio* έχουν ατρακτοειδή, πλαγίως πεπιεσμένο κορμό και το στόμα τους έχει φορά προς τα πάνω, με την κάτω γνάθο να προεξέχει σε σχέση με την άνω γνάθο. Βασικό χαρακτηριστικό του είδους, από το οποίο προκύπτει και η κοινή του ονομασία zebrafish ή αλλιώς ψάρι-ζέβρα, είναι το ιδιαίτερο μοτίβο εναλλαγής σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων στις πλευρές του κορμού, το οποίο εκτείνεται σε όλο το μήκος του σώματος μέχρι και το ουραίο πτερύγιο. Το εδρικό πτερύγιο έχει επίσης χαρακτηριστικές ρίγες και διακλαδισμένες ακτίνες. Το μοτίβο που αναφέρθηκε οφείλεται σε τρεις τύπους χρωματοφόρων κυττάρων: τα μελανοφόρα (σκούρα μπλε, φέρουν μελανίνη), τα ξανθοφόρα (χρυσά, φέρουν καροτινοειδή) και τα ιριδοφόρα (ιριδίζοντα, φέρουν κρυστάλλους γουανίνης) κύτταρα (Parichy, 2006). Αρχικά διαμορφώνονται δύο κεντρικές λωρίδες και ακολούθως κατά την ανάπτυξη διατάσσονται οι επόμενες, επάνω και κάτω από τις ήδη υπάρχουσες (McClure, 1999). Όπως συμβαίνει στους περισσότερους Τελεόστεους, τα μελανοφόρα κύτταρα μπορούν να διασπαρθούν ή να συσσωρευτούν λόγω απόκρισης σε ερεθίσματα. Η αλλαγή στο χρωματισμό φαίνεται να λειτουργεί τόσο ως συγκάλυψη

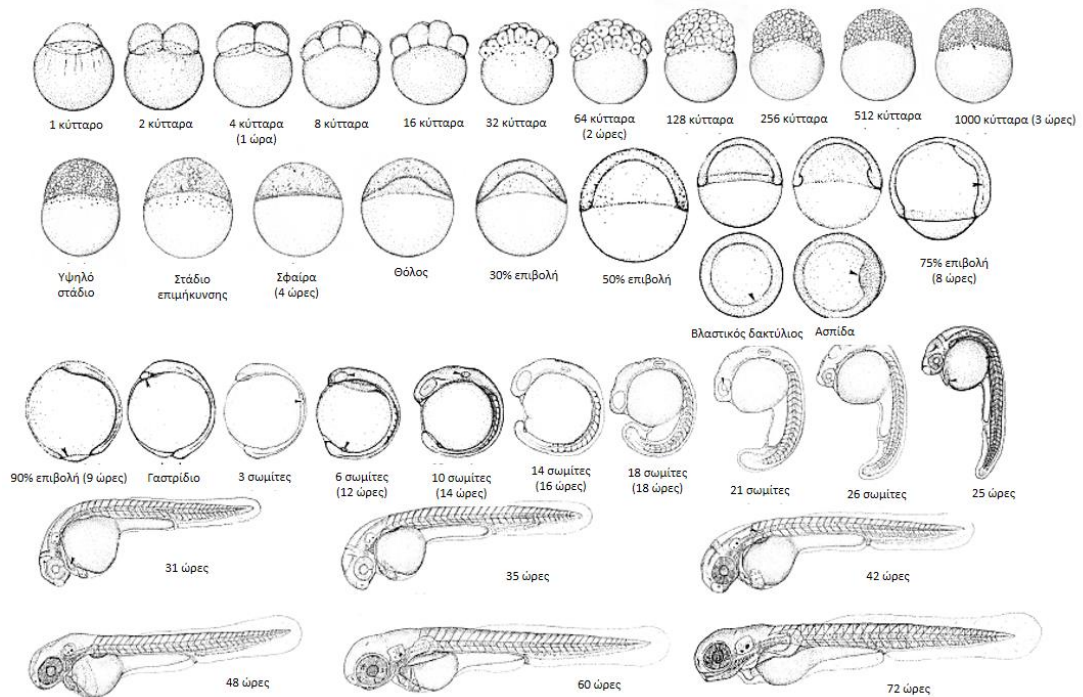
(camouflage), όπου επέρχονται μεταβολές ανάλογα με την ένταση του φωτός (Guo, 2004), όσο και ως προειδοποιητικός μηχανισμός, καθώς το χρώμα τυπικά σκουραίνει κατά την επίδειξη επιθετικής διάθεσης (Gerlai, 2003; Larson et al., 2006). Το μέγεθος των zebrafish μπορεί να φτάσει τα 6.4 cm, ωστόσο σε συνθήκες αιχμαλωσίας, όπως στο εργαστήριο, σπάνια ξεπερνά τα 4cm.

1.1.3 Κύκλος ζωής και αναπτυξιακά στάδια

Η εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish είναι ταχεία, εφόσον στις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hours post fertilization, hpf) έχουν σχηματιστεί όλα τα κύρια όργανα. Ακολούθως, μέσα στις 3 πρώτες ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization, dpf), τα έμβρυα εκκολάπτονται και αρχίζουν την αναζήτηση τροφής. Ο κύκλος ζωής του είδους διαρκεί συνολικά 12 εβδομάδες καθώς μέσα σε 3-4 μήνες τα zebrafish φτάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα. Η ανάπτυξη του zebrafish διακρίνεται στα εξής στάδια: τον ζυγώτη (zygote), την περίοδο αυλακώσεων (cleavage), το βλαστίδιο (blastula), το γαστρίδιο (gastrula), την περίοδο κατάτμησης (segmentation), τη φαρυγγική περίοδο (pharyngula), την περίοδο εκκόλαψης (hatching period) και την περίοδο της πρώιμης προνύμφης (early larva) (Kimmel et al., 1995; Slack, 2012) (Εικόνα 1.1).

- Το πρόσφατα γονιμοποιημένο αυγό παραμένει στο στάδιο του ζυγώτη (0hpf – περίπου 30 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση) μέχρι και την ολοκλήρωση της πρώτης αυλάκωσης. Η γονιμοποίηση επάγει την ανύψωση του χορίου από τον ζυγώτη και ενεργοποιεί κυτταροπλασματικές κινήσεις, οι οποίες είναι εμφανείς μετά από περίπου 10 λεπτά.
- Κατά την περίοδο των αυλακώσεων (περίπου 30 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση – 2 ¼ hpf) πραγματοποιούνται οι κυτταρικοί κύκλοι 2-7 με σχετικά γρήγορο ρυθμό και ταυτόχρονα. Το πρότυπο αυλάκωσης είναι μεροβλαστικό, καθώς το συνεχώς διαιρούμενο κυτταρόπλασμα είναι περιορισμένο σε μια στενή δισκοειδή μάζα πάνω από τη λέκιθο. Συνεπώς, οι αυλακώσεις συμβαίνουν μόνο στο βλαστόδισκο (2-3 mm) που βρίσκεται στο ζωικό πόλο και σχηματίζουν βλαστομερίδια. Τα βλαστομερίδια παραμένουν συνδεδεμένα με την κύρια λεκιθική μάζα (yolk), η οποία παραμένει ακυτταρική, μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών.

- Στο στάδιο του βλαστιδίου ($2 \frac{1}{4}$ hpf – $5 \frac{1}{4}$ hpf) οι συγχρονισμένες διαιρέσεις δίνουν την θέση τους σε επιμήκεις και ασύμμετρες, κατά τη μετάβαση μεσοβλαστιδίου (midblastula transition, MBT). Η MBT σηματοδοτεί την έναρξη της μεταγραφής του ζυγωτικού γονιδιώματος και διακρίνει το έμβρυο σε τέσσερις περιοχές: την καλυπτήρια στιβάδα, τα κύτταρα βάθους, τη λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (yolk syncytial layer, YSL) και τη λεκιθική μάζα. Επίσης ξεκινά η διαδικασία της επιβολής (epiboly), δηλαδή η ενεργή επέκταση της YSL και του βλαστοδίσκου επί του λεκιθικού σάκου, η οποία συνεχίζεται κατά την περίοδο της γαστριδίωσης.
- Κατά τη γαστριδίωση ($5 \frac{1}{4}$ hpf – 10hpf) οι διαιρέσεις έχουν ως αποτέλεσμα την εισβολή, σύγκλιση και επέκταση κυττάρων για την εγκαθίδρυση της τυπικής δομής των τριών στιβάδων του σώματος ενός τριπλοβλαστικού οργανισμού: εξωτερικά το εξώδερμα, εσωτερικά το ενδόδερμα και ενδιάμεσα το μεσόδερμα. Ως γαστρίδιο ονομάζεται το λεκιθικό κύτταρο που καλύπτεται πλήρως από το βλαστοδίσκο, δηλαδή έχει επέλθει 100% επιβολή.
- Κατά την περίοδο κατάτμησης (10hpf – 24hpf) ξεκινά η δημιουργία των σωματιών του εμβρύου, των πρώιμων φαρυγγικών τόξων και η ανάπτυξη των νευρομερών (νευριδίωση). Το έμβρυο επιμηκύνεται, παρατηρείται πρωτογενής οργανογένεση, οι πρώτες κινήσεις του εμβρύου μέσα στο χόριο και εμφανίζεται η ουρά.
- Στη φαρυγγική περίοδο (24hpf – 48hpf) ο άξονας του εμβρύου γίνεται πιο ευθύγραμμος σε σχέση με την πρώτη καμπυλότητα που εμφάνιζε. Επιπλέον, ξεκινά η κυκλοφορία του αίματος και αρχίζει η ανάπτυξη των πτερυγίων και του χρωματισμού του δέρματος.
- Κατά την περίοδο της εκκόλαψης (48hpf – 72hpf) ολοκληρώνεται η πρώιμη οργανογένεση και ξεκινά η ανάπτυξη του χόνδρου στην κεφαλή και των πλευρικών πτερυγίων. Η έξοδος των εμβρύων από το χόριο γίνεται ασύγχρονα.
- Στο στάδιο της πρώιμης προνύμφης (ξεκινά στις 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και ακολουθείται από το στάδιο της προνύμφης, το οποίο διαρκεί μέχρι την ενηλικίωση) η νηκτική κύστη διογκώνεται, η προνύμφη κολυμπά ενεργά και αποφεύγει ερεθίσματα, ενώ βρίσκεται και σε αναζήτηση τροφής, καθ' ότι οι σιαγόνες του στόματος έχουν σχηματιστεί και ο λεκιθικός σάκος αρχίζει να μειώνεται.



Εικόνα 1.1: Αναπτυξιακά στάδια του zebrafish. Ανατύπωση (<http://www.uoneuro.uoregon.edu/k12/zfk12.html>)

1.1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης του ζωικού μοντέλου zebrafish

Τα τελευταία χρόνια το zebrafish έχει αναδειχθεί σε ένα από τα χρησιμότερα ζωικά μοντέλα για ένα ευρύ φάσμα βιολογικών ζητημάτων που κρίνεται αναγκαίο να διερευνηθούν *in vivo* σε κυτταρικό και υποκυτταρικό επίπεδο (Beis and Stainier, 2006). Πρόκειται για ένα πειραματόζωο που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των θηλαστικών για τη μελέτη της ανάπτυξης των σπονδυλωτών και τη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών, ορισμένα από τα οποία αναφέρονται παρακάτω (Εικόνα 1.2A):

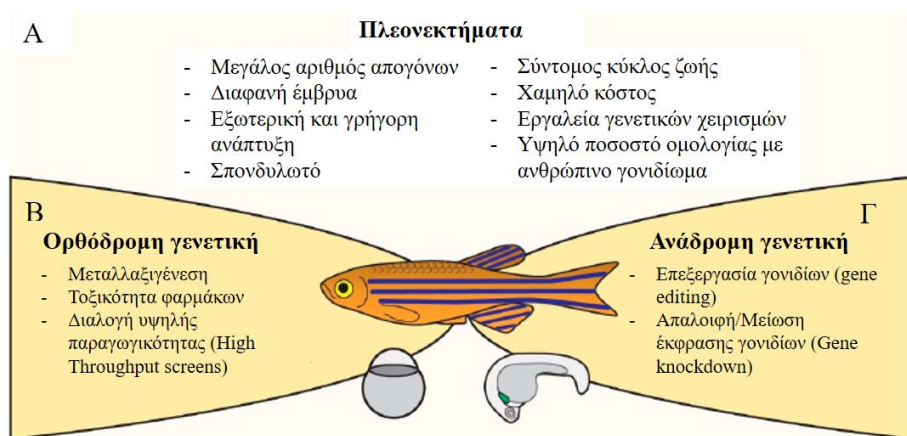
- Τα zebrafish λόγω της ανθεκτικότητας και του μικρού μεγέθους τους διατηρούνται εύκολα και με σχετικά χαμηλό κόστος στο εργαστήριο σε σχέση με άλλα πειραματόζωα, καθώς μια μικρή εργαστηριακή εγκατάσταση ενυδρείου μπορεί να συντηρήσει περισσότερα από 1000 ζώα (Poon and Brand, 2013).
- Ο κύκλος ζωής είναι σύντομος αφού τα zebrafish ωριμάζουν σεξουαλικά μέσα σε τρεις με τέσσερις μήνες μετά τη γονιμοποίηση. Ένα μεμονωμένο ζεύγος

αναπαραγωγής μπορεί να παράγει εκατοντάδες αυγά εβδομαδιαίως, διευκολύνοντας γενετικές και στατιστικές αναλύσεις (Brown et al., 2016).

- Η ανάπτυξη των zebrafish είναι ταχεία και ο σχηματισμός των περισσότερων οργάνων ολοκληρώνεται τις πρώτες πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.
- Τα έμβρυα που προκύπτουν από την αναπαραγωγή των zebrafish αναπτύσσονται εκτός του σώματος του θηλυκού και είναι ουσιαστικά διαφανή. Αυτά τα χαρακτηριστικά επιτρέπουν μη επεμβατικούς πειραματικούς χειρισμούς, οι οποίοι σε συνδυασμό με τεχνικές ζωντανής απεικόνισης (live imaging) αποτελούν ένα ελκυστικό σύστημα μελέτης δυναμικών διεργασιών του εμβρύου, όπως οι κινήσεις γαστριδίωσης (Beis and Stainier, 2006). Επίσης, η εξωτερική ανάπτυξη διευκολύνει πειράματα μεταμοσχεύσεων, επιτρέποντας τη διερεύνηση ζητημάτων κυτταρικής αυτονομίας (Gut et al., 2017).
- Η αλληλουχία του γονιδιώματος του zebrafish έχει πλήρως αποκρυπτογραφηθεί και έχει υψηλό ποσοστό ομολογίας με το ανθρώπινο γονιδίωμα (Postlethwait et al., 1998). Εκτιμάται πως πάνω από το 70% των ανθρώπινων γονιδίων έχουν αντίστοιχα ορθόλογα γονίδια στο γονιδίωμα του zebrafish, με σημαντική ομολογία σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Συνεπώς, πολλά γονίδια που σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες συναντώνται στο zebrafish και οι μεταλλάξεις που ταυτοποιούνται σε ασθενείς μπορούν να μοντελοποιηθούν στο συγκεκριμένο πειραματόζωο (Barbazuk et al., 2000; Lam et al., 2006). Επιπρόσθετα, αρκετά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση ανθρώπινων ασθενειών έχουν παρόμοια αποτελέσματα στο zebrafish, εξαιτίας της υψηλής ομολογίας των πρωτεϊνών – στόχων (Milan et al., 2003).
- Τα έμβρυα μπορούν να εκτεθούν σε ουσίες και να γίνει απορρόφηση μικρομορίων και χημικών ενώσεων (φάρμακα, μεταλλαξιγόνα που έχουν διαλυθεί στο νερό) μέσω παθητικής διάχυσης από το μέσο στο οποίο αυτά αναπτύσσονται. Το χαρακτηριστικό αυτό, σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος, τον μεγάλο αριθμό απογόνων και την ευκολία παρατήρησης φαινοτύπου λόγω της διαφάνειας σώματος, καθιστά το zebrafish ιδανικό για γρήγορη, αξιόπιστη και χαμηλού κόστους χημική διαλογή (chemical screening) (Kaufman et al., 2009; MacRae and Peterson, 2003). Η χημική διαλογή χρησιμοποιείται σε μελέτες τοξικολογίας καθώς και στην ταυτοποίηση νέων μικρών μορίων που

εμπλέκονται σε ποικιλία ανθρώπινων ασθενειών και στην αναγέννηση (Bournele and Beis, 2016).

- Εξαιτίας της ευκολίας εφαρμογής γενετικών χειρισμών, προσεγγίσεις ορθόδρομης (forward) και ανάδρομης (reverse) γενετικής ανάλυσης έχουν επιτυχώς εφαρμοστεί στο zebrafish για την ταυτοποίηση νέων σηματοδοτικών μονοπατιών και τη μελέτη της γονιδιακής λειτουργίας (Bournele and Beis, 2016). Ως ορθόδρομη γενετική ανάλυση χαρακτηρίζεται η προσπάθεια προσδιορισμού της γενετικής βάσης που είναι υπεύθυνη για έναν συγκεκριμένο φαινότυπο (Εικόνα 1.2B). Η αντίθετη προσέγγιση, δηλαδή η διερεύνηση του φαινοτύπου ενός ήδη γνωστού γονιδίου, ονομάζεται αντίστροφη γενετική ανάλυση (Beis and Stainier, 2006) (Εικόνα 1.2Γ).

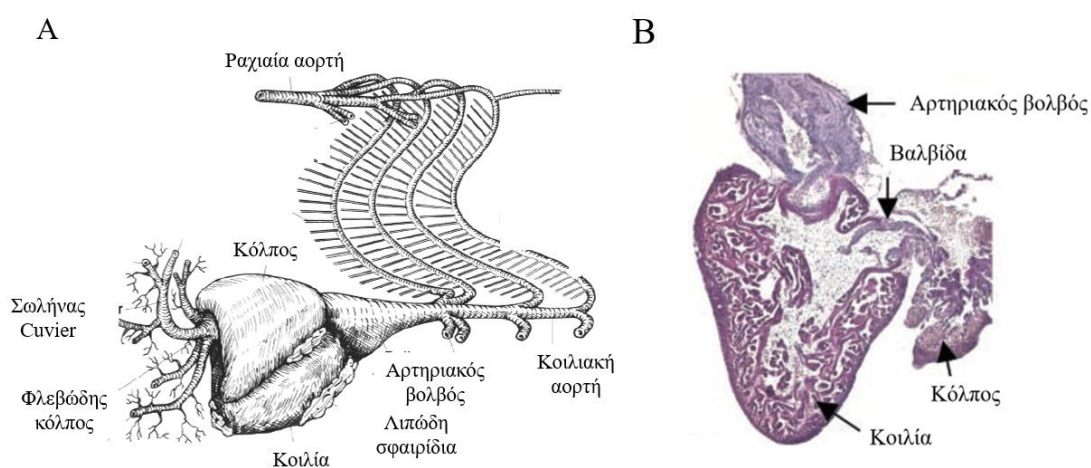


Εικόνα 1.2: Το ζωικό μοντέλο zebrafish. Σχηματική αναπαράσταση Α. των πλεονεκτημάτων του zebrafish ως πειραματόζωο και των προσεγγίσεων Β. της ορθόδρομης γενετικής και Γ. της ανάδρομης γενετικής ανάλυσης για τη μελέτη ασθενειών. Ανατύπωση (Brown et al., 2016)

1.1.5 Το zebrafish ως μοντέλο μελέτης του Καρδιαγγειακού συστήματος

Η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που ξεκινά να λειτουργεί στο αναπτυσσόμενο έμβρυο του zebrafish, μόλις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση του. Μορφολογικά, αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα, το μυοκάρδιο και ένα εσωτερικό στρώμα ενδοκαρδιακών κυττάρων. Ο διαχωρισμός των δύο ιστών πραγματοποιείται από ένα εκτενές εξωκυτταρικό στρώμα θεμέλιας ουσίας που καλείται καρδιακή γέλη (Armstrong and Bischoff, 2004). Στο zebrafish η καρδιά εντοπίζεται στον περικαρδιακό σάκο μπροστά από την κοιλότητα του κυρίως κορμού και κοιλιακά σε

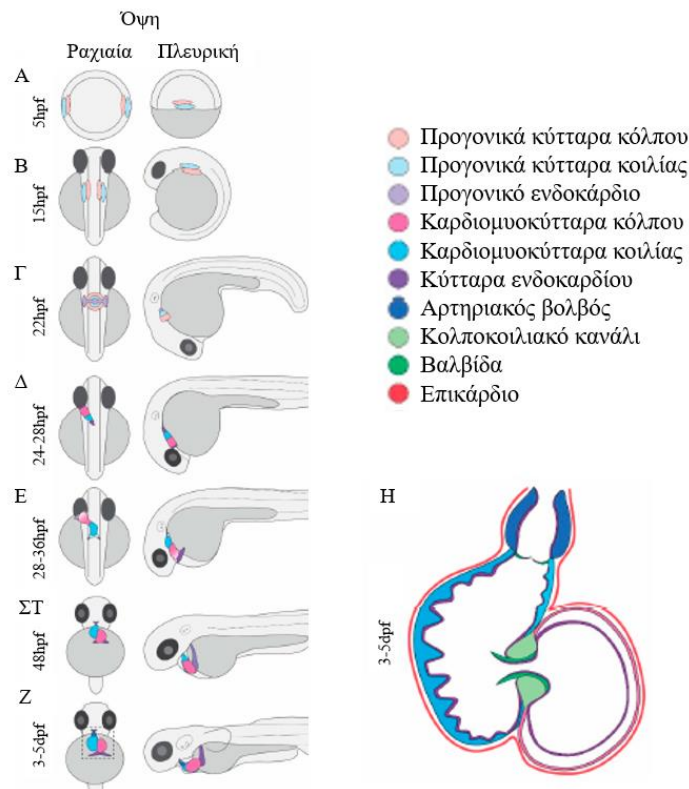
σχέση με τον οισοφάγο. Πιο συγκεκριμένα τοποθετείται ανάμεσα στο βραγχιακό επικάλυμμα και στο οστό του θωρακικού περυγίου. Το μη-οξυγονωμένο αίμα εισέρχεται στην καρδιά μέσω του φλεβώδους κόλπου (sinus venosus), τα τοιχώματα του οποίου είναι λεπτά και αποτελούνται κυρίως από συνδετικό ιστό. Ο φλεβώδης κόλπος συνδέεται με το σωλήνα Cuvier (Cuvier duct), ένα ζεύγος αγγείων ομόλογο με την άνω και κάτω κοίλη φλέβα των ανώτερων σπονδυλωτών. Στη συνέχεια, το αίμα εισέρχεται μέσω της φλεβοκολπικής βαλβίδας στον κόλπο. Η σύσπαση του κόλπου και η διαστολή της κοιλίας ωθούν το αίμα στην κοιλία μέσω της κολποκοιλιακής βαλβίδας (atrioventricular valve – AV valve). Η κοιλία διαθέτει ένα πολύ παχύ τοίχωμα σε σχέση με τον κόλπο, το οποίο αποτελείται από δύο στιβάδες, μια εξωτερική μυϊκή στιβάδα και μια εσωτερική σπογγώδη στιβάδα. Η σύσπαση της κοιλίας δημιουργεί σχετικά υψηλή πίεση, με αποτέλεσμα το αίμα να αντλείται στον αρτηριακό βολβό (bulbus arteriosus) μέσω της αορτικής βαλβίδας που ενώνει τις δύο περιοχές (bulbus ventricular valve, BV valve). Ο αρτηριακός βολβός αποτελείται από μία εσωτερική στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία περιβάλλονται από ένα παχύ στρώμα λείων μυϊκών ινών. Εξαιτίας της ελαστικότητας του, μπορεί να εκτείνεται σημαντικά επηρεάζοντας την πίεση του κοιλιακού παλμού. Τέλος, από την καρδιά το αίμα διανέμεται στα βράγχια για οξυγόνωση από την κοιλιακή αορτή μέσω των βραγχιακών αρτηριών, οι οποίες επανασυνδέονται για να σχηματίσουν την ραχιαία αορτή (Hu et al., 2001; Poon and Brand, 2013) (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Αναπαράσταση της καρδιάς ενήλικου zebrafish. Α. Σχηματική αναπαράσταση της καρδιάς ενήλικου zebrafish και της κυκλοφορίας αίματος στην καρδιακή περιοχή. Ανατύπωση (Hu et al., 2001). Β. Ιστολογική τομή καρδιάς ενήλικου zebrafish όπου διακρίνονται οι δύο θάλαμοι της καρδιάς- κόλπος, κοιλία - καθώς επίσης και η κολποκοιλιακή βαλβίδα και ο αρτηριακός βολβός. Ανατύπωση (Poss et al., 2002).

Όταν η καρδιά του zebrafish ξεκινά να συστέλλεται περίπου στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, αποτελείται από τρεις κυτταρικούς τύπους: τα καρδιομυοκύτταρα του κόλπου (atrial cardiomyocytes, CMs), τα κοιλιακά CMs (ventricular CMs), και τα κύτταρα ενδοκαρδίου. Αυτοί οι διαφοροποιημένοι κυτταρικοί τύποι προέρχονται από καρδιακά προγονικά κύτταρα (CPCs) που εντοπίζονται στην πλευρική περιφερειακή ζώνη εκατέρωθεν του εμβρύου πριν την έναρξη της γαστριδίωσης, στις 5hpf (Stainier et al., 1993) (Εικόνα 1.4A). Στο στάδιο των 12-15 σωματιών (15hpf), τα προγονικά κύτταρα τοποθετούνται σε αμφίπλευρες περιοχές στο μεσόδερμα της πρόσθιας πλευρικής πλάκας (anterior lateral plate mesoderm, ALPM) (Εικόνα 1.4B). Στη συνέχεια, αυτά τα πλευρικά CPCs ξεκινούν να διαφοροποιούνται και συγχωνεύονται σχηματίζοντας έναν δίσκο ενδοκαρδιακών κυττάρων κεντρικά ο οποίος περιβάλλεται από καρδιομυοκύτταρα του κόλπου και της κοιλίας (Εικόνα 1.4Γ). Ο δίσκος επιμηκύνεται σε γραμμικό σωλήνα με διακριτά προφίλ έκφρασης για τα CMs κόλπου, τα CMs κοιλίας και τα ενδοκαρδιακά κύτταρα (Εικόνα 1.4Δ) (Brown et al., 2016).

Ο καρδιακός σωλήνας συντίθεται από κύτταρα του πρώτου καρδιακού πεδίου (First heart field, FHF). Επιπρόσθετα καρδιακά κύτταρα στρατολογούνται στον καρδιακό σωλήνα με ένα δεύτερο κύμα διαφοροποίησης καθώς αργά διαφοροποιημένοι CPC πληθυσμοί που ονομάζονται δεύτερο καρδιακό πεδίο (Second heart field, SHF) εκτείνουν τη γραμμική καρδιά στους αρτηριακούς και φλεβικούς πόλους περίπου στις 28hpf. Ταυτόχρονα με τη προσθήκη των SHF προερχόμενων κυττάρων, ο γραμμικός καρδιακός σωλήνας μετακινείται προς τα αριστερά και ξεκινά την συστροφή (looping) (Εικόνα 1.4E). Στις 48hpf, η συστρεφόμενη καρδιά έχει τοποθετηθεί στην περικαρδιακή κοιλότητα και είναι ξεκάθαρα διαχωρισμένη σε δύο θαλάμους μέσω της συστολής του κολλοκοιλιακού καναλιού (Εικόνα 1.4ΣΤ). Οι θάλαμοι διακρίνονται από το σχηματισμό εσωτερικής και εξωτερικής καμπυλότητας (inner – outer curvature) και αποκτούν τη μορφή φασολιού με μια διαδικασία που ονομάζεται διόγκωση θαλάμων (chamber ballooning) (Bakkers, 2011). Παρόλο που τα κύρια συστατικά της καρδιάς έχουν σχηματιστεί στις 48hpf, λείπουν βοηθητικοί κυτταρικοί τύποι και επιπρόσθετες δομές ιδιαίτερα σημαντικές για τη λειτουργία της καρδιάς στον αναπτυσσόμενο οργανισμό, όπως ο αρτηριακός βολβός, οι βαλβίδες, μυοκαρδιακές δοκίδες (trabeculae) και το επικάρδιο. Οι παραπάνω δομές είναι ευδιάκριτες σε zebrafish στις 3-5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (Brown et al., 2016) (Εικόνα 1.4Z-H).



Εικόνα 1.4: Στάδια ανάπτυξης της καρδιάς στο zebrafish. Ανατύπωση (Brown et al., 2016)

Εκτός από την απλή δομή και την ταχεία ανάπτυξη της καρδιάς, το zebrafish διαθέτει επιπρόσθετα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης και των ασθενειών του Καρδιαγγειακού συστήματος (Brown et al., 2016):

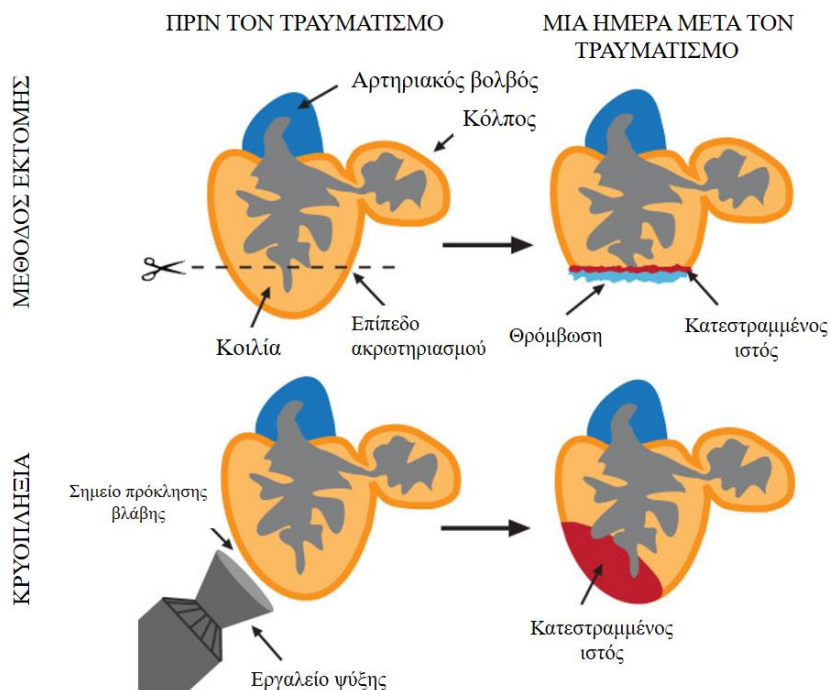
- Η εξωτερική ανάπτυξη διαφανών εμβρύων επιτρέπει την άμεση και μη επεμβατική παρατήρηση της μορφολογίας και της διαδικασίας της ανάπτυξης της καρδιάς σε πραγματικό χρόνο. Αυτή η οπτική διαπερατότητα μπορεί επίσης να αξιοποιηθεί με τη δημιουργία διαγονιδιακών zebrafish στα οποία τα καρδιακά κύτταρα σημαίνονται με δείκτες φθορισμού.
- Τα έμβρυα του zebrafish στην αρχική φάση της ανάπτυξης τους δε βασίζονται στο καρδιαγγειακό τους σύστημα για την κάλυψη των αναγκών τους σε οξυγόνο, καθώς λόγω του μικρού τους μεγέθους έχουν την δυνατότητα να λαμβάνουν οξυγόνο από το νερό που τα περιβάλλει μέσω διάχυσης. Επομένως, τα γενετικά τροποποιημένα zebrafish με καρδιακούς φαινοτύπους συνήθως επιβιώνουν και αναπτύσσονται για διάστημα έως 7 ημέρες επιτρέποντας τη λεπτομερή ανάλυση φαινοτύπων, που σε άλλες περιπτώσεις θα ήταν αδύνατη καθώς θα επέφεραν θνησιμότητα (όπως στο ποντίκι).

- Ενώ η καρδιά του zebrafish είναι απλούστερη δομικά από εκείνη των θηλαστικών διαθέτοντας δύο θαλάμους αντί για τέσσερις, οι βασικές δομές της είναι ανάλογες με τις συνιστώσες της καρδιάς του ανθρώπου και χρησιμοποιεί παρόμοιες κυτταρικές και μοριακές στρατηγικές για τη συναρμολόγηση της. Επιπλέον έχει βρεθεί 82% συντηρητικότητα ανάμεσα σε ορθόλογα γονίδια του zebrafish και γονίδια του ανθρώπου που σχετίζονται με καρδιαγγειακά νοσήματα.
- Ο καρδιακός ρυθμός των εμβρύων zebrafish είναι ίσος με 120-180 κτύπους ανά λεπτό και προσεγγίζει τον ανθρώπινο καρδιακό ρυθμό, σε αντίθεση με το ποντίκι (300 κτύποι ανά λεπτό) (Baker et al., 1997).
- Στο ζωικό μοντέλο zebrafish διατίθεται πληθώρα γενετικών μεταλλάξεων και φαινοτύπων του καρδιαγγειακού συστήματος που επιτρέπουν την εκτενή μελέτη της διαμόρφωσης και της λειτουργίας του κατά την εμβρυογένεση. Παραδείγματα τέτοιων γενετικά τροποποιημένων σειρών αποτελούν οι μεταλλάξεις πλήρους έλλειψης ενδοκαρδίου *cloche* και μη παλλόμενης καρδιάς *silent heart* (Sehnert et al., 2002; Stainier et al., 1995).

1.2 Αναγέννηση του μυοκαρδίου στο zebrafish

Το zebrafish έχει την ικανότητα να αναγεννά τόσο σε εμβρυικά όσο και σε ενήλικα στάδια πολλά όργανα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένης και της καρδιάς (Gemberling et al., 2013). Η αναγέννηση, δηλαδή η ικανότητα αποκατάστασης μη λειτουργικών οργάνων και τμημάτων σώματος μετά από ακρωτηριασμό ή τραυματισμό, αποτελεί ένα από τα πιο εντυπωσιακά και λιγότερο κατανοητά θέματα της βιολογίας και δεν συναντάται σε όλα τα είδη στον ίδιο βαθμό. Ειδικότερα για την καρδιακή αναγέννηση, τα καρδιομυοκύτταρα στον άνθρωπο και στο ποντίκι πολλαπλασιάζονται κατά την ανάπτυξη της καρδιάς *in utero* και στα πρώιμα στάδια μετά τη γέννηση (Cahill et al., 2017). Ωστόσο, αυτή η ιδιότητα χάνεται στη πορεία της ανάπτυξης με αποτέλεσμα τα ώριμα καρδιομυοκύτταρα να έχουν πολύ χαμηλό αναγεννητικό δυναμικό μετά από βλάβη του μυοκαρδίου κατά την ενηλικίωση (Bergmann et al., 2009; Senyo et al., 2013). Συνεπώς, το zebrafish καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο σπονδυλωτό μοντέλο μελέτης των μοριακών μηχανισμών της αναγεννητικής διαδικασίας, με απώτερο σκοπό τη διατήρηση της ικανότητας αναγέννησης στα θηλαστικά κατά τη νεογνική ηλικία και την ενηλικίωση και κατ' επέκταση στον άνθρωπο.

Σε αρκετές μελέτες της καρδιακής αναγέννησης στο zebrafish έχει αξιοποιηθεί η μέθοδος της εκτομής κατά την οποία αφαιρείται ~20% της κοιλίας και επάγεται μια συγκεκριμένη σειρά γεγονότων αναγεννητικής απόκρισης. Αρχικά, σχηματίζεται ένας θρόμβος αίματος στην περιοχή του τραυματισμού ώστε να περιοριστεί η αιμορραγία. Σε 2-3 μέρες μετά τον ακρωτηριασμό, ο θρόμβος αίματος αντικαθίσταται με ινώδη συστατικά, ενώ μέσα σε 1-2 μήνες ο καρδιακός ιστός αναπληρώνεται πλήρως (Poss et al., 2002). Άλλος πειραματικός τρόπος επαγωγής της αναγέννησης της καρδιάς είναι η κρυοπληξία, όπου καρδιομυοκύτταρα υποβάλλονται σε νέκρωση με εφαρμογή ξηρού πάγου ή μέσω ειδικού εργαλείου που έχει υποστεί ψύξη σε υγρό άζωτο (Bournele and Beis, 2016; Schnabel et al., 2011). Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων είναι πως στην περίπτωση της κρυοπληξίας ο τραυματισμένος ιστός παραμένει στην καρδιά, αντιπροσωπεύοντας ένα παθολογικό χαρακτηριστικό του εμφράγματος μυοκαρδίου (Frangogiannis, 2006) (Εικόνα 1.5). Τέλος, εναλλακτική μέθοδο μελέτης της αναγέννησης αποτελεί η μη επεμβατική καταστροφή καρδιομυοκυττάρων με την αξιοποίηση και τον συνδυασμό χημικών και γενετικών εργαλείων (Curado et al., 2007), όπως του συστήματος NO₂ αναγωγάσης – Μετρονιδαζόλης και του συστήματος Gal4/UAS.

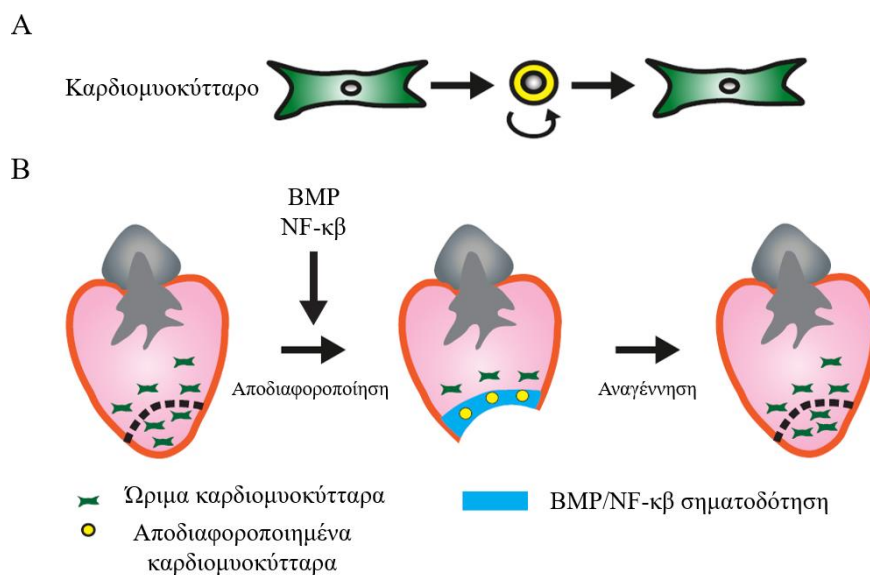


Εικόνα 1.5: Σύγκριση της μεθόδου εκτομής με την κρυοπληξία. Ανατύπωση (Chablais et al., 2011)

1.2.1 Μηχανισμός καρδιακής αναγέννησης

Τρία βασικά γεγονότα πραγματοποιούνται κατά την αναγέννηση της καρδιάς στο zebrafish (Bournele and Beis, 2016):

1. Το επικάρδιο ενεργοποιείται μέσω έκφρασης εμβρυικών δεικτών και συμβάλλει στην εκ νέου αγγειοποίηση του αναγεννώμενου καρδιακού ιστού. Κατά την διάρκεια των πρώτων ημερών μετά τον τραυματισμό, το επικάρδιο ξεκινά να πολλαπλασιάζεται και υφίσταται εκτενείς αλλαγές στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης, με πιο χαρακτηριστική την επαγωγή της έκφρασης του γονιδίου *raldh2*. Το γονίδιο αυτό εκφράζεται τυπικά κατά την εμβρυική ανάπτυξη του επικαρδίου και κωδικοποιεί ένα ένζυμο σύνθεσης ρετινοϊκού οξέος (retinoic acid, RA). Με τον πολλαπλασιασμό και την επέκταση του επικαρδίου δημιουργείται ένα επιθηλιακό κάλυμμα για το αναγεννώμενο μυοκάρδιο (Lepilina et al., 2006). Παράλληλα, μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του ρετινοϊκού οξέος τα συγκεκριμένα κύτταρα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων (Kikuchi et al., 2011). Επίσης, τα επικαρδιακά κύτταρα υπόκεινται σε μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), συμβάλλοντας στον σχηματισμό αγγείων στη περιοχή που έχει υποστεί βλάβη (Kim et al., 2010).
2. Καρδιομυοκύτταρα πολλαπλασιάζονται για να αναπληρώσουν τον χαμένο ιστό μυοκαρδίου. Μέσω γενετικών τεχνικών διαπιστώθηκε πως ο αναγεννώμενος καρδιακός ιστός διαμορφώνεται από προϋπάρχοντα καρδιομυοκύτταρα, τα οποία αποδιαφοροποιούνται και εισέρχονται εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο (Jorling et al., 2010) (Εικόνα 1.6A). Συγκεκριμένα, χάνουν ορισμένα χαρακτηριστικά κυτταρικής διαφοροποίησης και αποκτούν μια περισσότερο εμβρυική ταυτότητα, εκφράζοντας συγκεκριμένα γονίδια όπως το *gata4*, το οποίο χαρακτηρίζει την εμβρυική καρδιακή ανάπτυξη. Η έκφραση του γονιδίου αυτού φαίνεται πως ρυθμίζεται μέσω της NF-κβ σηματοδότησης (Karra et al., 2015). Η αποδιαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων δείχνει να εξαρτάται και από το σηματοδοτικό μονοπάτι των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (bone morphogenetic proteins – BMP), σύμφωνα με αποτελέσματα μελέτης του μεταγραφώματος (transcriptome) σε διαφορετικές περιοχές της αναγεννώμενης καρδιάς (tomo-seq) (Wu et al., 2016) (Εικόνα 1.6B).



Εικόνα 1.6: Ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης στην αναγέννηση. Α. Διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα αποδιαφοροποιούνται σε προγονικά κύτταρα με ικανότητα πολλαπλασιασμού, τα οποία στη συνέχεια επαναδιαφοροποιούνται στον ίδιο κυτταρικό τύπο από τον οποίο προήλθαν στον αναγεννώμενο καρδιακό ιστό. Β. Τα καρδιομυοκύτταρα που τοποθετούνται στο όριο της εκτομής σε ακρωτηριασμένες καρδιές αποδιαφοροποιούνται και εισέρχονται ξανά στον κυτταρικό κύκλο. Η διαδικασία αυτή προάγεται από τη BMP και NF-κβ σηματοδότηση. Το μέρος του μυοκαρδίου που χάθηκε αντικαθίσταται από επαναδιαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα. Ανατύπωση (Sehring et al., 2016).

3. Το ενδοκάρδιο ενεργοποιείται και επάγει τη σύνθεση ρετινοϊκού οξέος, υποστηρίζοντας τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων. Λίγες ώρες μετά τον τραυματισμό, όλο το ενδοκάρδιο υπόκειται σε μορφολογικές αλλαγές και ενεργοποιεί την έκφραση του γονιδίου *raldh2*. Η παρακρινής δράση του ρετινοϊκού οξέος από τα ενδοκαρδιακά αλλά και τα επικαρδιακά κύτταρα, όπως αναφέρθηκε, είναι καθοριστική για την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρδιομυοκυττάρων (Kikuchi et al., 2011).

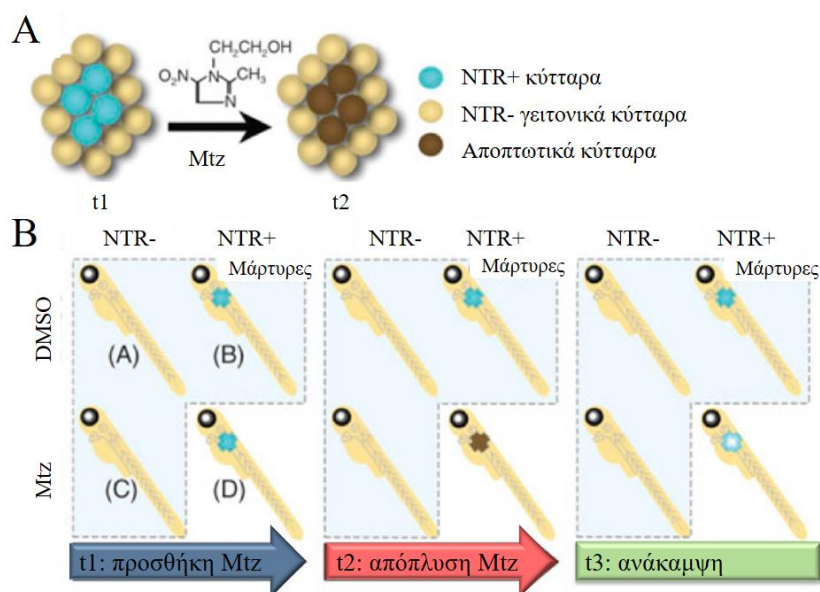
1.2.2 Σύστημα NO₂ αναγωγής – Μετρονιδαζόλης (NTR-Mtz)

Η στοχευμένη και υπό συνθήκες καταστροφή κυττάρων αποτελεί ένα αξιόλογο εργαλείο για τη μελέτη του ρόλου συγκεκριμένων κυτταρικών γενεαλογιών ή ιστών σε ποικίλες αναπτυξιακές ή φυσιολογικές διαδικασίες. Η ικανότητα γενετικής αφαίρεσης ορισμένων κυτταρικών πληθυσμών και παρακολούθησης χωρικά και χρονικά της ιστικής βλάβης έχει ευρεία εφαρμογή στη διερεύνηση της αναγέννησης (Curado et al., 2007). Ποικίλες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιούνται σε διαφορετικούς

οργανισμούς μοντέλα (Lewandoski, 2001; McGuire et al., 2004). Μια αποτελεσματική μέθοδος που εφαρμόζεται στο zebrafish εκμεταλλεύεται το σύστημα του βακτηρίου *Escherichia coli* NO₂ αναγωγής – Μετρονιδαζόλης (Nitroreductase – Metronidazole system, NTR-Mtz) για την επιλεκτική καταστροφή κυττάρων με γενετικά επαγόμενο τρόπο (Curado et al., 2008).

Το σύστημα NTR-Mtz βασίζεται στην μεσολαβούμενη από την NTR μετατροπή της αρχικά αβλαβούς μετρονιδαζόλης, από την οποία παράγεται ένα κυτταροτοξικό προϊόν. Το ένζυμο NTR, το οποίο κωδικοποιείται από το βακτηριακό γονίδιο *nfsB*, ανάγεται αρχικά από το νικοτιναμίδιο – αδενο – δινουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) ή το φωσφορικό νικοτιναμίδιο – αδενο – δινουκλεοτίδιο (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) και η Mtz δεσμεύεται και μεταβολίζεται από την NTR, δημιουργώντας έναν παράγοντα που προκαλεί προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η τοξικότητα του προϊόντος αυτού αποδίδεται στη δημιουργία διασυνδέσεων (cross-linking) μεταξύ των αλυσίδων του DNA (Anlezark et al., 1992; Edwards, 1993). Πρέπει να αναφερθεί πως η παραγόμενη κυτοτοξίνη δρα αποκλειστικά στα κύτταρα από τα οποία προήλθε, δηλαδή στα NTR θετικά κύτταρα.

Για τον έλεγχο και τη μελέτη της επίδρασης της στοχευμένης καταστροφής κυττάρων με τη χρήση του συστήματος NTR-Mtz στο zebrafish, δημιουργούνται διαγονιδιακές σειρές που εκφράζουν μία πρωτεΐνη σύντηξης που αποτελείται από την NTR και μια φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα – στόχους (Εικόνα 1.7), είτε μέσω κλωνοποίησης με ιστοειδικό υποκινητή είτε με την εκμετάλλευση άλλων γενετικών εργαλείων όπως το σύστημα Gal4-UAS (Halpern et al., 2008). Αξιοποιώντας λοιπόν διαγονιδιακές στρατηγικές, το σύστημα NTR-Mtz έχει χρησιμοποιηθεί για την επιλεκτική μείωση πολλαπλών κυτταρικών τύπων στο zebrafish συμπεριλαμβανομένων των β-παγκρεατικών κυττάρων (Curado et al., 2007; Pisharath et al., 2007), των καρδιομυοκυττάρων (Curado et al., 2007), των ηπατοκυττάρων (Curado et al., 2007) και των μακροφάγων (Li et al., 2012).

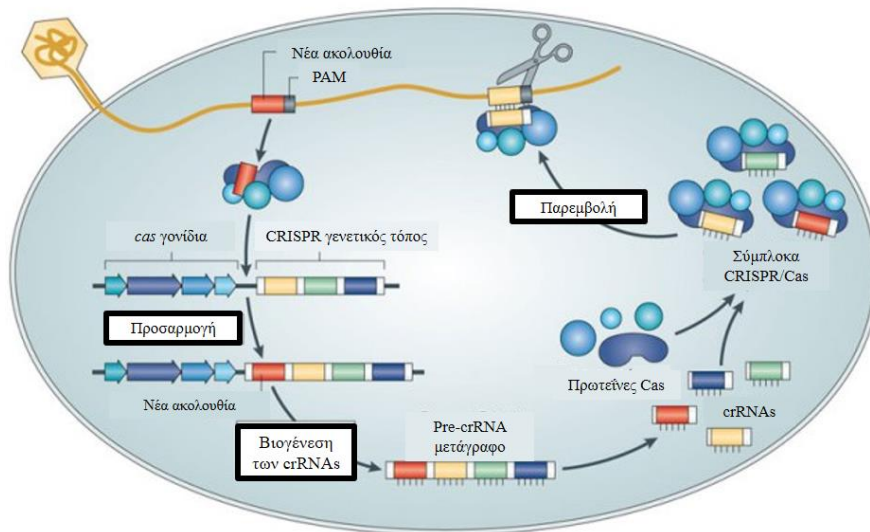


Εικόνα 1.7: Το σύστημα NO₂ αναγωγής – Μετρονιδαζόλης και εφαρμογή σε έμβρυα/προνύμφες zebrafish. A. Η συνδυασμένη με φθορίζουσα πρωτεΐνη NTR εκφράζεται σε έναν ορισμένο πληθυσμό κυττάρων (μπλε) κατά την έναρξη της επιλεγμένης κυτταρικής καταστροφής (χρονική στιγμή t1). Η μετρονιδαζόλη (Mtz), διαλυμένη σε DMSO, προστίθεται στο νερό και μετατρέπεται σε μία κυτοτοξίνη με τη δράση της NTR, η οποία προκαλεί απόπτωση των NTR θετικών κυττάρων (καφέ), αλλά όχι των γειτονικών κυττάρων (χρονική στιγμή t2). B. Τα δείγματα χωρίζονται σε τέσσερις ομάδες για κάθε πείραμα: προσθήκη DMSO σε (α) NTR- και (β) NTR + έμβρυα / προνύμφες και προσθήκη Mtz σε (γ) NTR- έμβρυα / προνύμφες για να ελεγχθούν για μη ειδικές επιδράσεις της Mtz ή του διαγονιδίου και προσθήκη Mtz σε (δ) NTR+ έμβρυα / προνύμφες για εκτομή ιστού. Στην t1 χρονική στιγμή (προσθήκη Mtz), η συνδυασμένη NTR είναι ορατή στον ιστό που πρόκειται να αφαιρεθεί (μπλε) ενώ σε χρόνο t2 (απόπλυση της Mtz), τα NTR + κύτταρα έχουν θανατωθεί και απουσιάζουν (καφέ). Τη χρονική στιγμή t3 (κατά τη διάρκεια της ανάρρωσης μετά Mtz απόπλυση), νέα κύτταρα με συνδυασμένη NTR μπορούν να παραχθούν. Ανατύπωση (Curado et al., 2007).

1.3 Τεχνολογία Ομαδοποιημένων Μικρών Παλίνδρομων Επαναλήψεων (CRISPR)/Κασπάσης (Cas9)

Το σύστημα CRISPR/Cas9 αποτελεί την πιο σύγχρονη και καινοτόμο μέθοδο στοχευμένης γονιδιοματικής τροποποίησης ανάμεσα στις τεχνικές ανάδρομης γενετικής ανάλυσης. Το ενδογενές σύστημα CRISPR/Cas9 προέρχεται από προκαρυωτικούς οργανισμούς (ευβακτήρια και αρχαία) και παρέχει έναν μηχανισμό άμυνας έναντι της εισβολής φάγων και άλλων κινητών γενετικών στοιχείων. Οι παλίνδρομες επαναλήψεις του CRISPR γενετικού τόπου του μικροοργανισμού διαχωρίζονται από μικρές αλληλουχίες μη επαναλαμβανόμενου DNA (spacers) που αποκτώνται από το εισβάλλον νουκλειικό οξύ των πλασμιδίων ή των ιών με μια διαδικασία γνωστή ως προσαρμογή (adaptation). Η στοχοποίηση του ξενικού DNA

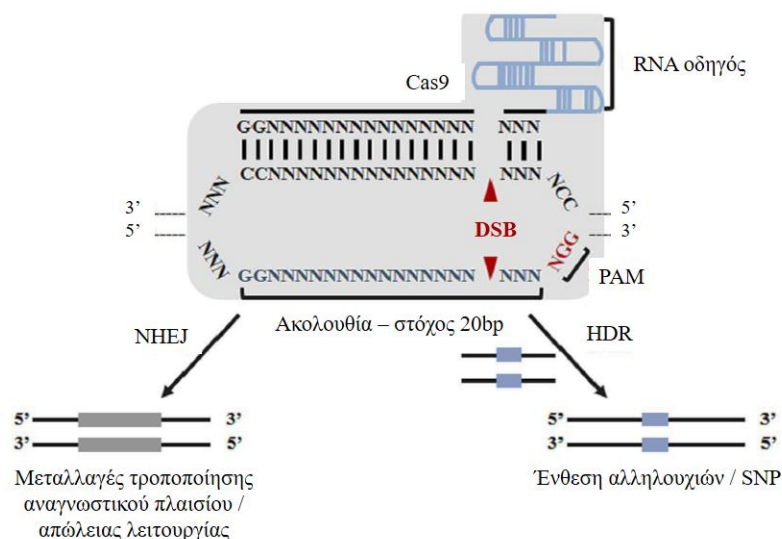
επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ενός μικρού συμπληρωματικού μονόκλωνου RNA (CRISPR relative RNA ή crRNA) που αναγνωρίζει την ακολουθία – στόχο. Το crRNA συμπλοκοποιείται με Cas DNA νουκλεάσες και οδηγεί στη διάσπαση και των δύο αλυσίδων του πλασμιδιακού ή ιικού DNA με έναν εξαρτώμενο από την αλληλουχία τρόπο, δημιουργώντας δίκλιωνα θραύσματα (Double-stranded breaks, DBS) (Blackburn et al., 2013; Samson et al., 2013) (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση του συστήματος CRISPR/Cas9 τύπου II ως αμυντικός μηχανισμός προκαρυωτικών οργανισμών. Το σύστημα CRISPR/Cas9 δρα με τρία διαφορετικά βήματα: α) προσαρμογή που περιλαμβάνει την ενσωμάτωση νέων ακολουθιών, στην προκειμένη περίπτωση, ενός φάγου, β) βιογένεση του crRNA το οποίο κωδικοποιείται από τον CRISPR γενετικό τόπο και γ) παρεμβολή, όπου η κασπάση κόβει το εισβάλον νουκλεϊκό οξύ. Ανατύπωση (Samson et al., 2013)

Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωρισθεί τρία διαφορετικά βακτηριακά συστήματα CRISPR, τα οποία κατηγοριοποιούνται ως τύπου I, II και III. Η τεχνολογία γονιδιωματικής τροποποίησης που χρησιμοποιείται ευρέως στην έρευνα βασίζεται στον τύπο II και εν συντομία καλείται CRISPR. Το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II αποτελείται από δύο διακριτά συστατικά: το RNA-οδηγό (guide RNA ή gRNA) και τη νουκλεάση Κασπάση 9. Το gRNA αποτελεί προϊόν συγχώνευσης των ενδογενών βακτηριακών crRNA και trans-ενεργοποιού crRNA (Trans-activating crRNA, tracrRNA) και διαθέτει τόσο την ειδικότητα στόχευσης του crRNA στο 5' άκρο όσο και την ικανότητα αλληλεπίδρασης με την Cas9 του tracrRNA στο 3' άκρο του. Όταν το gRNA και η Cas9 εκφραστούν σε ένα κύτταρο η γονιδιωματική ακολουθία – στόχος μπορεί να υποστεί μετατροπή (Auer and Del Bene, 2014).

Μια κλασική εφαρμογή της CRISPR τεχνολογίας είναι η λειτουργική αποσιώπηση γονιδίων (gene knock-out). Για να επιτευχθεί αυτό, πρέπει να εισαχθεί η πρωτεΐνη Cas9 και το gRNA στα κύτταρα στόχους ώστε να αναγνωριστεί η αλληλουχία που πρόκειται να τροποποιηθεί. Το DNA – στόχος αποτελείται από μια ακολουθία 20 νουκλεοτιδίων και ένα γειτονικό μοτίβο PAM (Protospacer adjacent motif). Πρέπει να αναφερθεί πως η ύπαρξη του μοτίβου PAM πλησίον της γονιδιωματικής ακολουθίας - στόχου αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία ενός τέτοιου συστήματος. Το σύστημα τύπου II περιορίζεται, μέχρι σήμερα, στη στόχευση ακολουθιών τύπου N20NGG, όπου το NGG αποτελεί την ακολουθία PAM. Συνεχίζοντας, δύο επικράτειες ενδοουκλεάσης της Cas9 δημιουργούν δίκλωνο θραύσμα στη στοχευμένη αλληλουχία η οποία ακολούθως επιδιορθώνεται από το μηχανισμό μη ομόλογης ένωσης άκρων (non-homologous end-joining, NHEJ). Ο συγκεκριμένος μηχανισμός τείνει να προκαλεί ενθέσεις ή ελλείψεις βάσεων δημιουργώντας μεταλλαγές τροποποίησης αναγνωστικού πλαισίου και μεταλλαγές απώλειας λειτουργίας (Loss-of-function, LOF), καθώς είναι επιρρεπής σε σφάλματα επιδιόρθωσης. Εναλλακτικά, υπάρχει δυνατότητα εισαγωγής συγκεκριμένων αλληλουχιών σε περιοχές του γονιδιώματος μέσω της αξιοποίησης της CRISPR τεχνολογίας και του ενδογενούς επιδιορθωτικού μηχανισμού που βασίζεται στην ομολογία (homology – directed repair, HDR) (Blackburn et al., 2013; Liu et al., 2017) (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9: Απεικόνιση των συστατικών του συστήματος γενετικής τροποποίησης CSISPR/Cas9. Ο RNA-οδηγός αλληλοεπιδρά με την συμπληρωματική ακολουθία του DNA στόχου που συνορεύει με την αλληλουχία PAM και το σύμπλεγμα αναγνωρίζεται από την νουκλεάση Cas9. Το μοτίβο PAM είναι απαραίτητο για την ειδικότητα της ενεργότητας ενδοουκλεάσης της Cas9 έναντι του DNA στόχου. Ανατύπωση (Liu et al., 2017).

Είναι αναμφισβήτητο πως το σύστημα CRISPR/Cas9 διαφέρει σημαντικά από τις υπάρχουσες τεχνολογίες, δίνοντας νέα ώθηση στον προσδιορισμό της λειτουργίας γονιδίων με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία. Ωστόσο, κρίνεται αναγκαίο να αξιολογηθούν ορισμένες παράμετροι, παρά την ταχεία υιοθέτηση της συγκεκριμένης πλατφόρμας γενετικής τροποποίησης, όπως είναι ο περιορισμός της αλληλουχίας PAM, οι επιδράσεις εκτός στόχου (off-target effects), η ανικανότητα ελέγχου των μεταλλαγών που δημιουργούνται με τον μηχανισμό NHEJ (Gut et al., 2017), οι ενδογενείς μηχανισμοί επανακωδικοποίησης (recoding) κ.ο.κ.

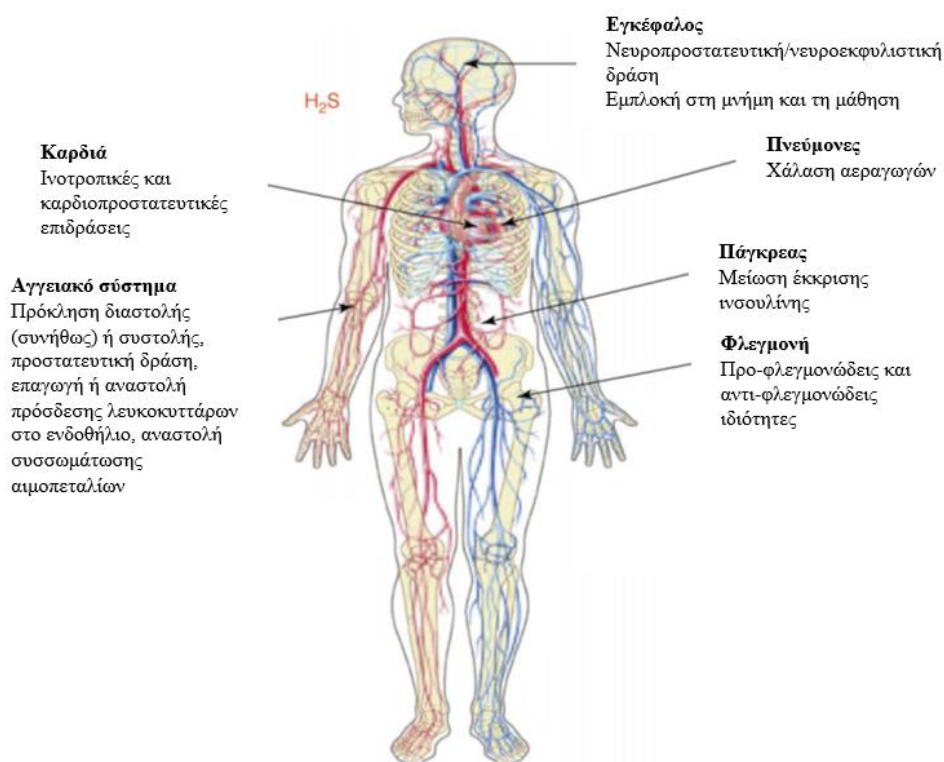
1.4 Το υδρόθειο (H₂S)

Το υδρόθειο (hydrogen sulfide, H₂S) είναι ένα άχρωμο, εύφλεκτο αέριο και αποτελεί περιβαλλοντικό ρύπο που παράγεται κυρίως από ηφαιστειακές αναθυμιάσεις, πετρέλαιο, φυσικό αέριο και συγκεκριμένες βιομηχανικές δραστηριότητες. Η χαρακτηριστική οσμή του υδρόθειου γίνεται αντιληπτή από τον άνθρωπο σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0.1-1ppm. Η έκθεση σε 50-100ppm υδρόθειου προκαλεί ερεθισμό των ματιών, του δέρματος και της αναπνευστικής οδού και επηρεάζει την λειτουργία του νευρικού και του καρδιαγγειακού συστήματος, ενώ συγκεντρώσεις άνω των 500ppm μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια των αισθήσεων και θάνατο. Η τοξικότητα του H₂S αποδίδεται στην ισχυρή, αναστρέψιμη αναστολή της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (cytochrome c, cyt c), εμποδίζοντας έτσι την οξειδωτική φωσφορύλιωση στα μιτοχόνδρια και κατ' επέκταση μειώνοντας την παραγωγή της τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP). Επιπρόσθετη επίδραση που συμβάλλει στην τοξικότητα του είναι η παρεμπόδιση της λειτουργίας άλλων ενζύμων, όπως της καρβονικής ανυδράσης, της Na⁺ / K⁺ -ATPάσης και της χοληνεστεράσης (Liu et al., 2012; Wang, 2012).

Το υδρόθειο αποτελεί ένα ασθενές οξύ, το οποίο εντός υδατικών διαλυμάτων ιοντίζεται σχηματίζοντας ανιόντα HS⁻, κατιόντα H⁺ και ανιόντα S²⁻, σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση: $H_2S \leftrightarrow H^+ + HS^- \leftrightarrow 2H + S^{2-}$. Σε υδατικά διαλύματα με φυσιολογικές συνθήκες (37°C, pH 7.4) το ανιόν HS⁻ είναι αυτό που συναντάται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση (81.5%) (Li and Moore, 2008), ενώ διαθέτει επίσης την ικανότητα να δεσμεύεται με μέταλλα (Hughes et al., 2009). Επιπλέον, μια σημαντική ιδιότητα του υδρόθειου είναι ο λιπόφιλος χαρακτήρας του. Διασπείρεται εύκολα στον

υδρόφοβο πυρήνα της διπλοστιβάδας των κυτταρικών μεμβρανών, όπως το O_2 και το CO_2 , με αποτέλεσμα να διαχέεται γρήγορα στο εσωτερικό των κυττάρων ή στον εξωκυττάριο χώρο (Mathai et al., 2009).

Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι το υδρόθειο συντίθεται από τους ζωντανούς οργανισμούς και έχει αναγνωριστεί ως ενδογενές σηματοδοτικό μόριο, που εμπλέκεται σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Η συγκέντρωση του H_2S στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 10-100 $\mu\text{mol/L}$ (Wang, 2012) και ο χρόνος ημιζωής του είναι μικρότερος των 30 λεπτών. Το H_2S αποτελεί το νεότερο μέλος στην οικογένεια των αέριων διαβιβαστών, μαζί με το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO), έχοντας ποικίλες βιολογικές επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό (Gadalla and Snyder, 2010) (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Βασικές βιολογικές επιδράσεις του ενδογενούς υδρόθειου στον ανθρώπινο οργανισμό. Ανατύπωση (Li and Moore, 2008)

1.4.1 Βιοσύνθεση του υδρόθειου

Στα θηλαστικά το υδρόθειο μπορεί να συντεθεί μέσω ενζυματικών και μη ενζυματικών οδών. Ωστόσο, η μη ενζυματική αναγωγή στοιχειακού θείου σε H_2S από την οξείδωση της γλυκόζης, των NADH, NADPH και γλουταθειόνης (Searcy and Lee,

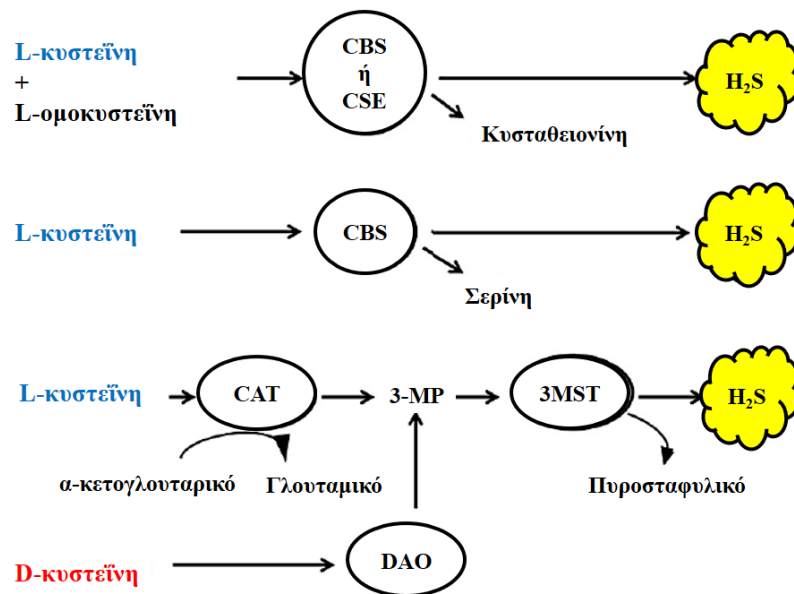
1998) συμμετέχει σε μικρό ποσοστό στη συνολική ενδογενή παραγωγή υδρόθειου (Wang, 2012). Όσον αφορά την ενζυματική βιοσύνθεση του υδρόθειου πραγματοποιείται μέσω της δράσης τριών ενζύμων: της β-συνθετάσης της κυσταθειονίνης (cystathionine β synthase, CBS), της γ-λυάσης της κυσταθειονίνης (cystathionine γ lyase, CSE) και της θειομεταφοράσης του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (3-mercaptopyruvate sulphurtransferase, 3-MST) (Olas, 2015).

Η CBS, η οποία είναι το κύριο ένζυμο παραγωγής υδρόθειου στο νευρικό σύστημα, και η CSE που βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ, τα νεφρά και τα αγγεία, χρησιμοποιούν ως υποστρώματα τα αμινοξέα L-κυστεΐνη και L-ομοκυστεΐνη και απαραίτητο συνένζυμο για τη λειτουργία τους είναι η 5-φωσφορική πυριδοξάλη (pyridoxal 5-phosphate, PLP) ή αλλιώς βιταμίνη B₆ (Kimura, 2011). Η 3-MST μετατρέπει το 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό (3-mercaptopyruvate, 3-MP) σε H₂S και πυροσταφυλικό και απαιτεί για τη δράση του ψευδάργυρο (Zn) (Shibuya et al., 2009a). Το υπόστρωμα της 3MST, το 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό (3-MP), προκύπτει μέσω μετατροπής της L-κυστεΐνης από το ένζυμο αμινομεταφοράση της κυστεΐνης (cysteine aminotransferase, CAT) παρουσία α-κετογλουταρικού. Παρόλο που το ένζυμο 3MST αυτό καθ' αυτό δεν χρειάζεται την φωσφορική πυριδοξάλη για την ενεργότητα του, η βιοσύνθεση του μερκαπτοπυροσταφυλικού από την CAT αποτελεί μια PLP-εξαρτώμενη αντίδραση (Wang, 2012).

Σε πρόσφατες μελέτες αναφέρεται πως και η D-κυστεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για την ενδογενή παραγωγή υδρόθειου, καθώς μεταβολίζεται από την οξειδάση D-αμινοξέων (D-amino acid oxidase, DAO) σε 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό. Το μονοπάτι αυτό λειτουργεί κυρίως στον εγκέφαλο (ιδιαίτερα στην παρεγκεφαλίδα) και στα νεφρά. Συγκεκριμένα στα νεφρά, έχει δειχθεί πως η D-κυστεΐνη χρησιμοποιείται 80 φορές περισσότερο από την L-κυστεΐνη για την παραγωγή H₂S (Kimura, 2014a; Shibuya et al., 2013).

Σημειώνεται ότι το υδρόθειο από τη στιγμή που θα παραχθεί μπορεί είτε να δράσει άμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με διάφορα μόρια σηματοδότησης, είτε να αποθηκευτεί ως «δεσμευμένο θείο» δημιουργώντας ενδοκυτταρικές αποθήκες θείου, οι οποίες μπορούν να το ελευθερώσουν υπό ορισμένες μόνο συνθήκες.

Οι κυριότερες οδοί που συμμετέχουν στην ενδογενή βιοσύνθεση H_2S συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 1.11: Μονοπάτια ενδογενούς παραγωγής υδρόθειου με αρχικά υποστρώματα την L- και την D-κυστεΐνη. Ανατύπωση (Kimura, 2013).

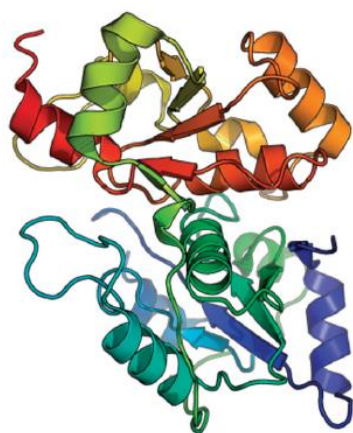
1.4.2 Θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (3-MST)

Το ένζυμο 3-MST εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στον εγκέφαλο και στο ήπαρ, καθώς επίσης και στους νεφρούς, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στον θύμο, στη θωρακική αορτή, στα λεία μυϊκά κύτταρα και στο ενδοθήλιο της αορτής, όπου εντοπίζεται επίσης και το ένζυμο CAT (Nagahara et al., 1998; Shibuya et al., 2009b, 2009a). Σε κυτταρικό επίπεδο η 3-MST συναντάται στο κυτοσόλιο και στα μιτοχόνδρια, σε αντίθεση με την CBS και CSE που είναι μόνο κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (Kimura, 2014b). Λαμβάνοντας υπόψιν πως η συγκέντρωση της κυστεΐνης στο κυτταρόπλασμα είναι 0.15-0.25mM και στα μιτοχόνδρια είναι 0.7-0.99mM, είναι πολύ πιθανό ότι το μεγαλύτερο ποσοστό υδρόθειου που παράγεται μέσω του 3MST/CAT μονοπατιού προέρχεται από τα μιτοχόνδρια (Kimura, 2014a). Το ανθρώπινο γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την έκφραση του 3-MST εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 22 (22q12.3) (Wang, 2012).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το 3MST απαιτεί ψευδάργυρο για τη δράση του και μπορεί να παράγει H_2S με τη συζευγμένη δράση του PLP- εξαρτώμενου ενζύμου CAT

ή του ενζύμου DAO από L-κυστεΐνη ή D-κυστεΐνη αντίστοιχα. Σε κάθε περίπτωση, η κυστεΐνη μετατρέπεται σε 3-μερκαπτοπυροσταφυλικό οξύ και στη συνέχεια, το 3-MST μεταφέρει το θείο από το 3-MP σχηματίζοντας ενώσεις που περιέχουν είτε θείο, είτε στοιχειακό θείο. Στην πρώτη περίπτωση, μέσω των ενζύμων θειοθειική θειομεταφοράση (thiosulfate sulfurtransferase) ή θειοθειική αναγωγάση (thiosulfate reductase) παράγεται H₂S. Στη δεύτερη περίπτωση, από το στοιχειακό θείο μέσω αναγωγικών παραγόντων προκύπτει και πάλι H₂S (Wang, 2012), ωστόσο αυτό δεν είναι στην ελεύθερη μορφή του, αλλά δεσμευμένο σε ανηγμένη μορφή (Kabil and Banerjee, 2010).

Η ιδιότητα μεταφοράς θείου του ενζύμου 3-MST ενισχύεται με τα ενδογενώς παραγόμενα μόρια διϋδρολιποϊκό οξύ (dihydrolipoic acid, DHLA) και θειορεδοξίνη (thioredoxin) (Kimura, 2014a) και είναι παρόμοια με αυτή του ενζύμου ροδανάση (rhodanese). Η ροδανάση καταλύει την παραγωγή H₂S και H₂SO₃ μέσω της αλληλεπίδρασης S₂O₃²⁻ και γλουταθειόνης. Το 3-MST έχει υψηλή ομολογία (~60% ταύτιση αμινοξικής ακολουθίας) και παρόμοια δομή με τη ροδανάση, η οποία επίσης συναντάται στα μιτοχόνδρια (Kimura, 2014b; Wang, 2012). Μαζί με τη ροδανάση, το 3-MST συμβάλλει επιπρόσθετα στο βασικό μονοπάτι εξάλειψης του κυανιδίου (cyanide) μέσω μετατροπής του σε λιγότερο τοξικές ενώσεις θειοκυανικού (thiocyanate) (Nagahara et al., 1999). Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου 3-MST απεικονίζεται παρακάτω:



Εικόνα 1.12: Δομή της ανθρώπινης θειομεταφοράσης του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού. Αποτελείται από δύο αλυσίδες, A και B (κωδικός PDB: 3OLH). Πηγή (Wang, 2012).

1.4.3 Η ανθρώπινη ασθένεια MCDU

Η ανθρώπινη ασθένεια MCDU (mercaptolactate – cysteine disulfiduria) ή σύνδρομο Ampola (Ampola syndrome) αναγνωρίστηκε για πρώτη φορά και αναφέρθηκε το 1968 ως μια κληρονομική μεταβολική διαταραχή που προκαλείται από συγγενή ανεπάρκεια ή έλλειψη του ενζύμου 3-MST. Πρόκειται για μια σπάνια γενετική νόσο η οποία φαίνεται πως κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (Hannestad et al., 1981) και στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με μη φυσιολογική συμπεριφορά, νοητική καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και ψυχικές διαταραχές. Η παθογένεση της συγκεκριμένης νόσου παραμένει άγνωστη (Ampola et al., 1969; Crawhall et al., 1968; Nagahara et al., 2013).

Ομάδα ερευνητών πραγματοποίησε αποσιώπηση του ορθόλογου γονιδίου του 3-MST σε ποντίκια (3-MST knockout ποντίκια). Τα μεταλλαγμένα αυτά ποντίκια εμφανίζουν αυξημένο άγχος που εκδηλώνεται μέσω της συμπεριφοράς τους, καθώς και δυσλειτουργία του εγκεφάλου που σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα σεροτονίνης σε αυτόν. Ωστόσο δεν εμφανίζουν μη φυσιολογική μορφολογία εγκεφάλου. Τα 3-MST knockout ποντίκια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοντέλο μελέτης της διαταραχής MCDU. Το 3-MST λειτουργεί ως αντιοξειδωτική πρωτεΐνη, διατηρεί την κυτταρική οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και μπορεί να παράγει H_2S ή HS^- καθώς και οξειδία θείου (SO_x). Επομένως οι συμπεριφορικές ανωμαλίες που παρουσιάζουν τα 3-MST knockout ποντίκια πιθανόν προκαλούνται από ανεπάρκεια των συγκεκριμένων δράσεων της πρωτεΐνης (Nagahara et al., 2013).

1.5 Η δράση του υδρόθειου στο Καρδιαγγειακό σύστημα

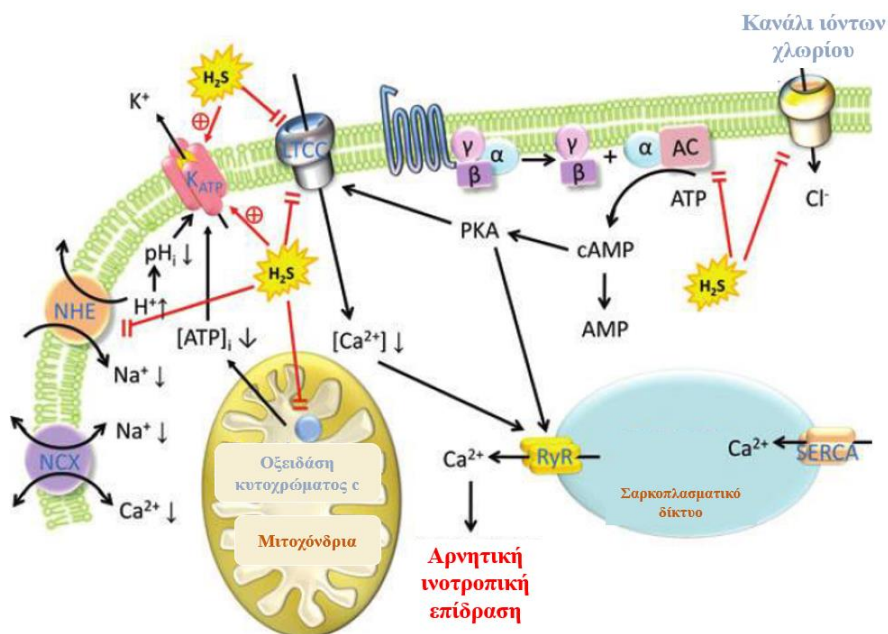
1.5.1 Επιδράσεις του H_2S στην καρδιά

Το υδρόθειο έχει αποδειχθεί με *in vitro* και με *in vivo* πειράματα πως επάγει αρνητικές ινοτροπικές επιδράσεις στην καρδιά (Geng et al., 2004). Οι βασικοί τρόποι με τους οποίους το H_2S επιτυγχάνει μείωση της δύναμης συστολής ή/και της απαιτούμενης ενέργειας για τις μυϊκές συσπάσεις είναι οι εξής (Εικόνα 1.13):

- Ενεργοποίηση καναλιών K^+ εξαρτώμενων από ATP (K_{ATP} channels) (Tang et al., 2005). Ο συγκεκριμένος τύπος καναλιού συναντάται στη σαρκελημματική, τη μιτοχονδριακή και την πυρηνική μεμβράνη των κυττάρων διαφόρων ιστών

και συμμετέχει στον έλεγχο του μεμβρανικού δυναμικού. Αναστέλλεται από το ενδοκυτταρικό ATP (Babenko et al., 1998).

- Ενδοκυτταρική ρύθμιση των επιπέδων ασβεστίου. Όταν η μεμβράνη των καρδιομυοκυττάρων λαμβάνει ένα δυναμικό ενέργειας, η εκπόλωση του σαρκειλήματος λόγω της άμεσης αύξησης της διαπερατότητας σε Na^+ οδηγεί σε ενεργοποίηση των μεμβρανικών καναλιών ασβεστίου L-τύπου (L-type Ca^{2+} channels, LTCC), έχοντας ως αποτέλεσμα την είσοδο ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα. Η αύξηση της συγκέντρωσης Ca^{2+} μέσα στο καρδιακό μυϊκό κύτταρο, επάγει την έξοδο και άλλου ασβεστίου από το σαρκοπλασματικό δίκτυο (ΣΔ) μέσω ασβεστιοευαίσθητων υποδοχέων ρυανοδίνης (RyRs) το οποίο συμβάλλει στην εκδήλωση μηχανικής δραστηριότητας. Το υδρόθειο φαίνεται πως παρεμποδίζει την αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου αναστέλλοντας τη δράση των καναλιών LTCC (Sun et al., 2008). Η μείωση των Ca^{2+} από το υδρόθειο μπορεί επίσης να είναι αποτέλεσμα ενεργοποίησης καναλιών K_{ATP} (Calvert et al., 2010) ή αναστολής του μονοπατιού cAMP/πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) μέσω παρεμπόδισης της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης (AC) (Yong et al., 2008a).
- Αναστολή καναλιών ιόντων χλωρίου (Cl^-) (Malekova et al., 2009).
- Παρεμπόδιση της δράσης του φορέα ανταλλαγής Na^+/H^+ (Na^+/H^+ exchanger, NHE) (Hu et al., 2011). Το pH του κυτταροπλάσματος αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της καρδιακής λειτουργίας. Η αναστολή του συγκεκριμένου αντι-μεταφορέα έχει ως αποτέλεσμα την ενδοκυτταρική οξέωση, ενισχύοντας τη δράση των καναλιών K_{ATP} (Cuevas et al., 1991).



Εικόνα 1.13: Οι επιδράσεις του υδρόθειου στη φυσιολογία της καρδιάς. Το H₂S έχει αρνητική ινοτροπική επίδραση στη καρδιά κυρίως μέσω αναστολής της αδενυλικής κυκλάσης (AC), ενεργοποίησης των καναλιών K_{ATP} και μπλοκαρίσματος των LTCC. Επίσης το υδρόθειο αναστέλλει την ενεργότητα των καναλιών Cl⁻ και NHE, καθώς και της κυτοχρωμικής οξειδάσης c, και η επακόλουθη μείωση του ενδοκυτταρικού pH και του ATP συμβάλλει στην ενίσχυση της δράσης των καναλιών K_{ATP}. Ανατύπωση (Liu et al., 2012).

Το υδρόθειο επάγει ενδογενείς μηχανισμούς που προστατεύουν το μυοκάρδιο από την ισχαιμία και τις βλάβες που ακολουθούνται κατά την επαναιμάτωση. Κατά την εξέλιξη ενός ισχαιμικού επεισοδίου, προκαλείται συσσώρευση ιόντων Ca²⁺ στο εσωτερικό των καρδιομυοκυττάρων η οποία επιφέρει εξασθένιση της συσταλτικής λειτουργίας, απώλεια της μεμβρανικής ακεραιότητας, διάσπαση στοιχείων του κυτταροσκελετού και κατ' επέκταση καταστροφή της κυτταρικής δομής (Buja, 2005). Συνεπώς η καρδιοπροστατευτική επίδραση του υδρόθειου βασίζεται στους μηχανισμούς ενδοκυτταρικής ρύθμισης των επιπέδων ασβεστίου και της λειτουργίας των καναλιών K_{ATP} που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ορισμένες επιπρόσθετες δράσεις που συνεισφέρουν στη προστασία του καρδιακού ιστού κατά την ισχαιμία και την επανοξυγόνωση είναι η διατήρηση της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων (Elrod et al., 2007), η αρνητική ρύθμιση της β-αδρενεργικής λειτουργίας (Yong et al., 2008b) και η αναστολή της κυτταρικής απόπτωσης (Zhuo et al., 2009).

1.5.2 Η λειτουργία του H₂S στα αγγεία

Το υδρόθειο φαίνεται να προκαλεί δοσο-εξαρτώμενη χάλαση σε λεία μυϊκά κύτταρα σε διάφορους τύπους αγγείων, όπως στην αορτή και στην πυλαία φλέβα, αλλά και στα περιφερικά αγγεία ρυθμίζοντας την πίεση του αίματος. Στους μηχανισμούς της επαγομένης από το υδρόθειο αγγειοχάλασης περιλαμβάνονται το άνοιγμα των K_{ATP} καναλιών (Zhao et al., 2001), η ενεργοποίηση του φορέα ανταλλαγής Cl⁻/HCO₃⁻ (Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger, CBE) επάγοντας ενδοκυτταρική οξέωση (Lee et al., 2007) και η αύξηση των επιπέδων κυκλικής μονοφωσφορικής γουανοσίνης (cGMP) η οποία ενισχύει την αποφωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση ακτίνης – μυοσίνης (Bucci et al., 2010).

Σε συνδυασμό με το μονοξειδίο του αζώτου, το υδρόθειο πιθανότατα συνδέεται με τη ρύθμιση της αγγειοχάλασης (έχει αναφερθεί ότι το υδρόθειο προκαλεί συστολή σε τμήματα αορτής που μελετήθηκαν) (Geng et al., 2007) και της αγγειογένεσης, τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως το ενδογενώς παραγόμενο H₂S προάγει τον σχηματισμό αγγειακών δικτύων *in vivo* (Papapetropoulos et al., 2009) και συμβάλλει στην επούλωση πληγών, στη δημιουργία αγγείων μετά από συνθήκες ισχαιμίας και στην αγγειογένεση σε καρκινικούς όγκους (Katsouda et al., 2016).

Επιπρόσθετα, το υδρόθειο φαίνεται να σχετίζεται με ελαττωμένο κίνδυνο εμφάνισης εμφράγματος διότι μειώνει την αθηρωμάτωση των αγγείων. Η προστατευτική δράση κατά της αρτηριοσκλήρυνσης αποδίδεται κυρίως στην ικανότητα του υδρόθειου να παρεμποδίζει την οξειδωτική τροποποίηση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (low density lipoprotein, LDL), αναστέλλοντας επακόλουθα τον σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και τη δημιουργία του πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας (Laggner et al., 2007). Παράλληλα, το υδρόθειο δρα ανασταλτικά στην έκφραση του μορίου κυτταρικής προσκόλλησης ICAM-1 και κατ' επέκταση εμποδίζει την εξαγγείωση των μονοκυττάρων στην αθηρωματική πλάκα (Wang et al., 2009).

1.6 Οξειδωτικό στρες

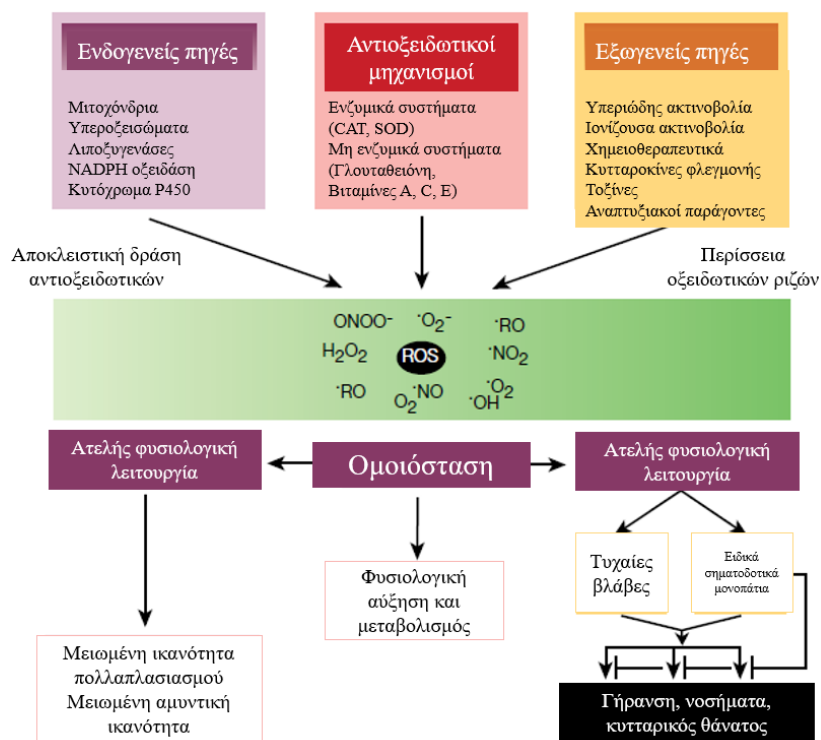
1.6.1 Παραγωγή και εξισορρόπηση δραστικών μορφών οξυγόνου

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) είναι μερικώς ανηγμένα και ενεργοποιημένα παράγωγα του μοριακού οξυγόνου και περιλαμβάνουν (α) ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), (β) ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν (ClO^-), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος (HClO), (γ) συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ($\cdot\text{O}_2^-$) και (δ) μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2). Οι ενδιάμεσες αυτές μορφές του οξυγόνου παράγονται ενδογενώς στα κύτταρα κυρίως κατά τη διεξαγωγή της μιτοχονδριακής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης ή προκύπτουν από ποικίλες εξωγενείς πηγές (Ray et al., 2012). Παρόλο που η δράση των οξειδωτικών πιθανότατα είναι στοχαστική, μελέτες δείχνουν πως οι ROS μπορούν να αποτελέσουν ειδικά μόρια σηματοδότησης σε φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις (Schieber and Chandel, 2014). Η διάρκεια, η ένταση και ο εντοπισμός των διαφόρων σημάτων μέσω ROS καθορίζονται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων μηχανισμών παραγωγής και εκκαθάρισής τους.

Μία ποικιλία κυτταροπλασματικών ενζύμων συμβάλλουν στην παραγωγή ROS όπως οι NADPH οξειδάσες (NADPH oxidases, NOX), οι οποίες συναντώνται στα ουδετερόφιλα αλλά και σε κύτταρα που δεν εκτελούν φαγοκυττάρωση. Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε, η πλειονότητα της παραγωγής ROS πιθανολογείται πως προέρχεται από τα μιτοχόνδρια. Η «διαρροή» που παρουσιάζει η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι δυνατόν να συμβεί σε δύο διακριτά σημεία, το σύμπλεγμα I (οξειδοαναγωγή του NADH-ουβικινόνης) και το σύμπλεγμα III (οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-cyt c). Κάτω από φυσιολογικές μεταβολικές συνθήκες, το σύστημα III είναι η βασική πηγή της δημιουργίας ROS, με την παραγωγή ελευθέρων ριζών ανιόντων ημικινόνης ($\cdot\text{O}^-$) που αποτελούν ενδιάμεσο προϊόν στην αναγέννηση του συνεχόμενου Q. Από τη στιγμή δημιουργίας τους, οι $\cdot\text{O}^-$ μπορούν μέσω παράπλευρων αντιδράσεων να μεταφέρουν ηλεκτρόνια με μη ενζυματικό τρόπο στο μοριακό οξυγόνο, με τη συνεπακόλουθη δημιουργία μιας ρίζας $\cdot\text{O}_2^-$. Επιπρόσθετα, ένα μέρος της παραγωγής των ROS είναι αποτέλεσμα του φυσιολογικού ενδοκυτταρικού μεταβολισμού στα υπεροξεισώματα. Ορισμένοι εξωγενείς παράγοντες που μπορεί να συμβάλλουν στη συσσώρευση ROS είναι η UV ακτινοβολία, τα χημειοθεραπευτικά, οι τοξίνες, η παραγωγή κυτταροκινών

που σχετίζονται με φλεγμονές καθώς και ορισμένοι αναπτυξιακοί παράγοντες (Finkel and Holbrook, 2000; Thannickal and Fanburg, 2000).

Παράλληλα, ένα εκλεπτυσμένο αντιοξειδωτικό αμυντικό σύστημα, που περιλαμβάνει την καταλάση, την υπεροξειδική δισμουτάση (superoxide dismutase, SOD) και την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase, GPx), αντισταθμίζει και ρυθμίζει τα συνολικά επίπεδα ROS με ενζυματικό και μη ενζυματικό τρόπο, διατηρώντας την κυτταρική ομοιόσταση. Η υπερβολική μείωση των επιπέδων των ROS έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της φυσιολογικής τους δράσης στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την αμυντική ικανότητα (Finkel and Holbrook, 2000). Αντίθετα όταν η παραγωγή ROS υπερβαίνει την ενδογενή αντιοξειδωτική άμυνα, προκαλείται οξειδωτικό στρες. Το οξειδωτικό στρες οδηγεί σε βλάβη των νουκλεϊκών οξέων, πρωτεϊνών και λιπιδίων, προκαλώντας τον κυτταρικό θάνατο (Davies, 1995), και έχει διαπιστωθεί πως εμπλέκεται στην καρκινογένεση (Trachootham et al., 2009), τον νευροεκφυλισμό (Shukla et al., 2011), την αθηροσκλήρωση, τον διαβήτη (Paravicini and Touyz, 2006) και τη γήρανση (Haigis and Yankner, 2010). Όσα αναφέρονται παραπάνω συνοψίζονται στην παρακάτω εικόνα.



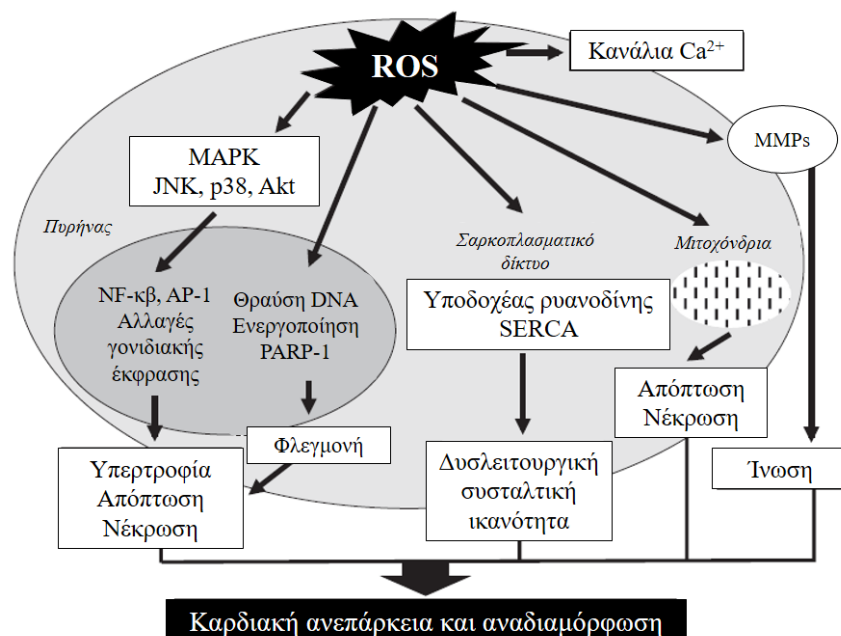
Εικόνα 1.14: Οι πηγές των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS), οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και οι κυτταρικές αποκρίσεις στη μεταβολή της ομοιόστασης. Ανατύπωση (Finkel and Holbrook, 2000).

1.6.2 Επίδραση του οξειδωτικού στρες στην καρδιακή δομή και λειτουργία

Τις τελευταίες δεκαετίες, εκτεταμένες μελέτες σε σειρές απομονωμένων καρδιακών κυττάρων, σε πρότυπα ζωικά μοντέλα αλλά και στον άνθρωπο επιβεβαιώνουν πως το οξειδωτικό στρες συνδέεται με τον παθολογικό μηχανισμό της καρδιακής αναδιαμόρφωσης (cardiac remodeling, REM), η οποία είναι υπεύθυνη για την εξέλιξη και την πρόκληση της καρδιακής ανεπάρκειας (heart failure, HF) (Sawyer, 2011). Το οξειδωτικό στρες φαίνεται πως μπορεί να ενεργοποιήσει πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις που οδηγούν στην αλλοίωση της δομής της καρδιάς και την εξασθένηση της καρδιακής λειτουργίας, οι βασικότερες από τις οποίες αναφέρονται παρακάτω (Εικόνα 1.15):

- Η περίσσεια ROS μπορεί να επιβαρύνει την συσταλτική λειτουργία τροποποιώντας την έκφραση ή την ενεργότητα πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη διαχείριση των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca^{2+} (Arai et al., 1993). Σε αυτές τις τροποποιήσεις περιλαμβάνονται η αναστολή των καναλιών LTCC, η μετατροπή των υποδοχέων ρυανοδίνης ώστε να λαμβάνουν την ανοικτή τους μορφή και η αλληλεπίδραση με την Ca^{2+} -ATPάση του σαρκο/ενδοπλασματικού δικτύου 2 (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2, SERCA2) που οδηγεί στην αναστολή της επαναπρόσληψης ιόντων ασβεστίου (Tsutsui et al., 2011).
- Οι ROS έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν μεταλλοπρωτεϊνάσες (matrix metalloproteinases, MMPs), μια οικογένεια πρωτεολυτικών ενζύμων που συντελεί στην τροποποίηση της δομής της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Siwik et al., 2001).
- Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της διαπερατότητας της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων μέσω του ανοίγματος πόρων μετάβασης (permeability transition pore, PTP), το οποίο συνοδεύεται από απελευθέρωση ROS και ασβεστίου (Zorov et al., 2000). Η κυτταροπλασματική αύξηση των επιπέδων ROS και Ca^{2+} προκαλεί βλάβη σε γειτονικά μιτοχόνδρια και ενεργοποίηση εξαρτώμενων από ασβέστιο καλπαϊνών και λιπασών, σηματοδοτώντας τον νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο (Garcia-Dorado et al., 2012).

- Οι ROS συμβάλλουν στην πρόκληση καρδιακής υπερτροφίας. Πολλές ενδοκυτταρικές κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες που επάγουν υπερτροφική απόκριση στα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να ενεργοποιηθούν άμεσα είτε έμμεσα από τις ROS, όπως οι επαγόμενες από μιτογόνα κινάσες πρωτεΐνης (mitogen – activated protein kinases, MAPKs), οι κινάσες p38, οι c-Jun πυρηνική κινάση (c-Jun-nuclear kinase, JNK), οι ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικό σήμα κινάσες 1/2 (extracellular signal–regulated kinases, ERK1/2), η πρωτεϊνική κινάση B (protein kinase B, Akt) και οι μεταγραφικοί παράγοντες NF-κβ και AP-1 (Sabri et al., 2003).
- Η συσσώρευση ROS ενισχύει την κυτταρική απόπτωση λόγω επαγόμενης από ROS μετατροπής και βλάβης του DNA, δυσλειτουργίας και καταστροφής των μιτοχονδρίων και ενεργοποίησης προ-αποπτωτικών κινασών (Cesselli et al., 2001).
- Τέλος, το οξειδωτικό στρες προκαλεί βλάβες στο DNA, οδηγώντας στην ενεργοποίηση του πυρηνικού ενζύμου poly (ADP-ριβόζη) πολυμεράση-1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1, PARP-1). Η PARP-1 ρυθμίζει την έκφραση ποικίλων μεσολαβητών φλεγμονής οι οποίοι συντελούν στην εξέλιξη της καρδιακής αναδιαμόρφωσης (Tsutsui et al., 2011).



Εικόνα 1.15: Πιθανοί υποκυτταρικοί στόχοι των συσσωρευμένων ROS που σχετίζονται με την καρδιακή ανεπάρκεια. Ανατύπωση και τροποποίηση (Tsutsui et al., 2011).

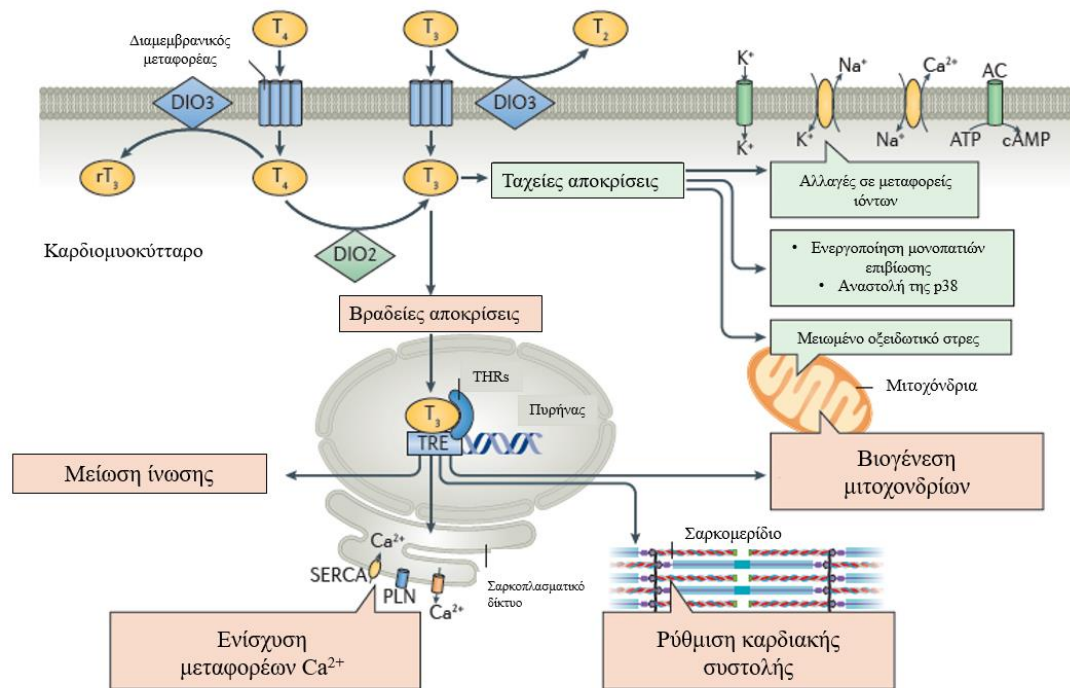
1.7 Οι καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των θυρεοειδικών ορμονών

Ο θυρεοειδής αδένας εκκρίνει δύο βασικές ορμόνες, την Τριιωδοθυρονίνη (triiodo-L-thyronine, T₃) και την Τετραιωδοθυρονίνη (tetraiodothyronine, T₄) ή θυροξίνη. Η σύνθεση και η έκκριση των θυρεοειδικών ορμονών (thyroid hormones, TH) υπόκειται σε ρύθμιση από το σύστημα υποθαλάμου – υπόφυσης, ενώ η συγκέντρωσή τους στο πλάσμα και σε ενδοκυτταρικό επίπεδο ρυθμίζεται με τη δράση ενζύμων αφαίρεσης ιωδίου (deiodinase, DIO) (Gereben et al., 2008). Η T₄ δρα σε μεγάλο βαθμό σαν προορμόνη και η T₃ θεωρείται η βιολογικά ενεργή ορμόνη, ωστόσο και οι δύο συνδέονται στους υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών (thyroid hormone receptors, THRs) α και β, οι οποίοι δεσμεύονται σε στοιχεία αποκρινόμενα στις TH (TH response elements, TRE) στην περιοχή υποκινητή διαφόρων γονιδίων (Cheng et al., 2010).

Οι θυρεοειδικές ορμόνες έχουν ένα μεγάλο εύρος καρδιοπροστατευτικών επιδράσεων στο καρδιαγγειακό σύστημα οι οποίες πραγματοποιούνται με τρεις διαφορετικούς τρόπους: με ταχείες μη γονιδιωματικές δράσεις στα κανάλια ιόντων της πλασματικής μεμβράνης των καρδιομυοκυττάρων, με την πρόκληση βραδύτερης τροποποίησης της γονιδιακής έκφρασης στα καρδιομυοκύτταρα μέσω δέσμησης στους πυρηνικούς υποδοχείς και με τη ρύθμιση της περιφερικής κυκλοφορίας η οποία καθορίζει την αιμοδυναμική και την καρδιακή συσταλτικότητα (Jabbar et al., 2016). Ορισμένες από αυτές τις ιδιότητες των TH περιγράφονται παρακάτω και συνοψίζονται στην εικόνα 1.16.

Στα καρδιομυοκύτταρα, οι ορμόνες του θυρεοειδούς φαίνεται πως ρυθμίζουν την ικανότητα σύσπασης μέσω τροποποίησης των ενδοκυτταρικών επιπέδων ιόντων ασβεστίου. Συγκεκριμένα ενεργοποιούν την έκφραση της αντλίας SERCA2, ενώ ρυθμίζουν αρνητικά τη μεταγραφή του γονιδίου *PLN* που κωδικοποιεί τον αναστολέα της ATPάσης αυτής, τη φωσφολαμπάνη (He et al., 1997; Kaasik et al., 1997). Έχουν πολλαπλούς ρόλους στη διατήρηση της ακεραιότητας των μιτοχονδρίων στους οποίους περιλαμβάνεται η μείωση του οξειδωτικού στρες ενώ ενισχύουν τη μιτοχονδριακή βιογένεση (Lanni et al., 2016; Marín-García, 2010). Επιπλέον, μελέτες έχουν δείξει πως οι TH περιορίζουν την επέκταση εμφράγματος καθώς μειώνουν τον προγραμματισμένο θάνατο καρδιομυοκυττάρων, ενισχύοντας αντι-αποπτωτικά μονοπάτια και αναστέλλοντας την κινάση p38 (Pantos et al., 2003, 2009). Τέλος, οι θυρεοειδικές

ορμόνες έχουν αντι-ινωτική δράση, αφού μειώνουν τη σύνθεση του κολλαγόνου I, το οποίο αποτελεί το κύριο ινωτικό κολλαγόνο της καρδιάς (Yao and Eghbali, 1992).



Εικόνα 1.16: Οι καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις των θυρεοειδικών ορμονών, προκαλώντας ταχείες μη γονιδιωματικές και βραδείες γονιδιωματικές κυτταρικές αποκρίσεις. Η T_3 εισέρχεται στο καρδιομυοκύτταρο μέσω μεμβρανικού μεταφορέα και παράγεται επίσης ενδοκυτταρικά από τη μετατροπή της T_4 μέσω του ενζύμου DIO τύπου 2 (DIO2), που συναντάται χαρακτηριστικά στον καρδιακό ιστό. Στη συνέχεια, η ενεργή ορμόνη είτε προκαλεί ταχείες αποκρίσεις είτε δεσμεύεται σε πυρηνικούς υποδοχείς THRs ρυθμίζοντας τη γονιδιακή έκφραση. Το ένζυμο DIO τύπου 3 (DIO3) τερματίζει τη δράση των ορμονών καθώς αποδομεί και την T_4 και την T_3 . Η τελευταία λαμβάνει την ανενεργή αντίστροφη μορφή της (rT_3). Ανατύπωση (Jabbar et al., 2016).

Δεδομένων των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων των θυρεοειδικών ορμονών και ιδιαίτερα της T_3 , είναι εύλογο να υποθέσουμε πως υπάρχει μια αμφίδρομη σχέση μεταξύ της δυσλειτουργίας του θυρεοειδικού συστήματος και της καρδιακής ανεπάρκειας. Στον υποθυρεοειδισμό παρατηρούνται ποικίλα συμπτώματα στο καρδιαγγειακό σύστημα, όπως μείωση του όγκου παλμού και της καρδιακής συσταλτικότητας, ελάττωση του καρδιακού ρυθμού και αύξηση της αντίστασης των αγγείων, ενισχύοντας τον κίνδυνο εμφάνισης ασθένειας (Klein and Danzi, 2007; Rodondi et al., 2010). Αντίστοιχα, έχουν εντοπιστεί χαμηλά επίπεδα T_3 στη κυκλοφορία ασθενών με προχωρημένη καρδιακή ανεπάρκεια και το φαινόμενο αυτό

έχει χαρακτηριστεί ως «Σύνδρομο χαμηλής T₃» (Low T₃ syndrome) (Iervasi et al., 2003). Συνεπώς γίνεται αντιληπτό πως η τροποποίηση του θυρεοειδικού μεταβολισμού συνδέεται με την αλλοίωση της καρδιακής δομής και λειτουργίας και η θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης μέσω της εξωγενούς χορήγησης T₃ μπορεί να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική διαχείρισης των κλινικών συμπτωμάτων ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια (Εικόνα 1.17).



Εικόνα 1.17: Χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών για τη διαχείριση του συνδρόμου χαμηλής T₃ που σχετίζεται με την καρδιακή ανεπάρκεια. Ανατύπωση (Martinez, 2016).

2. Σκοπός

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, μελετήσαμε την επίδραση της έλλειψης του ενζύμου ενδογενούς βιοσύνθεσης υδρόθειου θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού (3-MST) αξιοποιώντας το ζωικό μοντέλο zebrafish. Εξηγώντας, χρησιμοποιήσαμε μία σειρά zebrafish που έχει υποστεί στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο ορθόλογο γονίδιο του 3-MST μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης ήταν **ο χαρακτηρισμός παθολογικού φαινοτύπου που σχετίζεται με την απώλεια του 3-MST**, καθώς τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα αναπτύσσονται φυσιολογικά. Πιο αναλυτικά:

α) Ελέγξαμε την ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων εμβρύων και προνυμφών κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες προκαλώντας χημικά επαγόμενη υποξία και καταστροφή μιτοχονδρίων με τους παράγοντες χλωριούχο κοβάλτιο και παρακουάτ, αντίστοιχα.

β) Προκειμένου να διευκρινίσουμε αν η απώλεια του ενζύμου επηρεάζει την αναγεννητική ικανότητα των εμβρύων, προκαλέσαμε μη επεμβατική καταστροφή καρδιομυοκυττάρων αξιοποιώντας το γενετικό εργαλείο Gal4/UAS και το σύστημα NTR-Mtz.

γ) Για να ελέγξουμε εάν η λειτουργία του 3-MST συνδέεται με την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων, παρατηρήσαμε το μιτοχονδριακό δυναμικό μεταλλαγμένων εμβρύων διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων με τη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής Mitotracker.

δ) Λαμβάνοντας υπόψιν τον συμπεριφορικό φαινότυπο των 3-MST knockout ποντικών, υποβάλλαμε 3-mst^{-/-} έμβρυα zebrafish σε δοκιμασία θιγμοτακτισμού με ρολιπράμη, μία ένωση που επάγει συμπεριφορά που προσομοιάζει με άγχος.

Παράλληλα, δεδομένων των μηχανισμών δράσης των θυρεοειδικών ορμονών στα θηλαστικά, **διερευνήσαμε *in vitro* τον ρόλο της T₃ στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό καρδιακών μυοβλαστών αρουραίου**. Προς επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου, πραγματοποιήσαμε πειράματα ανοσοκυτταροχημείας σε κύτταρα της σειράς H9c2 για την ανίχνευση του προστιθέμενου δείκτη κυτταρικής διαίρεσης BrdU και του μεταγραφικού παράγοντα μυϊκής ανάπτυξης MEF2c.

3. Υλικά και Μέθοδοι

3.1 Βιολογικό υλικό

3.1.1 Πειραματόζωα

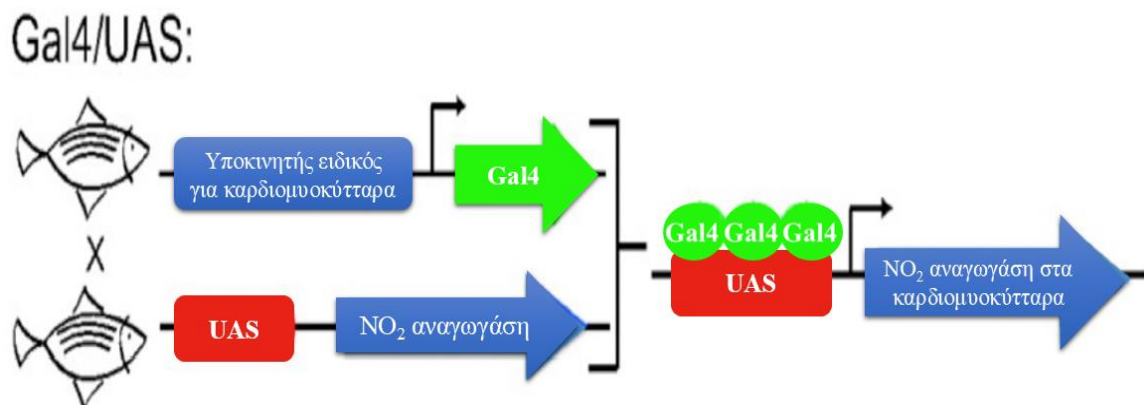
Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σειρές ενήλικων zebrafish:

Μεταλλαγμένη σειρά 3-MST: Η συγκεκριμένη σειρά προέκυψε με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο ορθόλογο γονίδιο του *3-MST*, μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα αναπτύσσονται φυσιολογικά. Οι οικογένειες των *3mst*^{-/-} ψαριών έχουν διασταυρωθεί με τις ακόλουθες μεταλλαγμένες και διαγονιδιακές σειρές για να διευκολυνθεί η μελέτη τους:

- Το διαγονίδιο *tcf:dsRed*: Τα διαγονιδιακά zebrafish *tcf:dsRed* εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *tcf*, που κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό ενδοθηλιακό παράγοντα (Moro et al., 2012). Παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη.
- Το διαγονίδιο *tp1:H2BmCherry*: Τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά ψάρια εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry σε όλα τα αποκρινόμενα στο Notch σηματοδοτικό μονοπάτι κύτταρα (Notch-responsive cells, NRCs). Το γονίδιο των φθορίζουσών πρωτεϊνών έχει κλωνοποιηθεί με τον υποκινητή του Notch σηματοδοτικού μονοπατιού *tp1* (Ninon et al., 2012). Χαρακτηρίζονται από φυσιολογική ανάπτυξη.
- Το διαγονίδιο *tie2:EGFP*: Τα διαγονιδιακά zebrafish *tie2:EGFP* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα της κολποκοιλιακής βαλβίδας και του αρτηριακού βολβού, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *tie2*, που κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό ενδοθηλιακό παράγοντα (Motoike et al., 2000). Δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.
- Μεταλλαγή στο γονίδιο *nacre* (ομόλογο του γονιδίου *MITF* των θηλαστικών, που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα σχετιζόμενο με τη μελανογένεση): Ψάρια με τη συγκεκριμένη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση χαρακτηρίζονται από απώλεια μελανοκυττάρων τόσο σε εμβρυικό όσο και σε

ενήλικο στάδιο και από μια αντισταθμιστική αύξηση στον αριθμό των ιριδοφόρων κυττάρων (Dorsky et al., 2000; White et al., 2008).

Tg (gSAlzGFFM476A;UAS:nfsB-mCherry): Τα συγκεκριμένα διαγονιδιακά zebrafish εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη mCherry συζευγμένη με το ένζυμο NO₂ αναγωγάση (NTR) αποκλειστικά στα καρδιομυοκύτταρα. Η ιστοειδική έκφραση επιτυγχάνεται με την αξιοποίηση του συστήματος μεταγραφικής ενεργοποίησης Gal4-UAS της ζύμης. Η τεχνική βασίζεται στον συνδυασμό δύο διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών zebrafish: μιας σειράς οδηγού στην οποία ο μεταγραφικός παράγοντας GAL4 βρίσκεται υπό τον έλεγχο ενός υποκινητή ειδικού για τα κύτταρα του μυοκαρδίου και μιας σειράς που το γονίδιο *ntr*, συζευγμένο με αυτό της mCherry, είναι κλωνοποιημένο με το DNA μοτίβο πρόσδεσης του GAL4 (Upstream Activating Sequences, UAS). Η έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης και κατ' επέκταση του ενζύμου NTR στα καρδιομυοκύτταρα προϋποθέτει την ύπαρξη και των δύο κατασκευών στον ίδιο οργανισμό (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ιστοειδική έκφραση NO₂ αναγωγάσης μέσω του συστήματος Gal4-UAS. Η έκφραση της NTR σε συνδυασμό με μία φθορίζουσα πρωτεΐνη αποκλειστικά στα καρδιομυοκύτταρα μπορεί να επιτευχθεί με συνδυασμό δύο διαγονιδιακών σειρών: μιας *UAS:ntr* και μιας σειράς οδηγού με ιστοειδικό GAL4.

Ορισμένα άτομα zebrafish που διαθέτουν και τις δύο κατασκευές εμφανίζουν σε ηλικία 3 ημερών (3dpf) καρδιακό οίδημα το οποίο συνήθως εξαφανίζεται στις πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, ενώ σε ενήλικο στάδιο παρατηρείται αυξημένη ευαισθησία και θνησιμότητα λόγω αιματώματος στην περιοχή της καρδιάς. Αυτές οι φαινοτυπικές ανωμαλίες πιθανότατα σχετίζονται με την περιοχή ένθεσης των συγκεκριμένων κατασκευών ή/και με την έντονη έκφραση της κόκκινης φθορίζουσας πρωτεΐνης και της NTR στα καρδιομυοκύτταρα.

Μεταλλαγμένη σειρά 3-MST Tg (gSAlzGFFM476A;UAS:nfsB-mCherry):

Πρόκειται για ενήλικα άτομα zebrafish ομόζυγα για τη μεταλλαγή στο ορθόλογο γονίδιο του *3-mst* που ταυτόχρονα φέρουν το διπλό διαγονίδιο gSAlzGFFM476A και UAS:nfsB-mCherry. Χαρακτηρίζονται από έκφραση του ενζύμου NTR συζευγμένου με την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη αποκλειστικά στα κύτταρα του μυοκαρδίου και παρουσιάζουν τις ίδιες φαινοτυπικές ανωμαλίες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Τα αγρίου τύπου έμβρυα και προνύμφες που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την **σειρά AB** καθώς και από τις εξής διαγονιδιακές σειρές:

Tg (*fli1*:EGFP): Η συγκεκριμένη διαγονιδιακή σειρά εκφράζει την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε ολόκληρο το αγγειακό σύστημα υπό τον έλεγχο του *fli1* υποκινητή, ο οποίος κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό παράγοντα του ενδοθηλίου και των αιμοποιητικών κυττάρων (Delon et al., 2014; Liu et al., 2008). Τα ψάρια με το διαγονίδιο *fli1*:EGFP παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη.

Tg (*cmhc2*:GFP): Τα διαγονιδιακά zebrafish *cmhc2*:GFP εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε καρδιομυοκύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *cmhc2* που κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και της κοιλίας (Huang et al., 2003). Παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη και δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

Οι διαγονιδιακές σειρές κληρονομούνται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο.

3.1.2 Κυτταρική σειρά H9c2

Στην παρούσα εργασία αξιοποιήθηκε η κυτταρική σειρά H9c2 (2-1), η οποία αποτελείται από καρδιακούς μυοβλάστες αρουραίου *Rattus norvegicus*. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά αποκτήθηκε από την εταιρεία ATCC (American Type Culture Collection) με αριθμό προϊόντος CRL-1446. Ειδικότερα, τα κύτταρα αποτελούν κλώνο της αρχικής κυτταρικής σειράς η οποία είχε προέλθει από εμβρυικό καρδιακό ιστό του στελέχους BD1X (Kimes and Brandt, 1976).

3.2 Υλικά

3.2.1 Διαβίωση του ζωικού μοντέλου zebrafish

- Άλατα Instant Ocean
- Ξηρή τροφή σε μεγέθη Z000, Z300, Z400 (ZM Fish Food, <http://www.zmsystems.co.uk>)
- Αφυδατωμένες κύστεις *Artemia salina* (ZM Fish Food <http://www.zmsystems.co.uk>)
- Egg water (EW) η σύσταση του οποίου είναι: 0.3g/L Instant Ocean salts, 0.08 g/L CaSO₄, δις-απιονισμένο νερό (Double deionized water, ddH₂O)
- EW με μπλε του μεθυλενίου (χρησιμοποιείται 1ml ανά λίτρο EW από αρχικό διάλυμα μπλε του μεθυλενίου 10mg/L)
- Ειδικός επωαστικός θάλαμος ρυθμισμένος στους 28°C (Lovibond Thermostatic cabinet)

3.2.2 Χειρισμός των εμβρύων zebrafish

- Τρυβλία Petri
- Διάλυμα καθαρισμού (bleaching buffer): 180ml διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου 10% (από την εταιρεία Sigma-Aldrich) σε 500ml EW
- Προνάση (pronase), πρωτεάση από το βακτήριο *Streptomyces griseus*, συγκέντρωσης 20mg/ml (διαλύεται σε ddH₂O). Λαμβάνεται από την εταιρεία Calbiochem (κωδικός 53702).
- Διάλυμα 1-φαινυλο 2-θειουρίας (PTU) το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: ζυγίζονται 125g σκόνης PTU (Sigma-Aldrich) και αναμειγνύονται με 100ml EW.
- Διάλυμα αναισθητικού Tricaine methanesulfonate 0,4% το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: ζυγίζονται 4gr σκόνης Tricaine (Sigma-Aldrich, κωδικός A-5040) και αναμειγνύονται με 1L H₂O. Στην συνέχεια προσαρμόζεται το pH στην τιμή 7 χρησιμοποιώντας διάλυμα Tris/HCl pH 9.0.

3.2.3 Απομόνωση DNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Για την απομόνωση DNA από ενήλικα zebrafish (με τομή στο ουραίο πτερύγιο) χρησιμοποιήθηκαν:

- Χειρουργικό ψαλίδι και λαβίδα
- Διάλυμα αναισθητικού Tricaine methanesulfonate 0.4%
- Πρωτεΐνάση K 10mg/ml της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Διάλυμα απομόνωσης DNA (DNA extraction buffer): 10mM Tris HCl pH 8.0, 2mM EDTA pH 8.0, 0.2% TritonX-100, Sigma-Aldrich

Για την PCR και τον καθαρισμό προϊόντος χρησιμοποιήθηκαν:

- Taq DNA πολυμεράση της εταιρείας NEB
- PCR mix: 10mM dNTPs (της εταιρείας NEB), 1M MgCl₂, 4M KCl, 1M Tris-HCl pH 8.4, 1% Gelatin της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Εκκινητές: κατασκευάστηκαν στην εταιρεία Macrogen (Πίνακας 3.1)

Εκκινητής	Αλληλουχία	GC%	Tm(°C)
3mst_forward	5'-CGGATATTAGACGCATCATGGTATT-3'	40.0	62.5
3mst_reverse	5'-GTCTTCATAAGTTTTGACCCATGAC-3'	40.0	62.5

Πίνακας 3.1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR

- Ένζυμα ExoI (20u/μl), SAP (1u/μl) της εταιρείας Sigma-Aldrich

Για την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν:

- TAE 50x (242g/L Tris/HCl 8.8, 57.1ml/L οξικό οξύ υπό μορφή πάγου, 100ml/L 0.5M EDTA, της εταιρείας Sigma-Aldrich)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) της εταιρείας Invitrogen
- Αγαρόζη της εταιρείας Sigma-Aldrich
- 2-log DNA ladder της εταιρείας NEB
- 6x Loading Dye (10mM Tris HCl pH 7.6, 0,15% orange G της εταιρείας Sigma-Aldrich, 60% glycerol, 60mM EDTA)

3.2.4 Χημικές δοκιμές

- Διάλυμα ζιζανιοκτόνου Paraquat (methyl viologen dichloride hydrate – 98%) της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός 856177) συγκέντρωσης 50mg/mL. Προκύπτει με διάλυση 0.05 gr σκόνης φαρμάκου σε 1mL EW.
- Φθορίζουσα χρωστική Mitotracker Deep Red FM της εταιρείας ThermoFisher Scientific (κωδικός M22426). Για την παρασκευή διαλύματος με τελική

συγκέντρωση 1mM, η λυοφιλιωμένη χρωστική 50μg διαλύθηκε σε 92μl DMSO.

- Χλωριούχο Κοβάλτιο [Cobalt (II) chloride hexahydrate - CoCl_2] της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός 255599)
- Διάλυμα Μετρονιδαζόλης (Metronidazole - Mtz) της εταιρείας Fluka (κωδικός M3761) τελικής συγκέντρωσης 5mM. Συγκεκριμένα, 0,0128 gr σκόνης διαλύθηκαν σε 15 ml EW με 0.2% DMSO.
- Low Melting Agarose 1.2% (LMA από την εταιρεία Sigma-Aldrich) διαλυμένη σε Tricaine 0.4%
- Πλάκα 6 φρεατίων
- Πλάκα 12 φρεατίων
- Για τη δοκιμασία θιγμοτακτισμού: Ρολιπράμη (Rolipram) σε μορφή σκόνης από την εταιρεία Tocris με κωδικό 0905. Διαλύεται σε 100% DMSO, παρασκευάζοντας αρχικό διάλυμα συγκέντρωσης 100mM.

3.2.5 Διατήρηση κυττάρων, ανακαλλιέργεια και στέριση ορού

- Θρεπτικό μέσο DMEM (Dulbecco's modified Eagle' medium) της εταιρείας Life Technologies (κωδικός: 41966)
- Εμβρυικός ορός βοός FBS (Fetal Bovine Serum Standard Quality) της εταιρείας PAA Laboratories GmbH (Κωδικός: A15-043)
- Αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη της εταιρείας PAA Laboratories GmbH (κωδικός: P11-010). Τα αντιβιοτικά προστίθενται στο θρεπτικό μέσο DMEM των κυττάρων σε συγκεντρώσεις 100U/ml για την πενικιλίνη και 100 μg/ml για τη στρεπτομυκίνη, προς αποφυγή μολύνσεων.
- Αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS 1x, του οποίου η σύσταση είναι: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na_2HPO_4 , 1.8mM KH_2PO_4 με pH 7.4
- Διάλυμα 5% τρυψίνης – EDTA (10x) της εταιρείας Life Technologies (κωδικός 15400-054). Το διάλυμα αραιώνεται σε PBS 1x.
- Φλάσκες 75cm²
- Αιθανόλη 70% (v/v) ως μέσο απολύμανσης
- Πλάκα 24 φρεατίων

3.2.6 Επίδραση παραγόντων

- Διάλυμα Τριωδοθυρονίνης (Triiodo-L-Thyronine, T₃) της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός T2877) συγκέντρωσης 0.2 mg/ml. Συγκεκριμένα διαλύθηκαν 0.01 gr σκόνης T₃ σε 1ml NaOH 1M και προστέθηκε δις-απεσταγμένο νερό σε τελικό όγκο 50ml.
- Διάλυμα βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης (BrdU) 100x (1mM) της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός B5002)
- Διάλυμα παραφορμαλδεΰδης (PFA) 4%. Συγκεκριμένα διαλύονται 40gr σκόνης (Sigma-Aldrich, P6148) σε ~700ml ddH₂O σε θερμαινόμενη πλάκα (~60°C), με χορήγηση σταγόνων 5N NaOH. Προστίθενται 100ml PBS 10x και προσαρμόζεται το pH στην τιμή 7.4 με HCl. Συμπληρώνεται ο υπόλοιπος όγκος με ddH₂O.

3.2.7 Ανοσοκυτταροχημεία

- Κυκλικές καλυπτρίδες με πολυλυσίνη
- Λαβίδα
- Θάλαμος υγρασίας (humidity chamber)
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων PBS 1x
- 2N Υδροχλωρικό οξύ (HCl) σε ddH₂O
- 0.1M Βορικό νάτριο (Sodium borate) της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός 1303-96-4). Συγκεκριμένα, διαλύθηκαν 3.81 gr σε 100ml ddH₂O και στη συνέχεια προσαρμόστηκε το pH στη τιμή 8.0 με πυκνό HCl 37%.
- Διάλυμα δέσμησης μη ειδικών θέσεων (blocking) η σύσταση του οποίου αποτελείται από: 0.1% Triton X-100, 10% NGS σε PBS 1x
- Αντι-MEF2c πρωτογενές αντίσωμα (C-21) sc-313 που έχει παραχθεί σε κουνέλι, της εταιρείας Santa Cruz Biotechnology
- Αντι-BrdU πρωτογενές αντίσωμα (ab6326) που έχει παραχθεί σε αρουραίο, της εταιρείας Abcam
- Δευτερογενές αντίσωμα που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνες (IgG) κουνελιού (Alexa Fluor 488), της εταιρείας Life Technologies. Το παραπάνω αντίσωμα έχει παραχθεί σε αίγα.

- Δευτερογενές αντίσωμα που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνες (IgG) αρουραίου (Alexa Fluor 568) της εταιρείας Abcam (ab175475). Το παραπάνω αντίσωμα έχει παραχθεί σε όνο.
- Μέσο εγκλεισμού (mounting medium) fluoroshield με DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, 4',6-Διαμινο-2-φαινυλινδόλιο) της εταιρείας Sigma-Aldrich (κωδικός F6057)
- Αντικειμενοφόροι Carl Roth GmbH (κωδικός H871)

3.3 Προγράμματα λογισμικού

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Microsoft Office Excel
- GraphPad Prism

Λοιπά προγράμματα λογισμικού:

- Image J
- NCBI blastp suite-2sequences
- NCBI conserved domains
- Uniprot
- Ensembl
- Zfin
- Dolphin-DC
- IC Capture 2.2
- HImage live
- LAS AF

3.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός – Αναλώσιμα

- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ1000
- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ800
- Κάμερα DFK22BUC03
- Στερεοσκόπιο Nikon C-DSS230 και τροφοδοτικό λάμπας φθορισμού C-SHG1
- Ορθό Leica STP6000 συνεστιακό μικροσκόπιο με λέιζερ Argon
- Ορθό Leica DMRA2 μικροσκόπιο φθορισμού
- Κάμερα ORCA C11440

- Συσκευή PCR (*DYAD DNA ENGINE –Peltier Thermal Cycler*)
- Μικρή επιτραπέζια φυγόκεντρος BIO-RAD C1301
- Φυγόκεντρος Heraeus Biofuge Pico
- Δεξαμενή ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης consort E861
- Θάλαμος με λάμπα UV και κάμερα Wealtec
- Συσκευή παραγωγής ddH₂O (δισ-απεσταγμένο νερό)
- Θερμαινόμενη πλάκα HB-2 της Wealtec
- Κλίβανος HB-1000 της εταιρείας UVP
- Υδατόλουτρο (SUB14) της εταιρείας Grant
- Ζυγός ακριβείας (CP224S) της εταιρείας Sartorius
- Αναδευτήρας Vortex Labnet VX100
- Πεχάμετρο της Inolab
- Μαγνητικός αναδευτήρας της εταιρείας Schott GmbH
- Κωνικές φιάλες των 250ml
- Parafilm
- Τρυβλία Petri διαμέτρου 10cm
- Φίλτρα Whatman με διάμετρο πόρου 0.2μm
- Πλαστικά σωληνάρια 0.5, 1.5 και 2.0 ml (ependorf)
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης των 5 και 10ml
- Πιπέτες Pasteur των 3ml από την Kisker Biotech GmbH
- Μικροπιπέτες για τη μετάγγιση υγρών από 0.1μl έως 1μl και ρύγχη
- Υδροβολείς
- Γυάλινη αντικειμενοφόρος με φρεάτιο
- Κλίβανος επώασης κυττάρων (MCO 15AC) της εταιρείας SANYO
- Θάλαμος νηματικής ροής (KB/KBM horizontal laminar airflow bench, class100) της εταιρείας Faster
- Λάμπα UV ακτινοβολίας για την αποστείρωση του θαλάμου κυτταροκαλλιεργειών
- Υδατόλουτρο (Model WB 3015) της εταιρείας Bioline Scientific
- Οπτικό μικροσκόπιο σε μεγέθυνση 10x (IN834) της εταιρείας Nova
- Πλάκα Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρο

3.5 Μέθοδοι

3.5.1 Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου zebrafish

Τα πειραματόζωα εκτρέφονται και διαβιούν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΠΒΕΑΑ) σε συστήματα ανακύκλωσης και αποστείρωσης γλυκού νερού, σε δοχεία 1,3 και 10 λίτρων (Εικόνα 3.2). Συγκεκριμένα ο μέγιστος αριθμός ψαριών που τοποθετείται στα δοχεία του 1L είναι 3, στα δοχεία των 3L τοποθετούνται 6-12 ενήλικα ψάρια ενώ στα δοχεία των 10L τοποθετούνται 12-20 ψάρια. Αν διατηρείται μεγαλύτερος αριθμός ψαριών ανά δοχείο από αυτόν που αναφέρθηκε, μειώνεται ο ρυθμός αύξησης και αυξάνεται η αναλογία αρσενικών/θηλυκών ψαριών. Αντίθετα, η διατήρηση των ψαριών σε πυκνότητες μικρότερες του ενός ψαριού ανά λίτρο προκαλεί συνήθως προβλήματα λόγω υπερβολικής σίτισης, ενώ παράλληλα προωθεί αντιδράσεις στρες στα άτομα αυξάνοντας τα επίπεδα εκκρινόμενης κορτιζόλης.

Στα ενυδρεία επικρατεί τεχνητή εναλλαγή φωτεινής – σκοτεινής περιόδου όπου ο κύκλος περιλαμβάνει 14 ώρες φωτός και 10 ώρες συσκότισης. Η θερμοκρασία στα συστήματα κυμαίνεται από 27°C έως 28.5°C, εύρος που θεωρείται ιδανικό για ψάρια τροπικών κλιμάτων όπως το zebrafish. Το νερό χαρακτηρίζεται επίσης από ουδέτερο pH 6.5-7.5, συγκεντρώσεις νιτωδών <2.5mg/ml και νιτρικών <0.025 mg/ml καθώς και από αγωγιμότητα 400 έως 700 Ms. Όλες οι σχετικές με τα πειραματόζωα διαδικασίες είναι εγκεκριμένες από τις εθνικές αρχές και σύμφωνες με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Στην περίπτωση των εμβρύων, τα zebrafish διατηρούνται από τη στιγμή της συλλογής τους έως και την 5η ημέρα της ζωής τους, σε τρυβλία Petri με Egg Water σε επωαστικό θάλαμο. Ακολούθως μετά την 5η ημέρα γονιμοποίησης τα έμβρυα μεταφέρονται στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων, όπου μέχρι την ολοκλήρωση του πρώτου μήνα ζωής τους διατηρούνται σε δοχεία χωρητικότητας 1L σε ομάδες που δεν ξεπερνούν τα 50 άτομα με συνεχή εναλλαγή Egg Water και προσθήκη νερού από τα συστήματα των ενήλικων ψαριών. Μετά τη συμπλήρωση του πρώτου μήνα, τα zebrafish τοποθετούνται στα συστήματα παροχής αποστειρωμένου νερού και διαχωρίζονται με τον τρόπο που αναφέρεται παραπάνω.



Εικόνα 3.2: Συστήματα ανακύκλωσης νερού του ενυδρείου στο ΠΒΕΑΑ. Στα συγκεκριμένα συστήματα, τα άτομα zebrafish διαβιούν σε δοχεία των 10L. Κάθε δοχείο φέρει μια αυτοκόλλητη ετικέτα στην οποία αναγράφονται το κωδικό όνομα της μεταλλαγμένης ή διαγονιδιακής σειράς, η ημερομηνία γέννησης των ατόμων και ο αριθμός αρσενικών και θηλυκών ατόμων εντός του δοχείου.

Η διατροφή των ενήλικων zebrafish επιτελείται 2 φορές την ημέρα και κύρια παράμετρος για τον τρόπο διεξαγωγής της είναι η ηλικία των ψαριών. Μέχρι την 5^η ημέρα μετά την γονιμοποίηση τα έμβρυα του zebrafish δεν έχουν ανάγκη εξωγενούς χορήγησης τροφής καθώς καλύπτουν τις ενεργειακές τους απαιτήσεις λαμβάνοντας θρεπτικά συστατικά από τη λέκιθο. Από την 5^η ημέρα χορήγησης ξεκινά η χορήγηση ξηράς τροφής (Z000) δύο φορές την ημέρα, μέχρι την 30^η ημέρα. Μετά το πέρας των 30 ημερών από τη γονιμοποίηση στα ψάρια χορηγείται το πρωί ζωντανή τροφή (*Artemia salina*) και το μεσημέρι ξηρά τροφή Z100. Σε ηλικία 2 μηνών η ξηρά τροφή αντικαθίσταται με την Z300 ή Z400.

Η διαδικασία καλλιέργειας *Artemia salina* περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

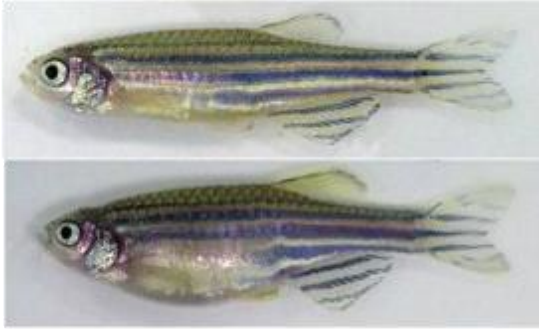
- Προσθήκη 1L απιονισμένου νερού ddH₂O και 34 gr αλάτων Instant Ocean σε ανάστροφο κωνικό δοχείο.
- Ανάδευση διαλύματος έως ότου γίνει διαυγές.
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από κύστεις *Artemia salina*.
- Τροφοδότηση συστήματος με αέρα και επώαση σε θερμοκρασία 26-28 °C (θερμοκρασία που επικρατεί στο ενυδρείο) για 48 ώρες.

- Διαχωρισμός υπολειμμάτων των κελυφών που καθιζάνουν από τις ζωντανές γαρίδες και διήθηση διαλύματος καλλιέργειας από σουρωτήρι το οποίο συγκρατεί το ζωντανό υλικό.
- Επαναδιαλυτοποίηση γαρίδων σε απιονισμένο νερό και χορήγηση στα ψάρια με πλαστική πιπέτα Pasteur.

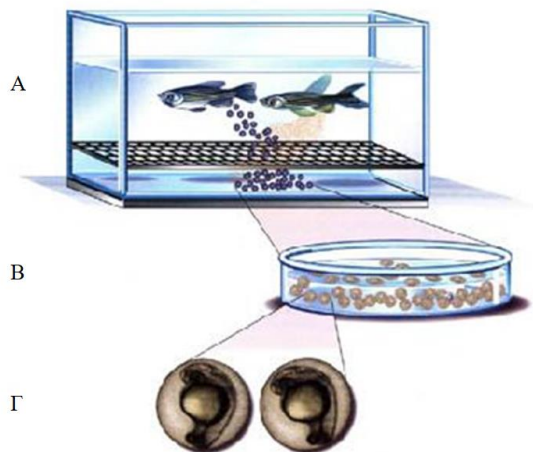
3.5.2 Διασταυρώσεις και χειρισμός εμβρύων zebrafish

Τα ενήλικα άτομα zebrafish ωριμάζουν αναπαραγωγικά από την ηλικία των 10-12 εβδομάδων, είναι ενεργά στο εργαστήριο καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και μπορούν να διασταυρώνονται μία με δύο φορές την εβδομάδα. Η διαδικασία που ακολουθείται κατά τη διασταύρωση είναι απλή και πραγματοποιείται ως εξής:

- Λήψη με απόχη ενός θηλυκού και ενός αρσενικού ατόμου από καθορισμένη οικογένεια (Εικόνα 3.3).
- Τοποθέτηση αυτών σε δοχείο ενός λίτρου, γεμισμένο στα 3/5 της χωρητικότητας του με νερό από το σύστημα του ενυδρείου, με τον εξής τρόπο: το δοχείο χωρίζεται σε δύο μέρη, χρησιμοποιώντας ένα μεταλλικό δίχτυ. Το αρσενικό άτομο τοποθετείται στο κάτω μέρος του δοχείου, ενώ το θηλυκό στο επάνω μέρος. Στη συνέχεια, καλύπτεται το δοχείο με ειδικό πλαστικό σκέπαστρο και τα άτομα αφήνονται σε αυτή τη διάταξη για περίπου 16 ώρες.
- Τοποθέτηση ψαριών στο επάνω μέρος του δοχείου (ένωση) τις 9.00 π.μ. το επόμενο πρωί (όταν ανοίγουν τα φώτα του ενυδρείου) και αναμονή για τη γονιμοποίηση των αυγών. Το διαχωριστικό δίχτυ δεν αφαιρείται αλλά εξακολουθεί να διαχωρίζει τα δύο άτομα zebrafish από τους απογόνους ώστε να αποφευχθεί ο κίνδυνος κατάποσης των αυγών από το θηλυκό γονέα (Εικόνα 3.4). Η εναπόθεση των αυγών γίνεται κυρίως τα πρώτα 30 λεπτά με μία ώρα, ενώ μόνο ένα 10% των ζευγών ψαριών δίνει απογόνους μετά από αυτό το χρονικό διάστημα.
- Επιστροφή ενήλικων ατόμων στο δοχείο της αντίστοιχης οικογένειας και απομόνωση αυγών σε τρυβλία Petri για περαιτέρω επεξεργασία.



Εικόνα 3.3: Αρσενικό (πάνω) και θηλυκό (κάτω) άτομο zebrafish. Τα αρσενικά του είδους έχουν σχήμα τορπίλης, με χρυσές - ροζ λωρίδες ανάμεσα στις μπλε, ενώ τα θηλυκά χαρακτηρίζονται από μεγάλες υπόλευκες κουλίες, ασημένιες αντί για χρυσές λωρίδες και κίτρινο ραχιαίο πτερύγιο, ελαφρώς μεγαλύτερο σε μέγεθος. Επιπρόσθετα, τα θηλυκά εμφανίζουν μια μικρή γεννητική θηλή μπροστά από το εδρικό πτερύγιο. Πηγή (<http://aquagroup.weebly.com/photos--videos.html>)



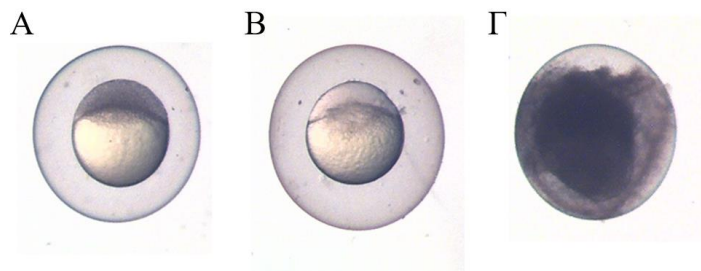
Εικόνα 3.4: Αναπαράσταση της διάταξης κατά τη διασταύρωση των ατόμων zebrafish. Α. Ζευγάρι zebrafish κατά την αναπαραγωγή. Β. Συλλογή αυγών σε τρυβλίο Petri. Γ. Διαφανή έμβρυα στο στάδιο ανάπτυξης σωματιών. Πηγή (<http://zebrafishing.blogspot.gr/>)

Μετά τη λήψη των απογόνων, πραγματοποιείται ένα σύντομο πρωτόκολλο με σκοπό την απολύμανση των αυγών και την αποφυγή προσβολής τους από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς που διαβιούν στο νερό (bleaching). Αυτό ακολουθεί τα εξής βήματα:

- Επώαση των αυγών σε διάλυμα καθαρισμού (bleaching buffer) για 5 λεπτά.
- Ξέπλυμα με EW για 5 λεπτά.
- Επανάληψη της παραπάνω διαδικασίας άλλη μία φορά.
- Ξέπλυμα με EW για 5 λεπτά.

Στη συνέχεια ακολουθεί:

- Διαχωρισμός μη γονιμοποιημένων και γονιμοποιημένων αυγών στο στερεοσκόπιο με τη χρήση μιας πλαστικής πιπέτας Pasteur (Εικόνα 3.5).
- Αντικατάσταση EW με EW εμπλουτισμένο με μπλε του μεθυλενίου για αντιμυκητιακή δράση.
- Τοποθέτηση των τρυβλίων με τα αυγά στον ειδικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C.



Εικόνα 3.5: Διαχωρισμός γονιμοποιημένων – μη γονιμοποιημένων αυγών στις 4 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στα γονιμοποιημένα αυγά παρατηρείται το συνεχώς διαιρούμενο κυτταρόπλασμα που περιορίζεται σε μία στενή δισκοειδή μάζα πάνω από τη λέκιθο (στάδιο σφαίρας) (A), ενώ στα αγονιμοποίητα αυγά η συγκεκριμένη περιοχή είναι διαφανής (B). Τα νεκρά αυγά διακρίνονται εύκολα καθώς είναι μαυρισμένα στο εσωτερικό τους (Γ). Τα μη γονιμοποιημένα και τα νεκρά αυγά απομακρύνονται με πιπέτα Pasteur.

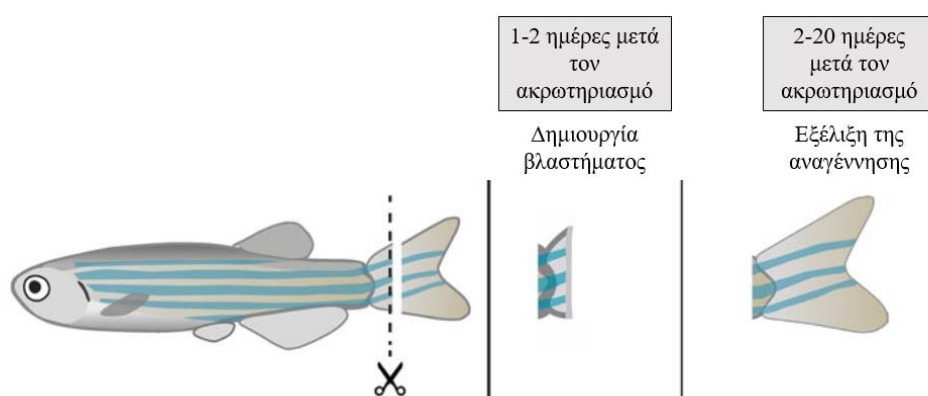
Τα έμβρυα μέχρι την ηλικία των 3 ημερών βρίσκονται φυσιολογικά εντός του χορίου, το οποίο τους παρέχει προστασία από διάφορους παράγοντες, πχ. παρασιτικούς οργανισμούς. Από τις 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και ύστερα, τα έμβρυα είναι ικανά να διαρρήξουν το χοριακό τοίχωμα και να απελευθερωθούν στο νερό. Ωστόσο, εξαιτίας της διαδικασίας καθαρισμού (bleaching) που πραγματοποιείται εντός του εργαστηρίου, το χόριο σκληραίνει σε μεγάλο βαθμό με αποτέλεσμα τα έμβρυα να αδυνατούν να εξέλθουν, να εγκλωβίζονται και να πεθαίνουν. Γι' αυτό το λόγο, τα αυγά επωάζονται στις 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση με ένα ένζυμο, την προνάση, η οποία διασπά τις πρωτεΐνες του χορίου, το μαλακώνει και διευκολύνει την έξοδο των εμβρύων από το εσωτερικό του. Συγκεκριμένα, προστίθενται 120 μl ενζύμου σε κάθε τρυβλίο Petri και ακολουθεί επώαση στους 28°C στον ειδικό θάλαμο για 30 με 40 λεπτά. Στη συνέχεια, η προνάση αφαιρείται ξεπλένοντας τα τρυβλία με EW και μπλε του μεθυλενίου τρεις φορές. Τέλος, όταν τα ψάρια προορίζονται για τεχνικές απεικόνισης πχ. στο συνεστιακό μικροσκόπιο ή για μέτρηση καρδιακού ρυθμού, προστίθεται το χημικό

PTU (500 μ l σε 25ml EW) σε έμβρυα 24 ωρών, το οποίο αναστέλλει το σχηματισμό μελανοκυττάρων στην επιδερμίδα και εξασφαλίζει την πλήρη διαφάνεια σώματος.

3.5.3 Απομόνωση DNA από ουραία πτερύγια ενήλικων ψαριών zebrafish

Ο ακρωτηριασμός των πτερυγίων των ψαριών zebrafish μπορεί να πραγματοποιηθεί για μια ποικιλία σκοπών, συμπεριλαμβανομένης της διαλογής (screening) μεμονωμένων ψαριών για μοριακούς, γενετικούς και βιοχημικούς δείκτες και της μελέτης της αναγεννητικής ικανότητας. Εφόσον ακρωτηριαστούν με σωστό τρόπο, τα πτερύγια αναγεννούνται μέσα σε λίγες εβδομάδες (Westerfield, 2000).

Τα ουραία πτερύγια ακρωτηριάζονται ευκολότερα. Το ενήλικο ψάρι τοποθετείται σε νερό συστήματος με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος Tricaine methanesulfonate 0.4% ώστε να ακινητοποιηθεί και παράλληλα να αναπνέει φυσιολογικά. Στη συνέχεια, το αναισθητοποιημένο ψάρι ανασηκώνεται με τη χρήση λαβίδας και ακολουθεί τομή του ουραίου πτερυγίου με ψαλίδι (Εικόνα 3.6). Το ψάρι διατηρείται σε γλυκό νερό σε μεμονωμένο δοχείο ενός λίτρου ενώ ο απομονωμένος ιστός τοποθετείται σε eppendorf χωρητικότητας 0.5mL με 100 μ l διαλύματος απομόνωσης DNA και 2 μ l πρωτεϊνάσης K.



Εικόνα 3.6: Ακρωτηριασμός ουραίου πτερυγίου στο zebrafish και αναγέννηση. Ανατύπωση (Chassot et al., 2016)

Στη συνέχεια, τα δείγματα ουραίων πτερυγίων τοποθετούνται σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, στον οποίο εκτελούνται τα εξής στάδια:

- 55°C για 4 ώρες. Η πρωτεΐνάση K ενεργοποιείται καθώς τοποθετείται σε περιβάλλον με βέλτιστη θερμοκρασία και συμβάλλει στη διάλυση του ιστού και στην απελευθέρωση του γενετικού υλικού, διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς των πρωτεϊνών.
- 98°C για 10 λεπτά, για αδρανοποίηση του ενζύμου και διασφάλιση της σωστής διεξαγωγής της PCR που ακολουθεί. Σε περίπτωση που η πρωτεΐνάση K παραμείνει ενεργή, μπορεί να διασπάσει τη Taq πολυμεράση και να μην πραγματοποιηθεί πολυμερισμός.

Τα δείγματα γενετικού υλικού αποθηκεύονται στους -20°C.

3.5.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια μέθοδο βιοχημείας και μοριακής βιολογίας που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας αλληλουχίας DNA, χωρίς τη χρήση ζωντανών κυττάρων. Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA με τη χρήση μιας DNA πολυμεράσης, κατόπιν διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας. Η γνώση της αλληλουχίας του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων (εκκινητές), όπου καθένα είναι συμπληρωματικό για μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Ο εκκινητής που υβριδίζεται στον κλώνο 3'→5' ονομάζεται πρόσθιος (forward), ενώ ο εκκινητής που υβριδίζεται στον κλώνο 5'→3' ονομάζεται ανάστροφος (reverse). Απαραίτητα στοιχεία για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό DNA που χρησιμοποιείται σαν εκμαγείο για την παρασκευή αντιγράφων, την DNA πολυμεράση και τους εκκινητές, είναι το μείγμα δεοξυριβονουκλεοτιδίων (Deoxynucleotides, dNTPs), τα ιόντα μαγνησίου καθώς και ένα ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο περιέχει στοιχεία που βελτιστοποιούν την αντίδραση και τη δράση του ενζύμου.

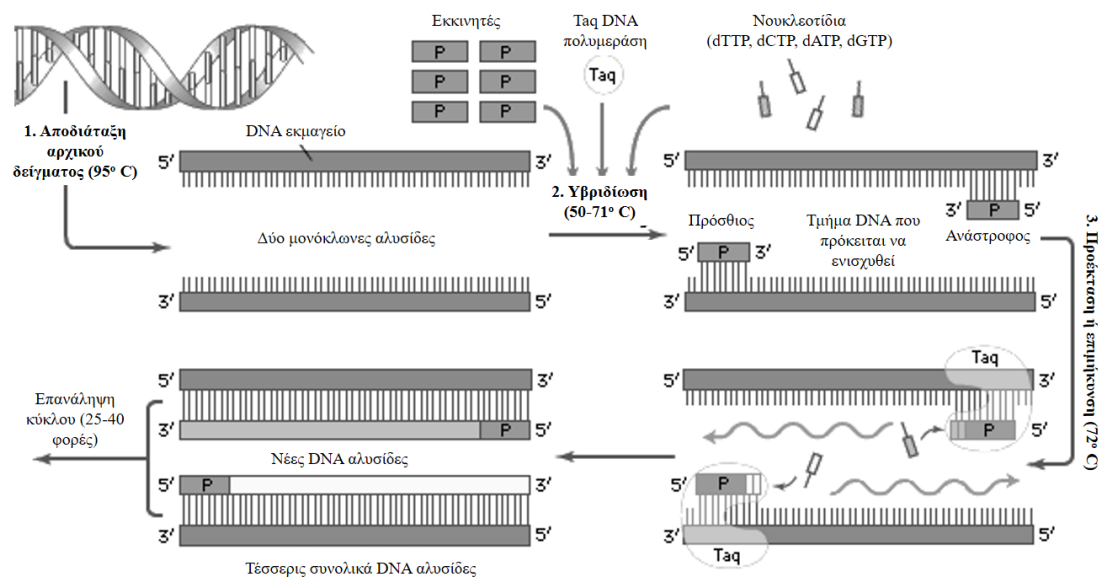
Η PCR αναπτύχθηκε το 1983 από τον Kary Mullis, ωστόσο η βασική αρχή της αντιγραφής ενός τμήματος DNA με τη χρήση δύο εκκινητών είχε ήδη διατυπωθεί από

τον Gobind Khorana το 1971 (Joshi and Deshpande, 2010). Ουσιαστική βελτίωση της τεχνικής παρατηρήθηκε με τη χρήση της DNA πολυμεράσης του βακτηρίου *Thermus aquaticus* (Taq), η οποία εξασφαλίζει τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας μιας μονόκλωνης αλυσίδας DNA, ενώ αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες αποδιάταξης του DNA. Μέχρι σήμερα η PCR έχει δεχθεί ποικίλες τροποποιήσεις και περιλαμβάνει πλήθος τεχνικών όπως η in situ PCR, η εσωτερική PCR, η πολλαπλή PCR, και η ποσοτική PCR σε πραγματικό χρόνο.

Τα πρωτόκολλα που χρησιμοποιούνται κάθε φορά ποικίλουν ανάλογα με τη δομή και το μέγεθος του DNA που χρησιμοποιείται ως εκμαγείο, τις απαιτήσεις του ενζύμου καθώς και τις βέλτιστες συνθήκες πρόσδεσης του εκκινητή. Ωστόσο, τα βασικά στάδια ενός κύκλου PCR είναι (Εικόνα 3.7):

1. Αποδιάταξη αρχικού δείγματος (denaturation): Θέρμανση στους 95°C για περίπου 15 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί το DNA με τη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου και την καταστροφή των δευτεροταγών και τριτοταγών δομών και η διπλή έλικα να ανοίξει σε δύο μονόκλωνες αλυσίδες.
2. Υβριδίαση (annealing): Μείωση θερμοκρασίας μεταξύ 50 και 71°C για 30-60 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών στο 3' άκρο κάθε αλυσίδας.
3. Προέκταση (extension) ή επιμήκυνση (elongation): Αύξηση θερμοκρασίας στους 72°C για 1 με 3 λεπτά, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Εκτελείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA χρησιμοποιώντας dNTPs του διαλύματος.
4. Αποδιάταξη προϊόντων: Θέρμανση στους 94°C για 30 με 60 δευτερόλεπτα, ώστε τα μικρά τμήματα του δίκλωνου DNA που δημιουργήθηκαν, να αποχωριστούν πάλι και να αποτελέσουν εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο σύνθεσης DNA (Lorenz, 2012).

Επαναλαμβάνονται 25-40 κύκλοι των σταδίων 2-4. Η χρονική διάρκεια προέκτασης του τελευταίου κύκλου είναι περίπου 5 με 10 λεπτά, ώστε να υπάρχει χρόνος για την επέκταση όλων των προϊόντων από τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση.



Εικόνα 3.7: Τα βασικά στάδια της μεθόδου PCR. Ανατύπωση (https://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm)

Στη συγκεκριμένη εργασία, η μέθοδος PCR ήταν απαραίτητη για την προετοιμασία δειγμάτων DNA ώστε να αποσταλούν για ανάλυση αλληλουχίας (sequencing), με τελικό σκοπό τη διευκρίνιση του γενετικού υποβάθρου ενήλικων zebrafish ως προς τη μεταλλαγή *3mst* (ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία) και κατ' επέκταση τον έλεγχο και τη συντήρηση των οικογενειών *3mst*^{-/-}. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που αναγράφονται στον Πίνακα 3.1. Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκια erpendorf του 0.5ml ήταν η παρακάτω:

- ✓ 5μl δείγματος DNA
- ✓ 2μl primer mix
- ✓ 0.2μl Taq πολυμεράσης
- ✓ 42.8μl PCR mix

Το primer mix κατασκευάστηκε με τη προσθήκη: 10μl πρόσθιου εκκινητή, 10μl ανάστροφου εκκινητή και 80μl ddH₂O.

Η παραπάνω αντίδραση πραγματοποιείται σε αυτόματο θερμικό κυκλοποιητή, ο οποίος μεταβαίνει αυτόματα στις καθορισμένες επιθυμητές θερμοκρασίες κάθε κύκλου. Το πρόγραμμα που πραγματοποιήθηκε ήταν το εξής:

1. 95°C για 5 λεπτά
2. 95°C για 1 λεπτό
3. 60°C για 1 λεπτό

4. 72°C για 1 λεπτό
5. Επανάληψη σταδίων 2-4 για 39 φορές
6. 72°C για 5 λεπτά
7. Διατήρηση επ' αόριστον στους 4°C

Τα προϊόντα της αντίδρασης διατηρούνται εν τέλει στους -20°C έως ότου ελεγχθούν με ηλεκτροφόρηση και υποστούν περαιτέρω επεξεργασία.

3.5.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση

Η ανάπτυξη της ηλεκτροφόρησης ξεκίνησε με το πρωτοποριακό έργο του Arne Wilhelm Kaurin Tiselius που αφορούσε τη μελέτη και το διαχωρισμό πρωτεϊνικών μειγμάτων, κυρίως αίματος. Συγκεκριμένα, ανέπτυξε την τεχνική ηλεκτροφόρησης κινούμενων ορίων (moving boundary electrophoresis, MBE), κατά την οποία μόρια διαχωρίζονται σε ελεύθερο διάλυμα με την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης, χρησιμοποιώντας ένα δοχείο σχήματος U και ένα ηλεκτρόδιο σε κάθε άκρο του (Tiselius, 1937). Η μέθοδος MBE σύντομα αντικαταστάθηκε από την ηλεκτροφόρηση ζώνης στην οποία το δείγμα τοποθετείται σε στερεό φορέα όπως διηθητικό χαρτί, οξική κυτταρίνη, πηκτή αμύλου κ.α. Από τη δεκαετία του '80, αυτές οι τεχνικές εξελίχθηκαν γρήγορα, μετατράπηκαν σε απαραίτητα βιοαναλυτικά εργαλεία και έγιναν θεμελιώδεις για μια ποικιλία βιοχημικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα, συμπεριλαμβανομένου του DNA fingerprinting, του ανοσοοστευτώματος κατά Western, του Southern Blot κλπ. Επιπρόσθετα, αποτελούν σημαντικές μεθόδους για τον καθαρισμό και ταυτοποίηση βιομορίων (πχ. DNA) που συνδέονται με προηγμένες μοριακές τεχνικές όπως η αλληλούχιση ή η PCR.

Πιο συγκεκριμένα, η ανίχνευση των προϊόντων της PCR μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, που εξαρτώνται από τον πιθανό ιχνηθέτη με τον οποίο είναι σημασμένο το προϊόν της αντίδρασης. Ο πιο κλασσικός τρόπος είναι η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του δείγματος, παράλληλα με γνωστή ποσότητα DNA-δείκτη μοριακού βάρους (M.W. DNA marker), ώστε να μπορεί να καθοριστεί το μέγεθος των μορίων του προϊόντος. Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στην αρχή ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο μπορεί να μετακινηθεί, χρησιμοποιώντας την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου.

Η αγαρόζη αποτελεί έναν πολυσακχαρίτη που απομονώνεται από ορισμένα είδη φυκών. Το πήκτωμα αγαρόζης παρασκευάζεται με διάλυση συγκεκριμένης ποσότητας στερεής αγαρόζης σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Η στερεή αγαρόζη διαλύεται με βρασμό και το διάλυμα τοποθετείται σε ειδική φόρμα σχηματισμού όπου στερεοποιείται και μετατρέπεται σε ένα πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα.

Κατά την ηλεκτροφόρηση το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε μια συσκευή η οποία περιέχει κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Ακολούθως, τα δείγματα DNA αφού έχουν υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία φορτώνονται σε ειδικές εσοχές που έχουν δημιουργηθεί στο πήκτωμα, πριν αυτό στερεοποιηθεί. Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων, στο πήκτωμα εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο και το DNA, λόγω του αρνητικού του φορτίου, μεταναστεύει από τον θετικό πόλο προς τον αρνητικό πόλο με ταχύτητα εξαρτώμενη από το μέγεθος του.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η χρώση του πηκτώματος με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει πορτοκαλί χρώμα στα σημεία όπου υπάρχει DNA, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε επιτυγχάνεται ποιοτικός προσδιορισμός του προϊόντος. Πρέπει να σημειωθεί ότι το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στη μεγάλη αύλακα της δίκλωνης αλυσίδας του DNA και είναι μεταλλαξιογόνο μόριο.

Για την επιβεβαίωση της διεξαγωγής της αντίδρασης, χρησιμοποιείται ως θετικός μάρτυρας δείγμα DNA που είναι γνωστό ότι φέρει τη συγκεκριμένη αλληλουχία και το οποίο έχει υποβληθεί σε PCR. Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται δείγμα στο οποίο το DNA εκμαγείο έχει αντικατασταθεί με ddH₂O, ώστε να εξακριβωθεί η περίπτωση μόλυνσης της αντίδρασης με μη επιθυμητό DNA.

Η διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης 1% w/v πραγματοποιείται ως εξής:

- Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x.
- Ζύγισμα 1gr αγαρόζης, τοποθέτηση αυτής σε γυάλινη κωνική φιάλη και προσθήκη 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x.
- Θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων και ανάδευση ώστε να διαλυθεί η αγαρόζη.
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει στους 50-55°C.

- Προσθήκη 8μl βρωμιούχου αιθιδίου στο διάλυμα αγαρόζης.
- Τοποθέτηση του διαλύματος αγαρόζης σε ειδική φόρμα σχηματισμού και πήξη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος TAE 1x στη δεξαμενή ηλεκτροφόρησης.

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων είναι ως εξής:

- Προετοιμασία δειγμάτων ηλεκτροφόρησης με προσθήκη 5μl δείγματος DNA, 2μl loading dye 6x και 5μl ddH₂O σε σωληνάκια eppendorfs του 0.5ml.
- Φόρτωση δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης.
- Τοποθέτηση 3μl DNA-δείκτη 2-log ladder στο πήκτωμα αγαρόζης.
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε ένταση ρεύματος 50mAmp (τάση 80-120 Volt) για περίπου 20 λεπτά.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται σε θάλαμο με λάμπα UV και κάμερα, και φωτογραφίζεται.

3.5.6 Καθαρισμός προϊόντος PCR

Για τον καθαρισμό του προϊόντος της PCR από τους εκκινητές αλλά και από τα εναπομείναντα νουκλεοτίδια ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ExoSAP clean up. Η συγκεκριμένη μέθοδος ελαχιστοποιεί την απώλεια δείγματος που επέρχεται με τον καθαρισμό μέσω στηλών και οδηγεί στον καθαρισμό του ενισχυμένου τμήματος DNA με δύο μόνο επώσεις. Συγκεκριμένα, η αντίδραση σε eppendorf του 0.5ml που πραγματοποιήθηκε ήταν η παρακάτω:

- ✓ 15μl προϊόντος PCR
- ✓ 0.025 μl ExoI (20u/l) (για διάσπαση εκκινητών)
- ✓ 0.25μl rSAP (1u/μl) (για αποφωσφορυλίωση νουκλεοτιδίων)
- ✓ 4.725μl ddH₂O

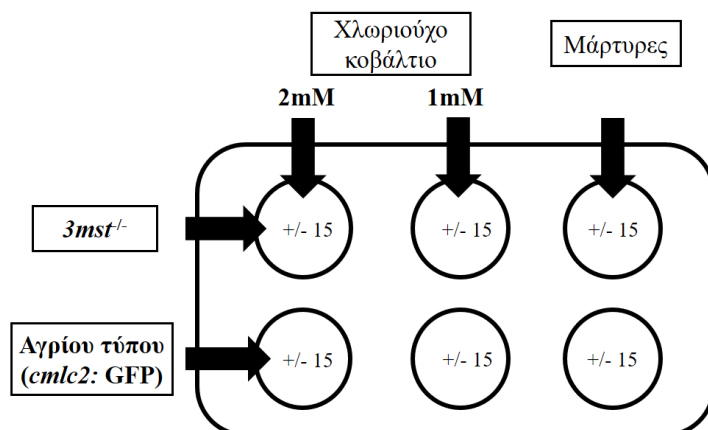
Στη συνέχεια, σε θερμικό κυκλοποιητή ρυθμίζεται και εκτελείται το εξής πρόγραμμα:

1. 37°C για 30 λεπτά
2. 85°C για 20 λεπτά

Κάθε δείγμα στέλνεται για αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen Europe (The Netherlands) με 5μl καθαρό DNA και 5pmol/μl πρόσθιο εκκινητή.

3.5.7 Χημικές δοκιμές

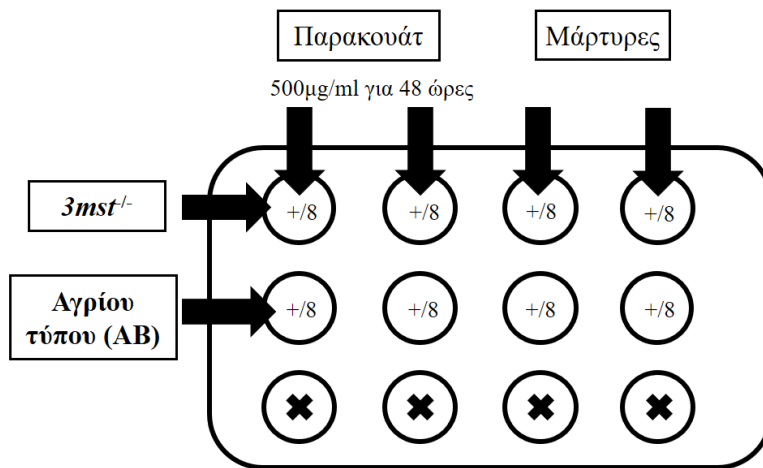
Κατά τη χορήγηση **Χλωριούχου Κοβαλτίου** (Cobalt chloride, CoCl_2) ακολουθήθηκε η εξής διάταξη (Εικόνα 3.8):



Εικόνα 3.8: Διάταξη πλάκας 6 φρεατίων κατά την εξωγενή χορήγηση CoCl_2 . Ο αριθμός των εμβρύων που τοποθετείται αναγράφεται στο εσωτερικό κάθε φρεατίου. Η συγκεκριμένη ένωση χορηγείται σε έμβρυα ηλικίας μίας ημέρας (1dpf), αφού έχουν απελευθερωθεί από το χόριο.

Κάθε φρεάτιο περιέχει 3ml EW στο οποίο είναι διαλυμένη η χημική ένωση στην κατάλληλη αραιώση ανάλογα με την επιθυμητή συγκέντρωση. Τα έμβρυα-μάρτυρες (control) τοποθετούνται σε καθαρό EW, δίχως CoCl_2 . Η πλάκα φυλάσσεται στους 28°C στον θάλαμο επώασης. Κάθε 24 ώρες γίνεται παρατήρηση των φρεατίων, λήψη φωτογραφιών και βιντεοσκόπηση στο στερεοσκόπιο όποτε κρίνεται απαραίτητο, μέχρι τις 6 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

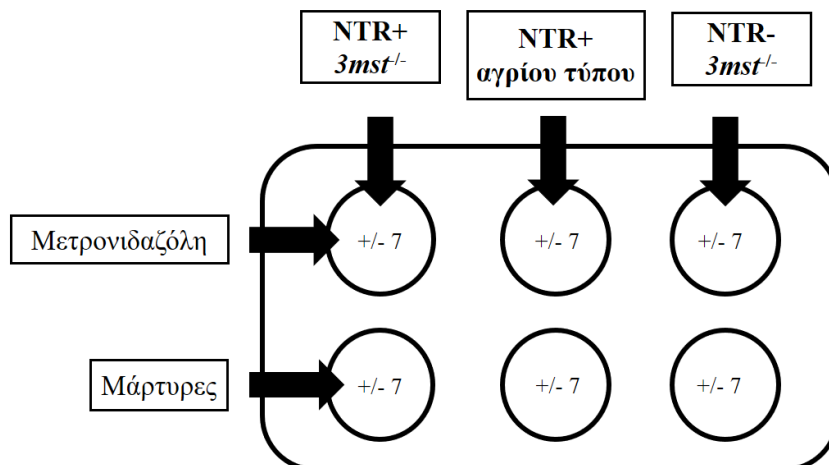
Για τη χορήγηση **Παρακουάτ** (Paraquat, PQ) ακολουθήθηκε η διάταξη που παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.9. Συγκεκριμένα, κάθε φρεάτιο περιέχει 1.5ml EW με PTU στο οποίο αραιώνεται κατάλληλα το αρχικό διάλυμα PQ. Οι προνύμφες-μάρτυρες τοποθετούνται σε καθαρό EW αποκλειστικά με PTU. Η πλάκα φυλάσσεται στους 28°C στον ειδικό επωαστικό θάλαμο. Η παρεμπόδιση της ανάπτυξης των μελανοκυττάρων με την προσθήκη PTU είναι απαραίτητη για τη μέτρηση του καρδιακού ρυθμού που εκτελείται μετά το πέρας της 48ωρης επώασης στο PQ. Παράλληλα καταγράφονται τα ποσοστά θνησιμότητας.



Εικόνα 3.9: Διάταξη πλάκας 12 φρεατίων κατά την εξωγενή χορήγηση PQ. Ο αριθμός των ατόμων που τοποθετείται αναγράφεται στο εσωτερικό κάθε φρεατίου. Η συγκεκριμένη ένωση χορηγείται σε προνύμφες ηλικίας πέντε ημερών (5dpf).

Σε προκαταρκτικά πειράματα δοκιμάστηκαν συνολικά τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις παρακουάτ (50µg/mL, 500µg/mL και 1mg/mL) σε προνύμφες ηλικίας μίας, τεσσάρων και πέντε ημερών, οδηγώντας στην επιλογή των δεδομένων συνθηκών χορήγησης PQ. Επίσης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις καρδιακού ρυθμού και παρατηρήθηκε η θνησιμότητα των προνυμφών αρχικά στις 24 και 36 ώρες ώστε εν τέλει να εφαρμοστεί η 48ωρη επώαση σε παρακουάτ.

Κατά την επίδραση με **μετρονιδαζόλη (Mtz)** (Εικόνα 3.10):

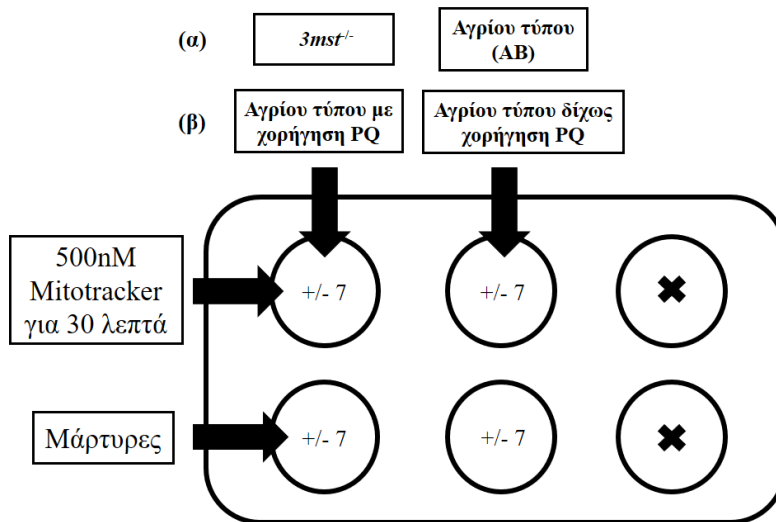


Εικόνα 3.10: Διάταξη πλάκας 6 φρεατίων κατά την εξωγενή χορήγηση Mtz. Ο αριθμός των ατόμων που τοποθετείται αναγράφεται στο εσωτερικό κάθε φρεατίου. Με τη συγκεκριμένη διάταξη μελετήθηκε η επίδραση (α) 2mM μετρονιδαζόλης για 3 ώρες σε έμβρυα ηλικίας 2 ημερών και (β) 1mM μετρονιδαζόλης για 4 ώρες σε έμβρυα ηλικίας 3 ημερών.

Κάθε φρεάτιο περιέχει 3ml EW και PTU με 0.2% DMSO στο οποίο αραιώνεται κατάλληλα το αρχικό διάλυμα Mtz. Τα έμβρυα-μάρτυρες τοποθετούνται σε καθαρό EW αποκλειστικά με 0.2% DMSO και PTU. Η πλάκα φυλάσσεται στους 28°C στον ειδικό θάλαμο, καλυμμένη πλήρως με προστατευτικό ώστε να αποφευχθεί η απενεργοποίηση της μετρονιδαζόλης από το φως. Μετά το πέρας του κατάλληλου χρόνου επώασης, όλα τα φρεάτια ξεπλένονται με EW+PTU τρεις φορές και ακολουθεί παρατήρηση των εμβρύων και λήψη φωτογραφιών στο στερεοσκόπιο. Η καταγραφή της απόκρισης των zebrafish και η φωτογράφιση επαναλαμβάνεται κάθε 24 ώρες, μέχρι τις 3-4 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση.

Σημείωση: Πριν τη διεξαγωγή όλων των παραπάνω χημικών δοκιμών, τα έμβρυα που προκύπτουν από τις διασταυρώσεις παρατηρούνται στο στερεοσκόπιο και εφόσον έχουν φυσιολογική μορφολογία και κινητικότητα, τοποθετούνται στα φρεάτια των πλακών για τη χορήγηση της κατάλληλης χημικής ένωσης. Τα προβληματικά άτομα δεν χρησιμοποιούνται ώστε να μην παρεμποδίσουν την ερμηνεία του πιθανού φαινοτύπου. Επιπρόσθετα, σε περίπτωση που εντοπιστούν νεκρά άτομα στη πορεία της χημικής δοκιμής, αφαιρούνται για να μη μεταβληθεί η σύσταση του διαλύματος των φρεατίων και επηρεαστεί η βιωσιμότητα των υπόλοιπων εμβρύων.

Κατά τη χορήγηση της **φθορίζουσας χρωστικής Mitotracker** τόσο για (α) τη σύγκριση σήμανσης *3mst^{-/-}* και αγρίου τύπου εμβρύων όσο και για (β) τη μελέτη της επίδρασης του PQ σε προνύμφες αγρίου τύπου, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία που παρουσιάζεται στην εικόνα 3.11. Οι τιμές της συγκέντρωσης και του χρόνου επώασης που αναγράφονται στην συγκεκριμένη εικόνα επιλέχθηκαν ύστερα από αξιολόγηση και σύγκριση διαφορετικών δημοσιευμένων μεθόδων εφαρμογής του Mitotracker σε έμβρυα zebrafish (Lin et al., 2006; Esaki et al., 2007).



Εικόνα 3.11: Διάταξη πλάκας 6 φρεατίων κατά την εξωγενή χορήγηση Mitotracker. Ο αριθμός των ατόμων που τοποθετείται αναγράφεται στο εσωτερικό κάθε φρεατίου. Με τη συγκεκριμένη διάταξη μελετήθηκε το πρότυπο σήμανσης (α) *3mst^{-/-}* και αγρίου τύπου εμβρύων ηλικίας 55, 72 και 96 ωρών μετά τη γονιμοποίηση (hrpf) και (β) προνυμφών αγρίου τύπου ηλικίας 7 ημερών που έχουν υποστεί είτε όχι επίδραση με PQ.

Κάθε φρεάτιο περιέχει 3ml EW με PTU στο οποίο προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αρχικού διαλύματος Mitotracker. Τα έμβρυα-μάρτυρες τοποθετούνται σε καθαρό EW αποκλειστικά με PTU. Η αναστολή της ανάπτυξης των μελανοκυττάρων με την προσθήκη PTU κρίνεται απαραίτητη για την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο που ακολουθεί μετά το πέρας της επώασης. Η πλάκα φυλάσσεται στους 28°C στον ειδικό επωαστικό θάλαμο, προστατευμένη από το φως.

Για την παρατήρηση των εμβρύων μετά την επώαση με Mitotracker, πραγματοποιείται εγκλεισμός του καθενός με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια σταγόνα (25μl) Low Melting Agarose 1.2%, η οποία διαλύεται σε αναισθητικό Tricaine 0.4%. Ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση των εμβρύων στο συνεστιακό μικροσκόπιο, με αριθμό steps ίσο με 15.

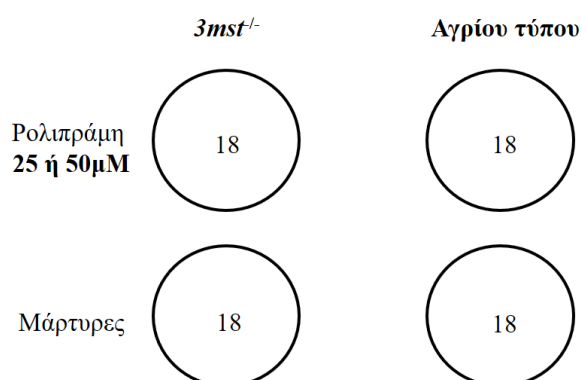
3.5.8 Δοκιμασία θιγμοτακτισμού

Ως θιγμοτακτισμός ορίζεται η τάση που έχουν τα ψάρια για συγκεκριμένο προσανατολισμό στο χώρο, η οποία τροφοδοτείται και από την τάση τους να βρίσκονται σε επαφή με κάποιο αντικείμενο. Αυτός ο τύπος κινητικής απόκρισης αποτελεί έναν επικυρωμένο δείκτη άγχους στο zebrafish τόσο σε εμβρυικά όσο και σε

ενήλικα στάδια (Richendrfer et al., 2012; Shams et al., 2015). Η χορήγηση της ρολιπράμης (Rolipram) επάγει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά (Lundegaard et al., 2015).

Στη παρούσα εργασία, έμβρυα zebrafish τοποθετήθηκαν σε ανοικτό πεδίο (τρυβλία Petri διαμέτρου 10cm με 30ml EW στο καθένα) και ύστερα καταγράφηκε η τοποθέτησή τους και η επιλογή προσανατολισμού παρουσία ή απουσία φαρμάκου που προκαλεί άγχος. Συγκεκριμένα, η διαδικασία πραγματοποιείται ως εξής:

- Προετοιμασία τεσσάρων τρυβλίων Petri διαμέτρου 10cm με 30ml EW και 18 έμβρυα ηλικίας 2 ημερών (2dpf) στο καθένα. Εξηγώντας, ετοιμάζονται δύο τρυβλία με $3mst^{-/-}$ έμβρυα και δύο τρυβλία με έμβρυα αγρίου τύπου και αφήνονται στους 28°C στον ειδικό επωαστικό θάλαμο.
- Αφαίρεση EW και προσθήκη 30ml κατάλληλου διαλύματος ανά τρυβλίο την επόμενη ημέρα, σύμφωνα με την παρακάτω διάταξη (Εικόνα 3.12):



Εικόνα 3.12: Διάταξη για μέτρηση ποσοστού θιγμοτακτισμού $3mst^{-/-}$ και αγρίου τύπου εμβρύων μετά από χορήγηση ρολιπράμης. . Ο αριθμός των ατόμων που τοποθετείται αναγράφεται στο εσωτερικό κάθε τρυβλίου. Η συγκεκριμένη ένωση χορηγείται σε έμβρυα ηλικίας 3 ημερών (3dpf).

Κάθε τρυβλίο περιέχει 30ml EW στο οποίο αραιώνεται κατάλληλα το αρχικό διάλυμα ρολιπράμης. Τα έμβρυα-μάρτυρες τοποθετούνται σε καθαρό EW με ποσότητα DMSO αντίστοιχη αυτής που προστίθεται στα τρυβλία με ρολιπράμη. Πρέπει να αναφερθεί πως πριν την προσθήκη των διαλυμάτων που παρασκευάζονται, προηγείται επώαση αυτών για 10 λεπτά στους 28°C.

- Επώαση τρυβλίων στους 28°C για μία ώρα.
- Μέτρηση θιγμοτακτισμού. Συγκεκριμένα, εκτελούνται ταυτόχρονα 10 ανακινήσεις στα δύο τρυβλία που έχει προστεθεί ρολιπράμη προκειμένου τα

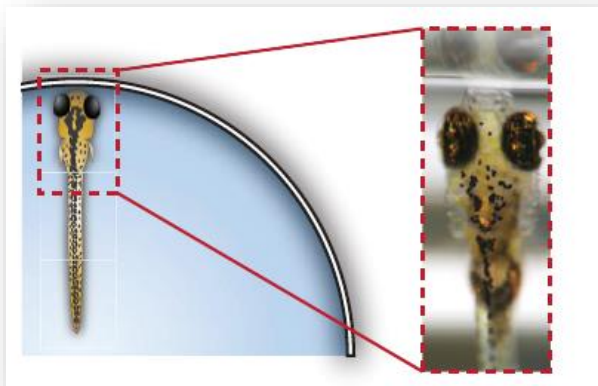
έμβρυα να τοποθετηθούν στο κέντρο του ανοικτού πεδίου. Η διάταξη βιντεοσκοπείται για 30 δευτερόλεπτα και ύστερα καταγράφεται ο αριθμός των εμβρύων που βρίσκονται σε επαφή με τα τοιχώματα των τρυβλίων (Εικόνα 3.13). Ακολουθεί επανάληψη των παραπάνω βημάτων ώστε συνολικά να γίνουν πέντε μετρήσεις. Η διαδικασία που περιεγράφηκε επαναλαμβάνεται και για τα τρυβλία με τα έμβρυα-μάρτυρες.

- Επώαση τρυβλίων στους 28°C συνολικά για τέσσερις ώρες.
- Μέτρηση θιγμοτακτισμού.

Το ποσοστό θιγμοτακτισμού από κάθε μέτρηση υπολογίζεται ως εξής:

$$\text{Ποσοστό θιγμοτακτισμού (\%)} = \frac{\text{αριθμός εμβρύων που ακουμπούν στα τοιχώματα}}{\text{συνολικός αριθμός εμβρύων τρυβλίου}} \times 100$$

Ακολουθεί στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση της συμπεριφοράς θιγμοτακτισμού. Μετά το πέρας των 30 δευτερολέπτων, καταγράφονται αποκλειστικά τα έμβρυα που βρίσκονται σε επαφή με τα τοιχώματα των τρυβλίων. Πηγή (Lundegaard et al., 2015).

3.5.9 Μέτρηση καρδιακού ρυθμού

Η μέτρηση του καρδιακού ρυθμού εκτελείται μετά το πέρας της 48ωρης επώασης με Παρακουάτ (PQ) σε προνύμφες ηλικίας 7 ημερών (7dpf). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- Ξέπλυμα όλων των φρεατίων με καθαρό EW και PTU τρεις φορές.

- Προσθήκη 3ml EW και PTU σε κάθε φρεάτιο και τοποθέτηση πλάκας στον ειδικό επωαστικό θάλαμο στους 28°C.
- Προετοιμασία τρυβλίου Petri με 400μl αναισθητικό Tricaine 0.4% σε 25ml EW και PTU ώστε να αποφευχθεί η κινητικότητα των προνυμφών κατά τη διάρκεια βιντεοσκόπησης. Η τελική συγκέντρωση Tricaine στο διάλυμα είναι κατάλληλη ώστε να μην επηρεάζει τον καρδιακό ρυθμό των ατόμων zebrafish (Chan et al., 2009). Το τρυβλίο επωάζεται στους 28°C για 10 λεπτά.
- Τοποθέτηση μίας προνύμφης από τη πλάκα 12 φρεατίων στο τρυβλίο με το αναισθητικό για 2 λεπτά ακριβώς.
- Τοποθέτηση προνύμφης σε ειδική αντικειμενοφόρο με φρεάτιο και βιντεοσκόπηση στο στερεοσκόπιο με εστίαση στη καρδιά για 10 δευτερόλεπτα, μέσω του προγράμματος IC Capture 2.2. Οι ρυθμίσεις βιντεοσκόπησης είναι κατάλληλες ώστε να λαμβάνονται τουλάχιστον 120 καρέ ανά δευτερόλεπτο (frames per second, fps).

Πρέπει να σημειωθεί πως η διαδικασία μεταφοράς των προνυμφών από τη πλάκα στο τρυβλίο και από το τρυβλίο στην αντικειμενοφόρο λαμβάνει χώρα στον επωαστικό θάλαμο στους 28°C προς αποφυγή μεταβολής του καρδιακού ρυθμού λόγω θερμοκρασιακών αλλαγών. Επίσης, οι προνύμφες λαμβάνονται για βιντεοσκόπηση από τα φρεάτια της πλάκας εναλλάξ ώστε να μειώνεται διαδοχικά ο όγκος του διαλύματος των φρεατίων και να μην επιβαρύνονται ορισμένες προνύμφες περισσότερο. Μετά τη λήψη των βιντεοσκοπήσεων, μετρούνται οι κτύποι στα 10 δευτερόλεπτα για κάθε δείγμα και οι τιμές ανάγονται σε κτύπους ανά λεπτό (καρδιακός ρυθμός). Ακολουθεί στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

3.5.10 Κυτταροκαλλιέργειες – Διατήρηση σε άσηπτες συνθήκες

Ως κυτταροκαλλιέργεια θεωρούμε τη διατήρηση και ανάπτυξη κυττάρων *in vitro* για περισσότερες από 24 ώρες, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Πρωτοπόρος στην καλλιέργεια κυττάρων ήταν ο Ross Granville Harrison, ο οποίος επέτυχε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα να διατηρήσει νευρικά ζωντανά και να παρατηρήσει την εξέλιξη τους έξω από το σώμα του ζώου (Harrison, 1910).

Η επιτυχημένη διατήρηση των κυτταροκαλλιεργειών εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τα μέτρα αποστείρωσης που λαμβάνονται προκειμένου να περιοριστεί η

μικροβιακή αύξηση. Γι' αυτό το λόγο, ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται σε θάλαμο νηματικής ροής (hood), ο οποίος αποτελείται από ειδικούς ηθμούς υψηλής απόδοσης που έχουν την δυνατότητα να συγκρατούν το 99.97% των σωματιδίων διαμέτρου 0.3 μm. Ο θάλαμος πρέπει να λειτουργήσει για τουλάχιστον 15 με 20 λεπτά πριν τη χρήση, προκειμένου να διηθηθεί ο αέρας και να διασφαλιστεί η εργασία υπό άσηπτες συνθήκες.

Ένα επιπρόσθετο μέτρο ασφαλείας προκειμένου να μειωθεί η πιθανότητα μόλυνσης των κυτταροκαλλιεργειών είναι η λειτουργία, τόσο στο χώρο φύλαξης των κυττάρων όσο και στο θάλαμο νηματικής ροής, λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας UV για 20 λεπτά πριν από οποιαδήποτε εργασία. Η υπεριώδης ακτινοβολία δρα καταστρέφοντας το DNA των κυττάρων που εκτίθενται σε αυτή, λόγω της δημιουργίας διμερών θυμιδίνης στις νουκλεοτιδικές αλυσίδες.

Για τη διατήρηση των άσηπτων συνθηκών οποιοδήποτε αντικείμενο (όπως φλάσκες, πλάκες) μεταφέρεται στο θάλαμο νηματικής ροής ψεκάζεται με 70% αιθανόλη (v/v). Η αντισηπτική δράση της αλκοόλης οφείλεται στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και την παρέμβαση που προκαλεί στο μεταβολισμό των μικροβίων, καθώς και στη διατάραξη της ακεραιότητας του κυτταροπλάσματος και της κυτταρικής μεμβράνης. Τέλος, με τη μέθοδο υγρής θερμότητας σε αυτόκαυστο αποστειρώνονται λοιπά υλικά όπως διαλύματα (PBS), ρύγχη κλπ.

3.5.11 Ανακαλλιέργεια φλάσκας

Οι καρδιακοί μυοβλάστες H9c2 καλλιεργούνται σε ειδικές φλάσκες 75cm², οι οποίες αποτελούν κατάλληλη επιφάνεια προσκόλλησης. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θρεπτικό μέσο DMEM εμπλουτισμένο με 10% (v/v) απενεργοποιημένο ορό βοδιού (FBS) για την κάλυψη των ενεργειακών τους απαιτήσεων και παρουσία αντιβιοτικών (στρεπτομυκίνης και πενικιλίνης) για την αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων. Η διατήρηση τους γίνεται σε επωαστικό κλίβανο σε ατμόσφαιρα 95% αέρα/5% CO₂ στους 37°C.

Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά περιλαμβάνει μερικώς διαφοροποιημένα καρδιομυοκύτταρα τα οποία διατηρούν την πολλαπλασιαστική τους ικανότητα. Συνεπώς, κρίνεται αναγκαία η συχνή ανακαλλιέργεια (subculture) της φλάσκας, δηλαδή η αραιώση και η απομάκρυνση μιας ποσότητας κυττάρων με σκοπό τη μείωση

της συγκέντρωσης και την εξασφάλιση της επιβίωσης τους. Η διαδικασία αυτή εκτελείται σε άσηπτες συνθήκες κάθε 2-3 ημέρες, με την προϋπόθεση ότι τα κύτταρα καλύπτουν ικανοποιητικό ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας (πληρότητα 70-90%).

Περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

- Απομάκρυνση θρεπτικού υλικού και κατ' επέκταση αφαίρεση νεκρών και γερασμένων κυττάρων.
- Πλύση με 4ml διαλύματος PBS 1x για απομάκρυνση αναστολέα τρυψίνης που περιέχεται στα φυσικά συστατικά του ορού FBS, μεταβολικών παραπροϊόντων και εναπομείναντος θρεπτικού μέσου.
- Απομάκρυνση διαλύματος PBS και προσθήκη 1.5 ml τρυψίνης. Η τρυψίνη είναι ένα ένζυμο που συμβάλλει στην απομάκρυνση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Ακολουθεί επώαση στον κλίβανο στους 37°C για 2-3 λεπτά ώστε να ενεργοποιηθεί το ένζυμο και να υδρολυθούν οι πρωτεΐνες δέσμευσης των κυττάρων στο υπόστρωμα. Η μηχανική αποκόλληση υποβοηθείται με προσεκτικά χτυπήματα στα τοιχώματα της φλάσκας.
- Προσθήκη 4ml θρεπτικού μέσου DMEM εμπλουτισμένου με 10% (v/v) FBS και αντιβιοτικά. Ο ορός αναστέλλει τη δράση της τρυψίνης. Ακολουθεί ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας (pipet up-down) για την ομοιόμορφη κατανομή των κυττάρων σε όλο τον όγκο του υγρού και μεταφορά του διαλύματος σε αποστειρωμένο σωλήνα falcon των 15ml. Παράλληλα, μικρή ποσότητα διαλύματος αφήνεται στη φλάσκα και αραιώνεται με 4ml θρεπτικού μέσου DMEM εμπλουτισμένου με 10% (v/v) FBS και αντιβιοτικά. Η φλάσκα επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο ώστε να συνεχιστεί η κυτταρική ανάπτυξη και ο πολλαπλασιασμός.

Αξίζει να αναφερθεί πως προηγείται επώαση στους 37°C τόσο του διαλύματος PBS όσο και του εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου DMEM πριν την προσθήκη στα κύτταρα προς αποφυγή πρόκλησης θερμικού σοκ.

3.5.12 Καταμέτρηση κυττάρων – Ετοιμασία πλάκας

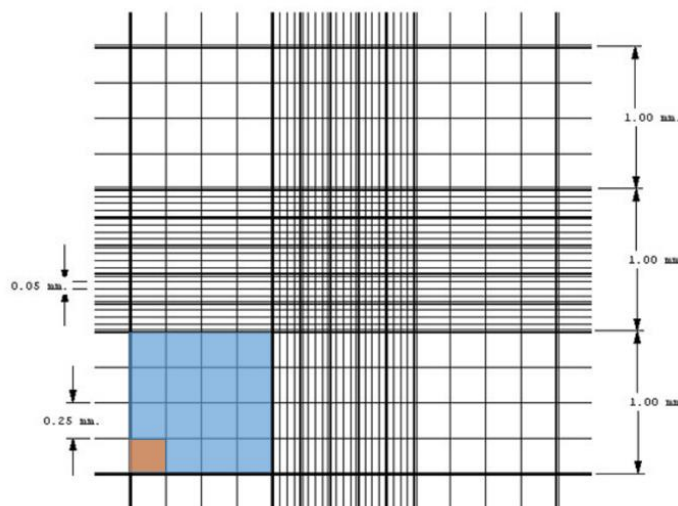
Το διάλυμα κυττάρων που προκύπτει από την ανακαλλιέργεια φλάσκας χρησιμοποιείται για την επίστρωση των καλυπτρίδων του πειράματος

ανοσοκυτταροχημείας. Η πυκνότητα των κυττάρων ανά καλυπτρίδα είναι συγκεκριμένη, συνεπώς είναι απαραίτητη η καταμέτρηση των κυττάρων που περιέχονται στο διάλυμα πριν αυτά προστεθούν στην επιφάνεια των καλυπτρίδων. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη βοήθεια της πλάκας Neubauer ή αιμοκυτταρόμετρου.

Το αιμοκυτταρόμετρο είναι μια τροποποιημένη και διαβαθμισμένη αντικειμενοφόρος πλάκα, που αποτελείται από δύο κατάλληλα επεξεργασμένες, λείες επιφάνειες μέτρησης κυττάρων οι οποίες χωρίζονται από ένα αυλάκι που έχει σχήμα Η. Κάθε επιφάνεια έχει εμβαδόν 3mm x 3mm και διακρίνεται σε 9 διαφορετικές υποπεριοχές πλάτους 1mm (άρα το εμβαδόν κάθε τετραγώνου είναι 1mm²). Κάθε υποπεριοχή χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5μm και χρησιμεύουν στον καθορισμό της θέσης των κυττάρων (Εικόνα 3.14). Ο όγκος του κυτταρικού εναιωρήματος που καλύπτει ένα από τα 9 μεγαλύτερα τετράγωνα είναι 0.1 mm³ (0.1mm² x 0.1mm βάθος) ή 1 x 10⁻⁴ mL. Μεταφέροντας ~10μl στην πλάκα Neubauer και μετρώντας τα κύτταρα στα 4 μεγάλα γωνιακά τετράγωνα προσδιορίζεται η συγκέντρωση του διαλύματος κυττάρων (αριθμός κυττάρων/mL) με τον εξής τρόπο:

$$\text{Συγκέντρωση εναιωρήματος} = \text{Μέσος όρος αριθμού κυττάρων από τα 4 τετράγωνα} \times 10^4$$

Αφού εκτιμηθεί η συγκέντρωση του κυτταρικού διαλύματος, υπολογίζεται η αραιώση με θρεπτικό μέσο που πρέπει να πραγματοποιηθεί ώστε στη συνέχεια να διαμοιραστεί το εναιώρημα στις καλυπτρίδες του πειράματος ανοσοκυτταροχημείας. Συγκεκριμένα, το διάλυμα αραιώνεται ώστε τελικά να περιέχονται περίπου 50.000 κύτταρα ανά καλυπτρίδα. Πρέπει να αναφερθεί πως τα κύτταρα δεν προσκολλώνται στον άργιλο, γι' αυτό το λόγο οι καλυπτρίδες έχουν υποστεί επεξεργασία με πολυλυσίνη σε στείρες συνθήκες, η οποία μιμείται το πλαστικό υλικό και ενισχύει τη δέσμευση των κυττάρων στην επιφάνεια των καλυπτρίδων. Στη συνέχεια τοποθετείται μία καλυπτρίδα πολυλυσίνης ανά πηγαδάκι σε πλάκα 24 φρεατίων. Τελικά, προστίθεται 0.5mL κατάλληλα αραιωμένου εναιωρήματος σε κάθε φρεάτιο ώστε να καλύπτεται πλήρως η επιφάνεια της καλυπτρίδας και η πλάκα φυλάσσεται στον κλίβανο επώασης.



Εικόνα 3.14: Υποδιαιρέσεις της επιφάνειας του αιμοκυτταρόμετρου στις οποίες γίνεται η μέτρηση των κυττάρων. Η επιφάνεια έχει εμβαδόν 3mm x 3mm και διακρίνεται σε 9 διαφορετικές υποπεριοχές πλάτους 1mm (γαλάζιο χρώμα). Κάθε υποπεριοχή χωρίζεται σε μικρότερα τετράγωνα από τρεις παράλληλες γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 2.5μm (πορτοκαλί χρώμα). Στη περιφερειακή περιοχή αξιοποιούνται τα 4 γωνιακά μεγάλα τετράγωνα για την αρίθμηση των καρδιομυοκυττάρων. (<http://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>)

3.5.13 Στέρηση ορού – Επίδραση με T₃ και BrdU

Προκειμένου να αποκλειστεί η περίπτωση λήψης πειραματικού αποτελέσματος εξαιτίας των ποικίλων συστατικών του ορού παρά των ακόλουθων επιδράσεων επέρχεται στέρηση ορού. Συγκεκριμένα, περίπου 6 ώρες μετά την τοποθέτηση του εναιωρήματος κυττάρων στις καλυπτρίδες, αφαιρείται το υπάρχον πλήρες θρεπτικό υλικό και αντικαθίσταται με 0.5ml θρεπτικού μέσου δίχως ορό ανά φρεάτιο. Ακολουθεί επώαση της πλάκας στον κλίβανο για 18 ώρες (overnight). Μετά το πέρας του απαραίτητου χρόνου στέρησης ορού, πραγματοποιούνται τα εξής βήματα:

- Απομάκρυνση θρεπτικού μέσου δίχως FBS και προσθήκη 0.5ml ανά φρεάτιο DMEM με κατάλληλα αραιωμένο διάλυμα T₃ ώστε η τελική συγκέντρωση επίδρασης να είναι ίση με 40ng/ml. Στα φρεάτια που περιέχουν κύτταρα-μάρτυρες προστίθεται αποκλειστικά θρεπτικό μέσο DMEM δίχως FBS.
- Επώαση πλάκας στον κλίβανο στους 37°C για 24 ώρες.
- Τέσσερις ώρες πριν λήξει η 24ωρη επώαση στους 37°C με T₃, αντικαθίσταται το υπάρχον διάλυμα με 0.5ml ανά φρεάτιο DMEM με κατάλληλα αραιωμένο διάλυμα T₃ και Βρωμο-δεοξυ-ουριδίνης (5-Bromo-2'-deoxyuridine, BrdU), έχοντας τελική συγκέντρωση 40ng/ml και 0.01mM αντίστοιχα. Στα φρεάτια

που περιέχουν κύτταρα-μάρτυρες προστίθεται αποκλειστικά θρεπτικό μέσο DMEM με BrdU σε συγκέντρωση 0.01mM.

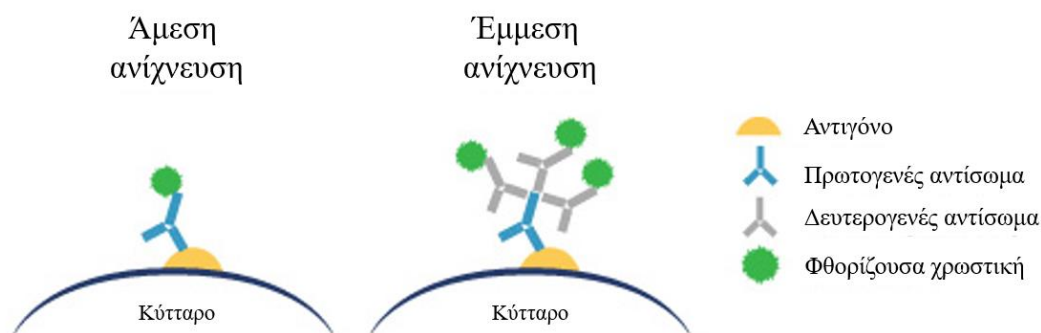
- Τοποθέτηση πλάκας σε πάγο και αφαίρεση υπάρχοντος διαλύματος ανά φρεάτιο.
- Προσθήκη 0.5ml Παραφορμαλδεΐδης (Paraformaldehyde, PFA) 4% η οποία διατηρείται στους 4°C, ανά φρεάτιο. Η πλάκα αφήνεται στον πάγο για 10 λεπτά. Η PFA δημιουργεί δεσμούς υδρογόνου στις αμινομάδες , μονιμοποιώντας τις πρωτεΐνες των κυττάρων.
- Αντικατάσταση διαλύματος PFA 4% με PBS 1x το οποίο διατηρείται στους 4°C.
- Τοποθέτηση πλάκας στους 4°C αφού κλειστεί με parafilm.

Σημείωση: Η Βρωμο-δεοξυ-ουριδίνη (BrdU) είναι ένα ανάλογο θυμιδίνης το οποίο ενσωματώνεται στο DNA των κυττάρων που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης και χρησιμοποιείται ευρέως για τον εντοπισμό πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων σε έναν ιστό (Lehner et al., 2011). Για την ανίχνευση της ενσωματωμένης χημικής ένωσης χρησιμοποιούνται ειδικά αντι-BrdU αντισώματα, υποδεικνύοντας τα κύτταρα που αντιγράφουν ενεργά το DNA τους. Η σύνδεση του αντισώματος απαιτεί αποδιάταξη του DNA, συνήθως με έκθεση των κυττάρων σε οξύ ή θερμότητα (Konishi et al., 2011).

3.5.14 Ανοσοκυτταροχημεία

Η Ανοσοκυτταροχημεία (Immunocytochemistry) ασχολείται με τον υποκυτταρικό εντοπισμό και την εξέταση βιοχημικά προσδιορισμένων αντιγόνων από ειδικά αντισώματα (Griffiths et al., 1993). Ο John Marrack (1934) διαπίστωσε πως η ομοιοπολική σύνδεση μορίων χρωστικής στα αντισώματα δεν επηρεάζει απαραίτητα την ικανότητα δέσμευσης τους με το καθορισμένο αντιγόνο, συμβάλλοντας καθοριστικά στην ανάπτυξη των μεθόδων ανίχνευσης με αντισώματα (Marrack, 1934). Ωστόσο, ως πατέρας της Ανοσοκυτταροχημείας χαρακτηρίζεται δικαιολογημένα ο Albert Coons, ο οποίος αντιλήφθηκε το αντίκτυπο του ευρήματος του Marrack. Συγκεκριμένα, χρησιμοποίησε αντισώματα συζευγμένα με μια φθορίζουσα ένωση ισοκυανικού (β-anthryl-carbido isocyanate) ώστε να εντοπίσει βακτήρια του γένους *Pneumococcus* (Coons et al., 1941). Εφόσον τα αντισώματα μπορούν να συζευχθούν με φθορίζουσες ενώσεις χωρίς να χάσουν την βιολογική τους ενεργότητα, δύο

διαφορετικές προσεγγίσεις ακολουθούνται για τον εντοπισμό αντιγόνων: η άμεση ανίχνευση και η έμμεση ανίχνευση (Εικόνα 3.15). Στα πλαίσια της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκε έμμεση ανίχνευση των αντιγόνων MEF2c και BrdU σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2.



Εικόνα 3.15: Αρχή μεθόδου της Ανοσοκυτταροχημείας. Ανατύπωση (<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>)

Το πρωτόκολλο ανοσοκυτταροχημείας περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Μεταφορά των καλυπτρίδων από την πλάκα φρεατίων σε ειδική κυκλική διάταξη με τη χρήση λαβίδας.
- Προσθήκη διαλύματος 2N HCl σε κάθε καλυπτρίδα και επώαση σε κλίβανο ρυθμισμένο στους 40°C για 40 λεπτά. Πρέπει να αναφερθεί πως προηγείται επώαση μεμονωμένα του διαλύματος υδροχλωρικού οξέος στους 40°C για περίπου 30 λεπτά.
- Στέγνωμα καλυπτρίδων σε διηθητικό χαρτί και προσθήκη 0.1M βορικού οξέος pH 8.5 για ουδετεροποίηση. Η διάταξη αφήνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στέγνωμα και επώαση καλυπτρίδων με διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων 10% NGS (blocking) για 50 λεπτά. Στο διάλυμα blocking περιέχεται και 0.1% Triton X-100, ένα ελαφρύ απορρυπαντικό που καθιστά τις κυτταρικές μεμβράνες περισσότερο διαπερατές στα αντισώματα.
- Στέγνωμα καλυπτρίδων και προσθήκη αντι-MEF2c και αντι-BrdU αντισωμάτων με αραιώση 1:100 και 1:200 αντίστοιχα σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων. Πρέπει να αναφερθεί πως σε αυτό το στάδιο μια καλυπτρίδα χρησιμοποιείται ως αρνητικός μάρτυρας καθώς δεν επωάζεται με πρωτογενές

αντίσωμα, αλλά αποκλειστικά με διάλυμα blocking. Ακολουθεί επώαση για περίπου 18 ώρες (overnight) στους 4°C. Η διατήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία μειώνει τις τυχαίες κινήσεις των αντισωμάτων και αυξάνει την ειδικότητα δέσμησης με τον καθορισμένο επίτοπο.

- Εμβάπτιση καλυπτρίδων σε ποτήρι ζέσεως με διάλυμα PBS 1x τρεις φορές και επώαση κυττάρων με δευτερογενή αντισώματα αντι-ισοτυπικά των πρωτογενών αντισωμάτων, δηλαδή για ανοσοσφαιρίνη κουνελιού (αραίωση 1:400) και για ανοσοσφαιρίνη αρουραίου (αραίωση 1:500) σε διάλυμα κάλυψης μη ειδικών θέσεων. Το σύστημα αφήνεται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως.
- Εμβάπτιση καλυπτρίδων σε διάλυμα PBS 1x τρεις φορές.
- Τοποθέτηση κάθε καλυπτρίδας σε μια σταγόνα mounting medium fluoroshield με DAPI σε αντικειμενοφόρο. Με το μέσο εγκλεισμού υπάρχει ίδιος δείκτης διάθλασης ανάμεσα στα δύο γυάλινα υλικά (καλυπτρίδα και αντικειμενοφόρος) και δεν επέρχεται σκέδαση.
- Στέγνωμα αντικειμενοφόρου με διηθητικό χαρτί για απομάκρυνση της περίσσειας μέσου εγκλεισμού και παρατήρηση στο ορθό μικροσκόπιο φθορισμού και στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Μετά τη λήψη φωτογραφιών, τα δείγματα διατηρούνται στους 4°C σε ειδική διάταξη ώστε να προστατεύονται από το φως και την υγρασία.

Από κάθε φωτογραφία (πεδίο) που λήφθηκε στο ορθό μικροσκόπιο φθορισμού μετρούνται τα BrdU και τα DAPI θετικά κύτταρα με αυτοματοποιημένο τρόπο χρησιμοποιώντας ειδικά διαμορφωμένο πρόγραμμα στο Image J. Στη συνέχεια υπολογίζεται το ποσοστό BrdU+/DAPI σημασμένων κυττάρων για κάθε πεδίο και ακολουθεί στατιστική επεξεργασία (unpaired t-test).

Σημείωση 1^η: Η οικογένεια αυξητικών παραγόντων μυοκυττάρων 2 (myocyte enhancer factor, MEF2) περιλαμβάνει μεταγραφικούς παράγοντες που δεσμεύονται σε περιοχές DNA πλούσιες σε A-T και έχουν πολλαπλούς ρόλους στη μυϊκή ανάπτυξη. Συγκεκριμένα ο παράγοντας MEF2c εκφράζεται σε προγονικά καρδιακά κύτταρα του μεσοδέρματος στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της καρδιάς των θηλαστικών και συμβάλλει στην καθιέρωση του μεταγραφικού προφίλ που σχετίζεται με την διαφοροποίηση καρδιομυοκυττάρων (Ewen et al., 2011).

Σημείωση 2^η: Απαραίτητο στοιχείο για την επιτυχία του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου ανοσοσήμανσης κρίνεται η επώαση των καλυπτρίδων σε υδροχλωρικό οξύ αυστηρά στους 40°C για 40 λεπτά καθώς και η προθέρμανση του διαλύματος αυτού για αρκετό χρόνο πριν τη χρήση του. Τα βήματα αυτά προωθούν την πυρηνική σήμανση εφόσον προκαλούν αποδιάταξη του DNA, επιτρέποντας τη σύνδεση του ειδικού αντι – BrdU αντισώματος. Επιπρόσθετο, κρίσιμο σημείο που απαιτεί προσοχή κατά την εφαρμογή της μεθόδου ανοσοκυτταροχημείας αποτελεί η επιλογή των δευτερογενών αντισωμάτων. Συγκεκριμένα, προκαταρκτικά πειράματα όπου (1) προστέθηκε διάλυμα HCl για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και (2) χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα με αντίστροφο μήκος κύματος διέγερσης – δηλαδή αντίσωμα που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνη κουνελιού (Alexa Fluor 568) και αντίσωμα που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνη αρουραίου (Alexa Fluor 488) – δεν ήταν επιτυχή.

4. Αποτελέσματα

4.1 In vivo διερεύνηση της έλλειψης του ενζύμου 3MST στο ζωικό μοντέλο zebrafish

Η μεταλλαγμένη σειρά 3MST προέκυψε με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο ορθόλογο γονίδιο του 3-MST μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 στο εργαστήριο του Δρ. Δημήτρη Μπέη στο ΠΒΕΑΑ.

Το γονίδιο – στόχος για το οποίο δημιουργήθηκε το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 στο zebrafish, διαθέτει 2 εξόνια και αναφέρετε στις βάσεις δεδομένων με τον κωδικό zgc162544. Σε επίπεδο πρωτεΐνης, διαθέτει ομολογία 58% και ομοιότητα αμινοξέων 77% με την ανθρώπινη 3-MST, ενώ σε σχέση με το 3MST στο ποντίκι χαρακτηρίζεται από ομολογία 58% και ομοιότητα αμινοξέων 74% (εικόνα 4.1). Επιπροσθέτως διαθέτει τις ίδιες πρωτεϊνικές περιοχές σε κάθε περίπτωση, ωστόσο η ενεργή ομόλογη επικράτεια ροδανάσης βρίσκεται προς το N-άκρο, σε αντίθεση με τον άνθρωπο και το ποντίκι που συναντάται στο C-άκρο (Εικόνα 4.2).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
380 bits(977)	2e-138	Compositional matrix adjust.	168/289(58%)	223/289(77%)	1/289(0%)
Query 8	RALVSAQIVVAEALRAPRAGQPLQLLDASNYLPKLRDARREFEERHHPGAFFDIDQCS				67
Sbjct 12	RALV+A+H+A+A+A+ R G L+LDASNYLPK+ R+ R EFE+ HHPGA+FFDID+C D				71
Query 68	RTSPYDHMLPGAHEFAEYAGRLGVGAATHVVIYDASDQGLYSAPRVMMFRFAGHHSVSL				127
Sbjct 72	RALVAARWLDADAVKSHRVGNLRLDASNYLPKMKRNPRAEFQTHIPGASFFDIDECDD				131
Query 128	LDGGLRHMLRQNLPLSSGKSQAPAEFRAQLDPAFIKTYEDIKENLESRRFQVVDARAA				187
Sbjct 132	LDGG+HLL+ P+S S+PAP +F A +++KTYED+ N++++ FQ+VD+RA G				191
Query 188	RFRGTEPRDGIIEPGHIGPVTNIPFTDFLSQE-GLEKSPPEIRHLFQEKVDLSKPLVA				246
Sbjct 192	RFRG EPEPR EPGHID ++N+PF F+ E GLE+ EE- LFO+ VDL KP				251
Query 247	TCGSGVTACHVALGAVLCGKPDVPIYDGSIVNEHYRARPEDVISEGRGK 295				
Sbjct 252	TCGSGVTACHIALAAHLGHPGVSLYDGAHSEHFTKAAPHEIISEGK 300				

Άνθρωπος – Zebrafish
Ομολογία 58%
Ομοιότητα αμινοξέων 77%

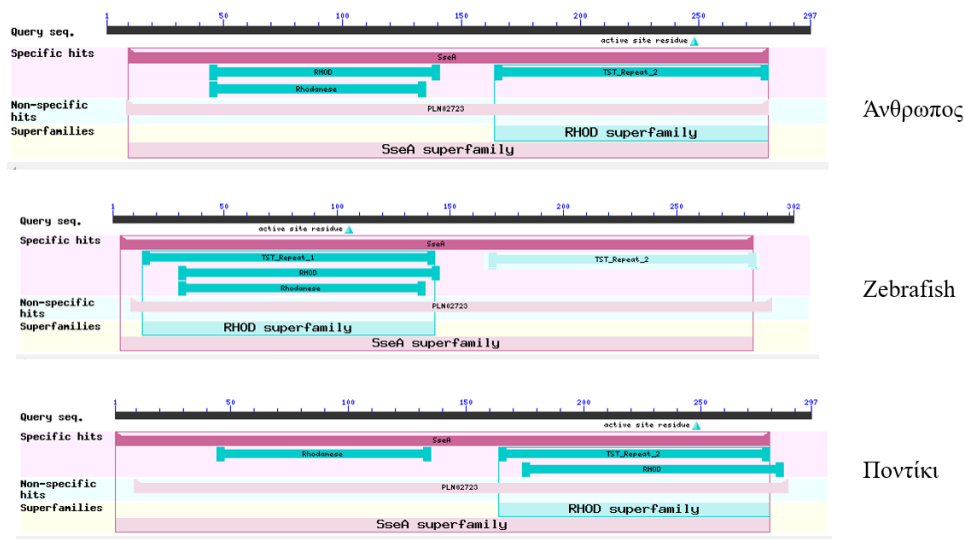
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
370 bits(949)	5e-134	Compositional matrix adjust.	167/289(58%)	215/289(74%)	1/289(0%)
Query 8	RALVSAQIVVAEALRAPRAGQPLQLLDASNYLPKLRDARREFEERHHPGAFFDIDQCS				67
Sbjct 12	RALV+A+H+A+A+A+ R L+LDASNYLPK+ R+ R EFE+ HHPGA+FFDID C D				71
Query 68	HTSPYDHMLPNATHFADYAGSLGVSAATHVVIYDGSQDQSPYAPRVMMFRFAGHHSVSL				127
Sbjct 72	KSEFDHMLPTKGEFADYVGNLIGGNTHVVIYDASDQGLYSAPRVMMFRFAGHHSVSV				131
Query 128	LDGGRHMLRQNLPLSSGKSHSEPAEFAQLDPSFIKTHEDILENDARRFQVVDARAA				187
Sbjct 132	LDGGF+HLL+ P+S S P +F+A S++KT+ED+L N+ + FQ+VDARA G				191
Query 188	RFGTQPEPRDGIIEPGHIGPVTNIPFTDFLTFNE-GLEKSPPEIKRLFKEKVDLSKPLVA				246
Sbjct 192	RFRGVEPRANTEPGHIGPVTNIPFTDFLTFNE-GLEKSPPEIKRLFKEKVDLSKPLVA				251
Query 247	TCGSGVTACHVALGAVLCGKPDVPIYDGSIVNEHYRARPEDVISEGRGK 295				
Sbjct 252	TCGSGVTACHIALAAHLGHPGVSLYDGAHSEHFTKAAPHEIISEGK 300				

Ποντίκι – Zebrafish
Ομολογία 58%
Ομοιότητα αμινοξέων 74%

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
533 bits(1373)	0.0	Compositional matrix adjust.	250/296(84%)	274/296(92%)	0/296(0%)
Query 1	MASPOLCRALVSAQIVVAEALRAPRAGQPLQLLDASNYLPKLRDARREFEERHHPGAFF				60
Sbjct 1	MA+POL RALVSAQIVVAEAL+APR+ QPL+LLDASNYLPKLRDARREFEERHHPGAFF				60
Query 61	DIDQCSDRTPSYDHMLPGAHEFAEYAGRLGVGAATHVVIYDASDQGLYSAPRVMMFRF				120
Sbjct 61	DID+CSDRTPSYDHMLPGAHEFAEYAGRLGVGAATHVVIYDASDQGLYSAPRVMMFRF				120
Query 121	GHHAVSLDGGLRHMLRQNLPLSSGKSQAPAEFRAQLDPAFIKTYEDIKENLESRRFOV				180
Sbjct 121	GHHAVSLDGGLRHMLRQNLPLSSGKSQAPAEFRAQLDPAFIKTYEDIKENLESRRFOV				180
Query 181	VDSRATGRFRGTEPRDGIIEPGHIGPVTNIPFTDFLSQEGLEKSPPEIRHLFQEKVDL				240
Sbjct 181	VD+RA GR+GT+PEPRDGIIEPGHIGPVTNIPFTDFLSQEGLEKSPPEIRHLFQEKVDL				240
Query 241	SKPLVATCGSGVTACHVALGAVLCGKPDVPIYDGSIVNEHYRARPEDVISEGRGK 296				
Sbjct 241	SKPLVATCGSGVTACHVALGAVLCGKPDVPIYDGSIVNEHYRARPEDVISEGRGK 296				

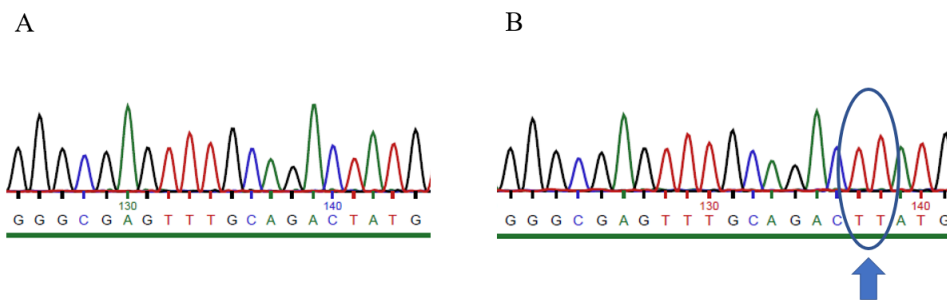
Άνθρωπος – Ποντίκι
Ομολογία 84%
Ομοιότητα αμινοξέων 92%

Εικόνα 4.1: Σύγκριση της πρωτεϊνικής ομολογίας του 3MST στο zebrafish, το ποντίκι και τον άνθρωπο. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν με τη χρήση του εργαλείου βιοπληροφορικής NCBI blastp suite-2sequences. Κωδικοί Uniprot: Q99J99 (THTM_MOUSE), P25325 (THTM_HUMAN), Q32PK8 (Q32PK8_DANRE).



Εικόνα 4.2: Πρωτεϊνικές περιοχές του ανθρώπινου 3-MST, του ορθόλογου γονιδίου στο zebrafish και του 3-MST στο ποντίκι. TST_Repeat_1: Θειοθειική θειομεταφοράση, N-άκρο, ανενεργή επικράτεια στον άνθρωπο και το ποντίκι, καταλυτική στο zebrafish. TST_Repeat_2: Θειοθειική θειομεταφοράση, C-άκρο, καταλυτική επικράτεια στον άνθρωπο και το ποντίκι, ανενεργή στο zebrafish. RHOD: Ομόλογη επικράτεια ροδανάσης. Rhodanese: επικράτεια που ομοιάζει με αυτή της ροδανάσης (Rhodanese-like domain), PLN02723: θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού, SseA: θειομεταφοράση του 3-μερκαπτοπυροσταφυλικού, περιέχει δύο ομόλογες επικράτειες ροδανάσης. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από τη βάση δεδομένων NCBI/Conserved domains και τους κωδικούς πρωτεϊνικών καταχωρήσεων που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη εικόνα.

Σημειώνεται ότι το σύστημα CRISPR σχεδιάστηκε κατάλληλα ώστε να στοχεύει σε αλληλουχία του πρώτου εξωνίου του γονιδίου, σε περιοχή κοντά στο κωδικόνιο έναρξης, προκειμένου η πρωτεΐνη που θα προκύψει μετά τη μετάλλαξη να μην είναι λειτουργική (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3: Χρωματογραφήματα από ανάλυση της αλληλουχίας δειγμάτων DNA που προήλθαν από ουρές ενήλικων ατόμων zebrafish αγρίου τύπου και της μεταλλαγμένης σειράς 3MST. Α. Απεικόνιση της ανάλυσης αλληλουχίας DNA από άτομο αγρίου τύπου. Β. Απεικόνιση της ανάλυσης αλληλουχίας DNA από άτομο με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ομόζυγη κατάσταση, η μετάλλαξη του οποίου (προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου με τη βάση θυμίνη) οδηγεί σε πρόωμο κωδικόνιο λήξης.

Τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα zebrafish (*3-mst^{-/-}*) αναπτύσσονται φυσιολογικά. Συνεπώς εξετάζεται η ανθεκτικότητα τους κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες για την εύρεση πιθανού φαινοτύπου και κατ' επέκταση τη μελέτη της επίδρασης της έλλειψης του συγκεκριμένου ενζύμου στη φυσιολογία του οργανισμού.

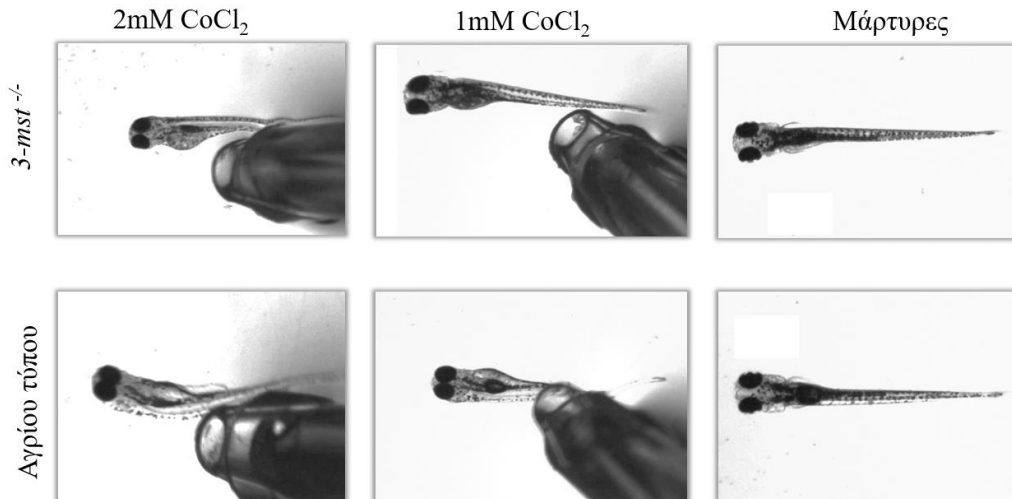
4.1.1 Παρατήρηση της ανάπτυξης σε συνθήκες υποξίας

Προκειμένου να ελεγχθεί η απόκριση των εμβρύων της μεταλλαγμένης σειράς 3MST κάτω από συνθήκες υποξίας, χορηγήθηκε χλωριούχο κοβάλτιο (CoCl_2) στο υδάτινο μέσο όπου αναπτύσσονταν zebrafish *3-mst^{-/-}* ηλικίας μίας ημέρας (1dpf). Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις του παράγοντα υποξίας, 1mM και 2mM. Στις ίδιες συνθήκες εκτέθηκαν και έμβρυα αγρίου τύπου, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση πιθανής διαφοράς στην ανάπτυξη σε υποξικό περιβάλλον μεταξύ των zebrafish διαφορετικού γενετικού υποβάθρου.

Τα έμβρυα που επάζονται στο χλωριούχο κοβάλτιο εμφανίζουν φυσιολογικό φαινότυπο μέχρι και την ηλικία των 3 ημερών μετά τη γονιμοποίηση. Ωστόσο, στις 4dpf παρατηρείται μείωση της κινητικότητας τόσο στα *3-mst^{-/-}* όσο και στα αγρίου τύπου έμβρυα συγκριτικά με τα έμβρυα – μάρτυρες, η οποία καταγράφηκε με βιντεοσκόπηση (Εικόνα 4.4). Ο φαινότυπος αυτός είναι πιο έντονος στην υψηλότερη συγκέντρωση χλωριούχου κοβαλτίου. Μέσα σε 5 ημέρες χημικής επώασης με τον παράγοντα υποξίας (δηλαδή σε έμβρυα 6dpf) καταγράφεται ~50% θνησιμότητα στη συνθήκη 2mM CoCl_2 σε κάθε περίπτωση γονοτύπου (Πίνακας 4.1). Τα έμβρυα – μάρτυρες αναπτύσσονται φυσιολογικά.

Συνθήκη	Γονότυπος	Με μειωμένη κινητικότητα	Νεκρά	Φυσιολογικά
2mM CoCl_2	<i>3-mst^{-/-}</i>	7/15 (47%)	8/15 (53%)	-
	Αγρίου τύπου	7/15 (47%)	8/15 (53%)	-
1mM CoCl_2	<i>3-mst^{-/-}</i>	100%	-	-
	Αγρίου τύπου	100%	-	-
Μάρτυρες	<i>3-mst^{-/-}</i>	-	-	100%
	Αγρίου τύπου	-	-	100%

Πίνακας 4.1: Έλεγχος της ανάπτυξης μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου zebrafish 6dpf μετά από 5 ημέρες έκθεσης σε χλωριούχο κοβάλτιο.



Εικόνα 4.4: Απεικόνιση στιγμιότυπων βιντεοσκόπησης εμβρύων ηλικίας 4 ημερών. Τα έμβρυα που αναπτύσσονται σε χλωριούχο κοβάλτιο αδυνατούν να αντιδράσουν μετά από τη λήψη εξωτερικού ερεθίσματος. Παρουσιάζονται επίσης τα έμβρυα – μάρτυρες, τα οποία χαρακτηρίζονται από άμεση απόκριση και απομακρύνονται από το οπτικό πεδίο όταν ενοχληθούν με το ρύγχος.

4.1.2 Μελέτη της απόκρισης προνυμφών στο οξειδωτικό στρες

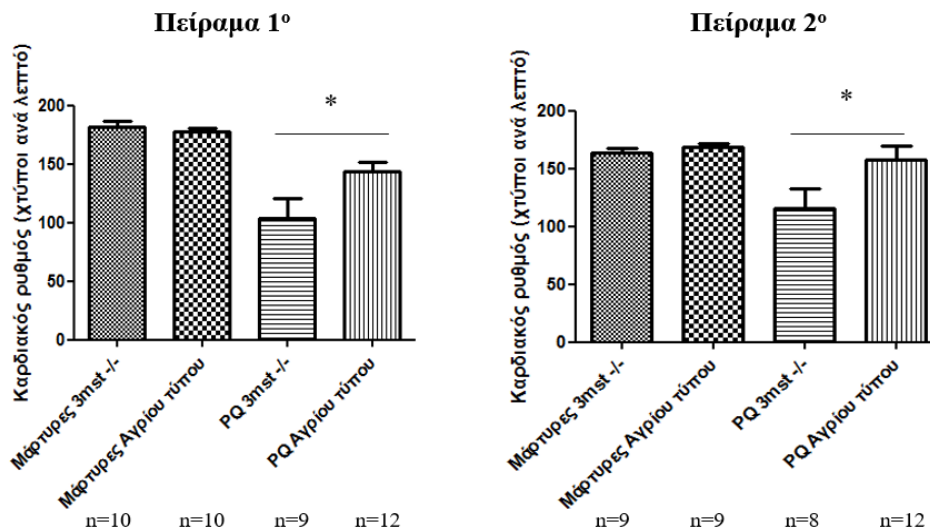
Για να διαπιστωθεί εάν οι μεταλλαγμένες προνύμφες αποκρίνονται διαφορετικά στη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου και στην καταστροφή των μιτοχονδρίων από τις προνύμφες αγρίου τύπου, τοπιοθετήθηκε το ζιζανιοκτόνο παρακουάτ για 48 ώρες στο υδάτινο μέσο όπου αναπτύσσονταν zebrafish ηλικίας 5 ημερών.

Μετά το πέρας της 48ωρης επώασης με το συγκεκριμένο φάρμακο, καταγράφονται αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας στην περίπτωση των 3-*mst*^{-/-} προνυμφών τα οποία προσεγγίζουν κατά μέσο όρο την τιμή του 50%, ενώ ένας χαμηλός αριθμός zebrafish αγρίου τύπου θανατώνεται (~4%). Τα αναλυτικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.2 και προέκυψαν από 3 επαναλήψεις του πειράματος, όπου κάθε φορά χρησιμοποιούνταν 16 συνολικά προνύμφες ανά συνθήκη. Όσα zebrafish επιβιώνουν από την έκθεση σε PQ συνήθως έχουν μειωμένη κινητικότητα και θανατώνονται τις επόμενες 1-2 ημέρες. Οι προνύμφες που αξιοποιούνται ως μάρτυρες αναπτύσσονται φυσιολογικά.

Θνησιμότητα (%)			
		<i>3-mst^{-/-}</i>	Αγρίου τύπου
Πείραμα 1°	I	2/8 (25.0%)	1/8 (12.5%)
	II	4/8 (50.0%)	0/8 (0%)
Πείραμα 2°	I	5/8 (62.5%)	0/8 (0%)
	II	5/8 (62.5%)	1/8 (12.5%)
Πείραμα 3°	I	5/8 (62.5%)	0/8 (0%)
	II	2/8 (25.0%)	0/8 (0%)
Μ.Ο.		47.92%	4.17%

Πίνακας 4.2: Ποσοστά θνησιμότητας προνυμφών που εκτίθενται για 48 ώρες σε παρακουάτ. Τα διαφορετικά φρεάτια όπου δοκιμάστηκε η επίδραση του PQ συμβολίζονται με I και II.

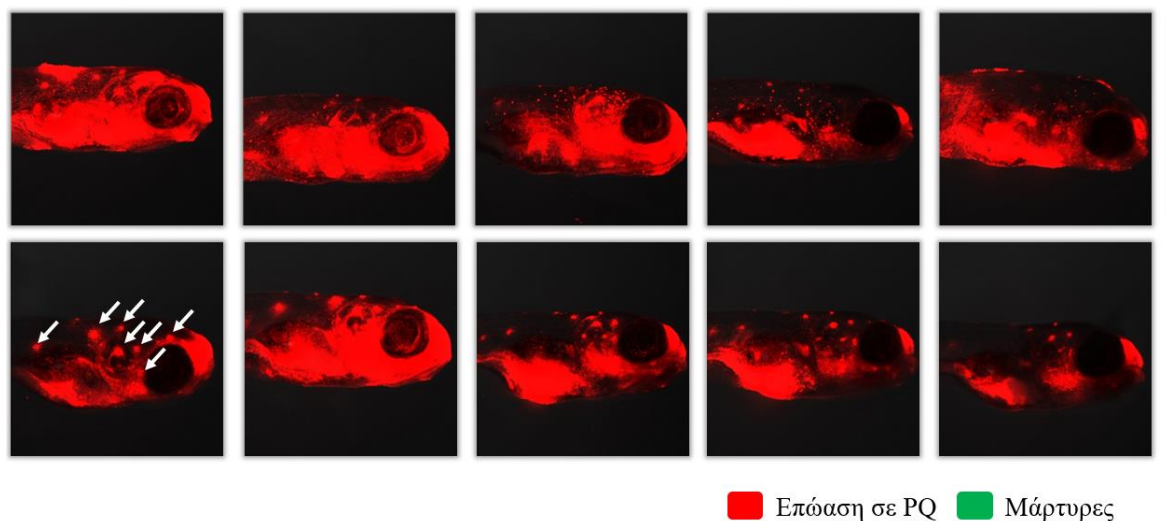
Επιπρόσθετα, η 48ωρη χορήγηση PQ προκαλεί αρρυθμίες και στατιστικά σημαντική μείωση του καρδιακού ρυθμού στις μεταλλαγμένες προνύμφες. Συγκεκριμένα ο καρδιακός ρυθμός στα zebrafish *3-mst^{-/-}* μειώνεται κατά μέσο όρο στην τιμή των 110 κτύπων ανά λεπτό. Αντίθετα, οι προνύμφες αγρίου τύπου διαθέτουν καρδιακό παλμό περίπου 151 κτύπους ανά λεπτό. Ο καρδιακός ρυθμός στις προνύμφες – μάρτυρες κυμαίνεται εντός του φυσιολογικού, αναμενόμενου εύρους τιμών. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές, λαμβάνοντας 8-12 μετρήσεις ανά συνθήκη (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.7: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η μέση τιμή του καρδιακού ρυθμού για τις 4 διαφορετικές συνθήκες ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (± SEM), για κάθε πείραμα. Ο αριθμός των προνυμφών και κατ' επέκταση των τιμών καρδιακού ρυθμού (n) που λήφθηκαν ανά συνθήκη και σε κάθε πείραμα αναγράφεται στην εικόνα. Η στατιστική επεξεργασία των τιμών έγινε μέσω unpaired t-test με το σημείο * να υποδηλώνει επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ο μηχανισμός τοξικότητας του παρακουάτ χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική Mitotracker η οποία σημαίνει τα μιτοχόνδρια σε ζωντανά κύτταρα εκμεταλλεύμενη το αρνητικό δυναμικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, αγρίου τύπου προνύμφες 5dpf οι οποίες είχαν εκτεθεί σε PQ για 48 ώρες παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο μετά το πέρας 30λεπτης επώασης στη χρωστική σήμανσης των μιτοχονδρίων.

Παρατηρώντας τις προνύμφες zebrafish ηλικίας 7 ημερών, ανιχνεύεται έντονο σήμα φθορισμού στην κεφαλή, στον οισοφάγο, στην εντερική οδό και πιθανότατα στο ήπαρ. Επιπρόσθετα, δείχνουν να σημαίνονται διαφορετικά στις προνύμφες που αναπτύχθηκαν απουσία φαρμάκου σε σχέση με τις εκτεθειμένες σε PQ προνύμφες, μικρές επιφανειακές οπές που ονομάζονται νευρομαστοί (neuromasts). Ο νευρομαστός είναι το βασικό συνθετικό όργανο αίσθησης του όλου συστήματος της πλευρικής γραμμής των ιχθύων, το οποίο συμβάλλει στην αντίληψη της απόστασης, της κατεύθυνσης και του μεγέθους εμποδίων και θηρευτών. Στα όργανα λοιπόν αυτά ανιχνεύεται μειωμένο έως μηδαμινό σήμα φθορισμού στις προνύμφες που χορηγήθηκε παρακουάτ, σε αντίθεση με τις προνύμφες μάρτυρες όπου το πρότυπο οργάνωσης των νευρομαστών είναι περισσότερο ευδιάκριτο (Εικόνα 4.8).



Εικόνα 4.8: Παρατήρηση σήμανσης με Mitotracker προνυμφών αγρίου τύπου που αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία παρακουάτ (μάρτυρες). Τα αισθητήρια όργανα της πλευρικής γραμμής που τοποθετούνται στη ράχη της κεφαλής, περιφερικά των οφθαλμών (επισημαίνονται με λευκά βέλη) αλλά και κατά μήκος του σώματος σημαίνονται με τη φθορίζουσα χρωστική στις προνύμφες – μάρτυρες, ενώ στις προνύμφες που χορηγήθηκε PQ το σήμα χάνεται. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο με x10 φακό.

4.1.3 Παρατήρηση σήμανσης με μιτοχονδριακή φθορίζουσα χρωστική σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια

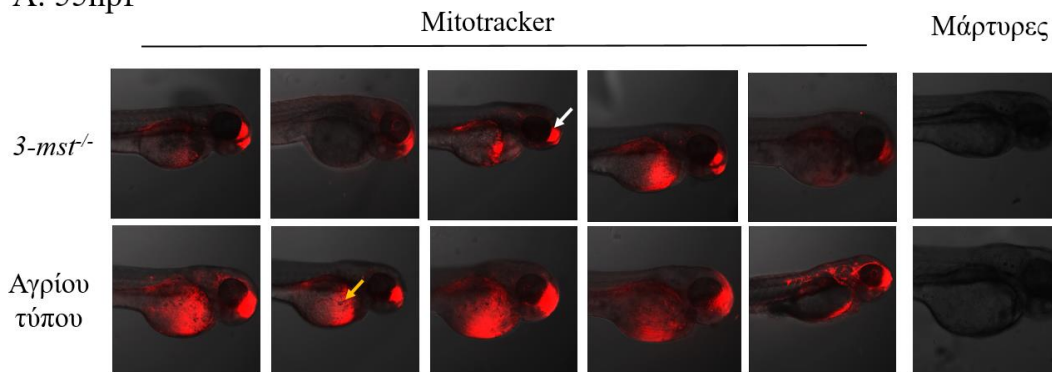
Για περαιτέρω μελέτη του προτύπου σήμανσης με Mitotracker σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στο zebrafish αλλά και τη σύγκριση αυτού μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων, παρατηρήθηκε το σήμα φθορισμού που προκύπτει μετά από 30λεπτη χορήγηση της φθορίζουσας χρωστικής σε έμβρυα των συγκεκριμένων γονοτύπων στις 55, 72 και στις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση.

Σε ηλικία 55 ωρών εμφανίζεται σήμα στο πρόσθιο τμήμα της κεφαλής και επιφανειακά στη λεκιθική περιοχή. Τα τμήματα αυτά δείχνουν να φθορίζουν εντονότερα στα έμβρυα με φυσιολογικό γενετικό υπόβαθρο απ' ό,τι στα μεταλλαγμένα (Εικόνα 4.9Α). Το πείραμα επαναλήφθηκε συνολικά δύο φορές, όπου κάθε φορά φωτογραφίζονταν 6-8 έμβρυα ανά γονότυπο.

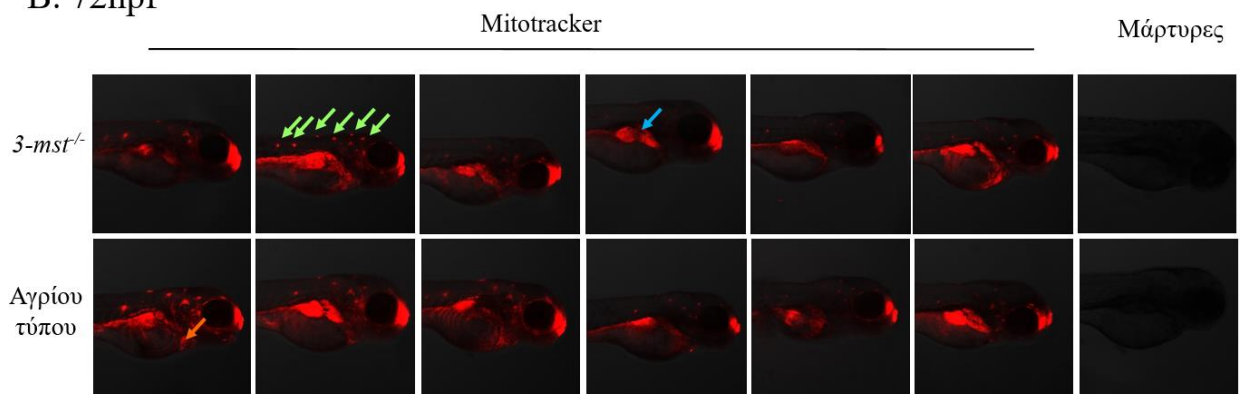
Η ευδιάκριτη διαφορά στη σήμανση των μιτοχονδρίων που παρατηρήθηκε στο στάδιο ανάπτυξης των 55hpf δείχνει να εξασθενεί καθώς τα έμβρυα μεγαλώνουν σε ηλικία. Στις 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση εξακολουθεί να σημαίνεται η άκρη της κεφαλής, ενώ επιπρόσθετες δομές όπου παρατηρείται σήμα φθορισμού είναι οι νευρομαστοί και το πεπτικό σύστημα. Στο τελευταίο εντοπίζεται χρωστική πιθανότατα διότι από την συγκεκριμένη ηλικία τα έμβρυα ξεκινούν την κατάποση νερού. Επίσης, σε ορισμένα έμβρυα ανιχνεύεται φθορίζον σήμα στην περιοχή της καρδιάς (Εικόνα 4.9B).

Τέλος, στις 96hpf η σήμανση στο ακραίο τμήμα της κεφαλής, στο στομάχι, στην εντερική οδό και στο αισθητήριο σύστημα της πλευρικής γραμμής σε γενικές γραμμές διατηρείται, ενώ πιθανότατα σημαίνεται και το ήπαρ (Εικόνα 4.9Γ). Προκειμένου να αποφευχθεί η λανθασμένη ερμηνεία των αποτελεσμάτων λόγω σημάτων αυτοφθορισμού, ορισμένα έμβρυα δεν εκτέθηκαν σε Mitotracker λειτουργώντας ως μάρτυρες. Τα συγκεκριμένα έμβρυα δεν εμφανίζουν κανένα πρότυπο σήμανσης κατά την παρατήρηση στο συνεστιακό μικροσκόπιο.

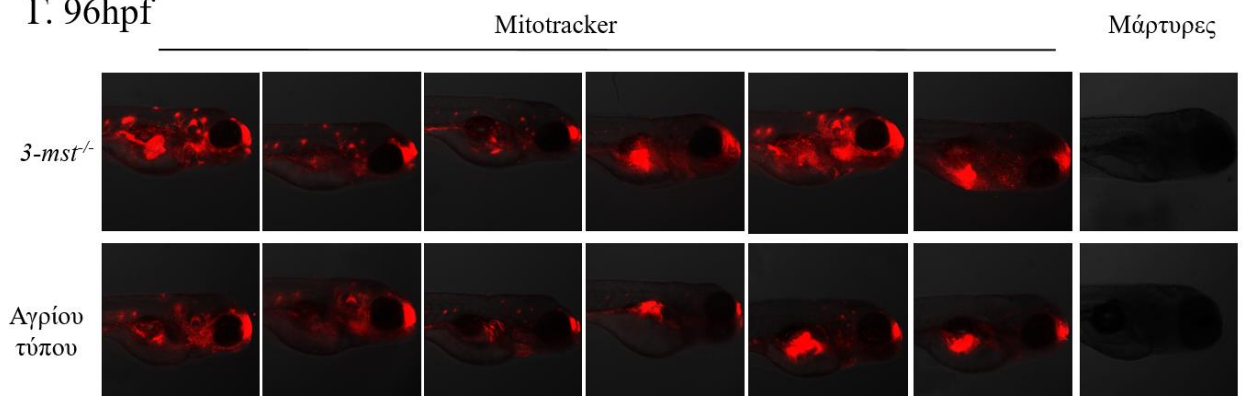
A. 55hpf



B. 72hpf



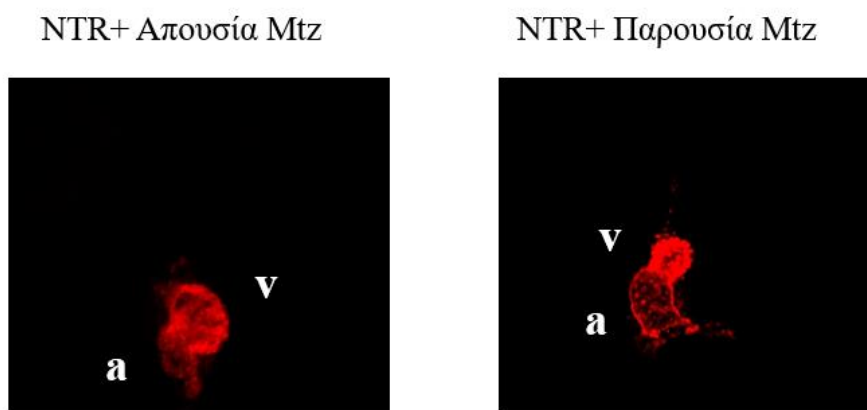
Γ. 96hpf



Εικόνα 4.9: Σύγκριση προτύπου σήμανσης με Mitotracker μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων ηλικίας 55, 72 και 96 ωρών μετά τη γονιμοποίηση. Στις 55 ώρες μετά τη γονιμοποίηση η φθορίζουσα χρωστική σημαίνει την άκρη της κεφαλής (επισημαίνεται στην εικόνα με λευκό βέλος) και τον λεκιθικό χώρο (κίτρινο βέλος), με μεγαλύτερη ένταση στην περίπτωση των εμβρύων αγρίου τύπου. Σε 72hpf εντοπίζεται σήμα φθορισμού εκτός από το ακραίο τμήμα της κεφαλής, στα όργανα των νευρομαστών (πράσινα βέλη), στη πεπτική οδό (γαλάζιο βέλος), καθώς και στη περικαρδιακή περιοχή σε ορισμένα έμβρυα (πορτοκαλί βέλος). Στην ηλικία των 96 ωρών μετά τη γονιμοποίηση ανιχνεύεται σήμα στα εμβρυικά τμήματα που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο στάδιο και παρατηρείται πιθανή επιπρόσθετη σήμανση στο ήπαρ. Δεν διαπιστώνεται ιδιαίτερη διαφορά στο πρότυπο ή στην ένταση σήμανσης στα ομόζυγα για τη μεταλλαγή έμβρυα σε σχέση με τα φυσιολογικά στα δύο μεταγενέστερα αναπτυξιακά στάδια. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο με x10 φακό.

4.1.4 Μελέτη της αναγεννητικής ικανότητας εμβρύων zebrafish με τη χρήση του συστήματος NTR-Mtz

Για να διερευνηθεί αν τα μεταλλαγμένα έμβρυα έχουν διαφορετικό δυναμικό αναγέννησης σε σχέση με τα φυσιολογικά, προκλήθηκε μη επεμβατική εκτομή καρδιομυοκυττάρων αξιοποιώντας το σύστημα NTR-Mtz. Εξηγώντας, μετά από κατάλληλες διασταυρώσεις προέκυψε μεταλλαγμένη σειρά zebrafish η οποία διαθέτει σε ομόζυγη κατάσταση το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του *3-MST* και εκφράζει αποκλειστικά στα κύτταρα του μυοκαρδίου το συζευγμένο με κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη ένζυμο NTR. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στην Εισαγωγή, το συγκεκριμένο ένζυμο μεταβολίζει την αρχικά αβλαβή μετρονιδαζόλη (Mtz), παράγοντας ένα τοξικό προϊόν που οδηγεί στον προγραμματισμένο θάνατο των NTR θετικών κυττάρων. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η αποτελεσματικότητα του συστήματος στη σειρά αυτή, χορηγήθηκε υψηλή συγκέντρωση Mtz (5mM για 3 ώρες) σε έμβρυα ηλικίας 2 ημερών και παρατηρήθηκε η ακεραιότητα του καρδιακού ιστού και η ένταση φθορισμού του διαγονιδίου στο συνεστιακό μικροσκόπιο (Εικόνα 4.5).



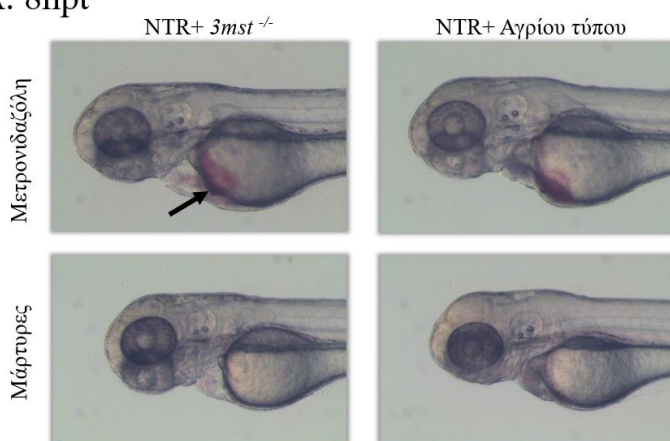
Εικόνα 4.5: Παρατήρηση της επίδρασης της μετρονιδαζόλης σε καρδιομυοκύτταρα που εκφράζουν τη NO_2 αναγωγή συζευγμένη με κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη, στην καρδιά διαγονιδιακών εμβρύων ηλικίας 2 ημερών. Ο μεταβολισμός της Mtz από το ένζυμο NTR έχει σαν αποτέλεσμα τη μείωση του σήματος φθορισμού και τη συρρίκνωση του μεγέθους της κοιλίας, εξαιτίας της απόπτωσης κυττάρων μυοκαρδίου. Η μορφολογία του ιστού είναι φυσιολογική και το σήμα φθορισμού του διαγονιδίου παραμένει ακέραιο στα έμβρυα που αναπτύχθηκαν απουσία Mtz. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν σε συνεστιακό μικροσκόπιο με x10 φακό. v: ventricle, κοιλία, a: atrium, κόλπος.

Παράλληλα, τα έμβρυα της συγκεκριμένης σειράς, σε συνδυασμό με τα αντίστοιχα διαγονιδιακά έμβρυα αγρίου τύπου, εκτέθηκαν σε μετρονιδαζόλη και παρατηρήθηκε η απόκριση τους σε διαφορετικές ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου (hours post treatment, hpt). Σε χημική δοκιμή υπόκεινται και NTR- έμβρυα για να ελεγχθούν πιθανές μη ειδικές επιδράσεις της Mtz ή του διαγονιδίου. Δοκιμάστηκαν δύο συνθήκες επώασης με Mtz:

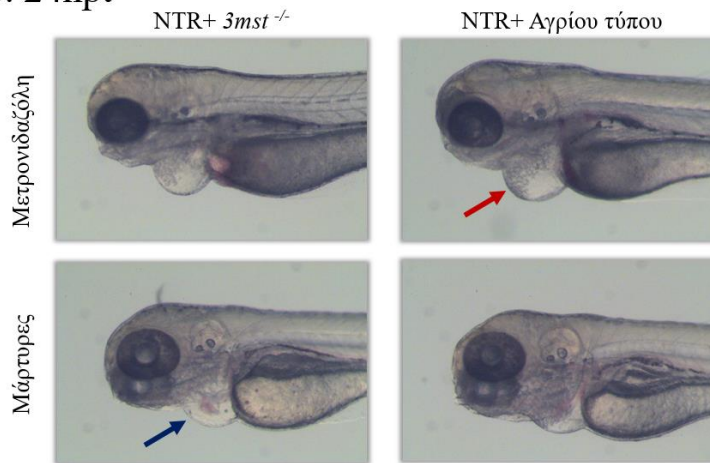
1. Χορήγηση μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης 2mM για 3 ώρες σε έμβρυα ηλικίας 2 ημερών (2dpf)

Η εμφάνιση φαινοτύπου τόσο στα NTR+ *3-mst^{-/-}* όσο και στα NTR+ αγρίου τύπου έμβρυα γίνεται αντιληπτή άμεσα μετά από την έκθεση σε Mtz, όπου παρατηρείται υποτυπώδης καρδιακός παλμός και τοπικό αιμάτωμα στην περιοχή της καρδιάς (Εικόνα 4.6Α). Στις 24hpt τα διαγονιδιακά έμβρυα που αναπτύχθηκαν στο φάρμακο παρουσιάζουν περικαρδιακό οίδημα και χαρακτηρίζονται από απουσία καρδιακού κτύπου και κατ' επέκταση διακοπή της αιματικής κυκλοφορίας (Εικόνα 4.6B). Κατά τη δεύτερη ημέρα μετά τη χορήγηση Mtz, τα συμπτώματα της μη επεμβατικής καταστροφής καρδιομυοκυττάρων επιδεινώνονται καθώς το περικαρδιακό οίδημα μεγεθύνεται και επεκτείνεται στην περιοχή της λεκίθου (Εικόνα 4.6Γ). Ο φαινότυπος που περιγράφεται επιφέρει θάνατο των εμβρύων εντός 4-5 ημερών μετά τη γονιμοποίηση.

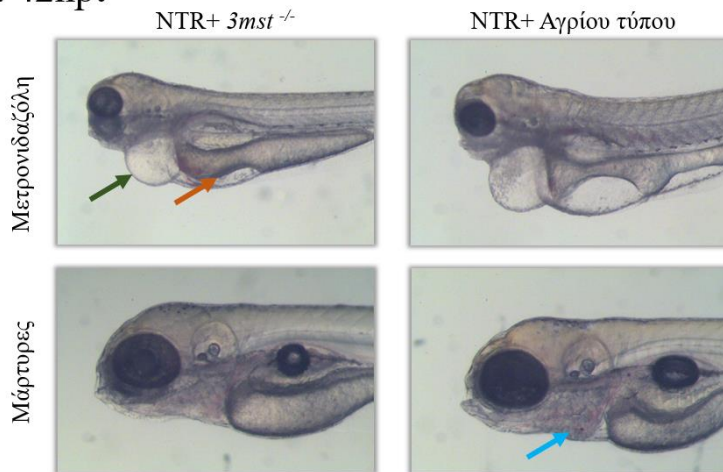
A. 8hpt



B. 24hpt



Γ. 42hpt



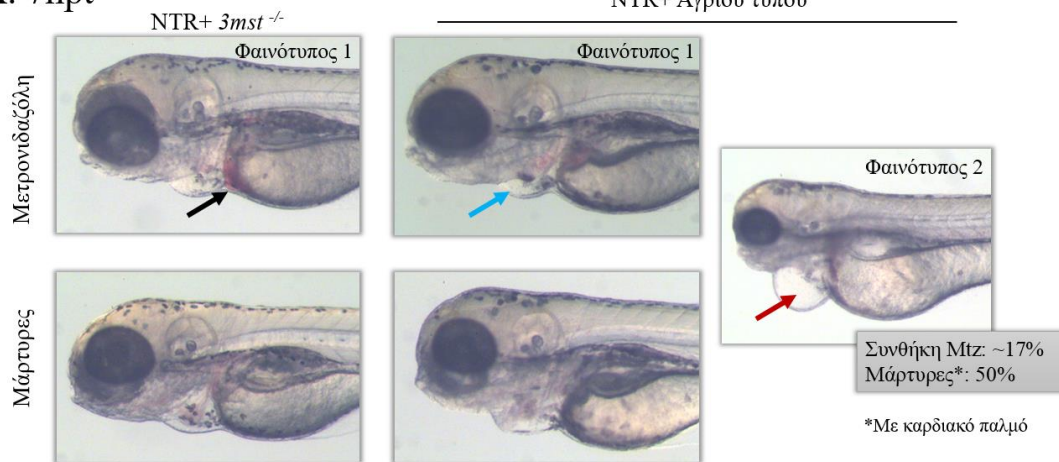
Εικόνα 4.6: Παρατήρηση φαινοτύπου διαγονιδιακών μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων μετά από μη επεμβατική εκτομή μυοκαρδίου μέσω χορήγησης Mtz 2mM για 3 ώρες. Α. Στις 8hpt τα διαγονιδιακά έμβρυα που εκτέθηκαν σε μετρονιδαζόλη, ανεξαρτήτως γονοτύπου, εμφανίζουν τοπικό αιμάτωμα στην καρδιά (επισημαίνεται με μαύρο βέλος) και υποτυπώδη κτύπο. Β. Μετά το πέρας 24 ωρών από τη χορήγηση Mtz, τα έμβρυα χαρακτηρίζονται από περικαρδιακό οίδημα (κόκκινο βέλος) ενώ ο καρδιακός κτύπος και η αιματική κυκλοφορία σταματούν. Γ. Στις 48hpt παρατηρείται επιδείνωση του φαινοτύπου καθώς το οίδημα μεγεθύνεται (πράσινο βέλος) και επεκτείνεται στον λεκιθικό χώρο (πορτοκαλί βέλος). Τυπικά, τα έμβρυα – μάρτυρες καθώς και τα NTR- έμβρυα δεν εμφανίζουν τα φαινοτυπικά στοιχεία που αναφέρθηκαν, ωστόσο σε ορισμένα παρατηρείται περικαρδιακό οίδημα στις 3dpf (μπλε βέλος στην εικόνα Β), το οποίο αποτελεί ενδογενές προβληματικό χαρακτηριστικό της σειράς και συνήθως εξασθενεί τις επόμενες ημέρες (γαλάζιο βέλος στην εικόνα Γ). Οι φωτογραφίες προέκυψαν από παρατήρηση σε στερεοσκόπιο.

2. Χορήγηση μετρονιδαζόλης συγκέντρωσης 1mM για 4 ώρες σε έμβρυα ηλικίας 3 ημερών (3dpf)

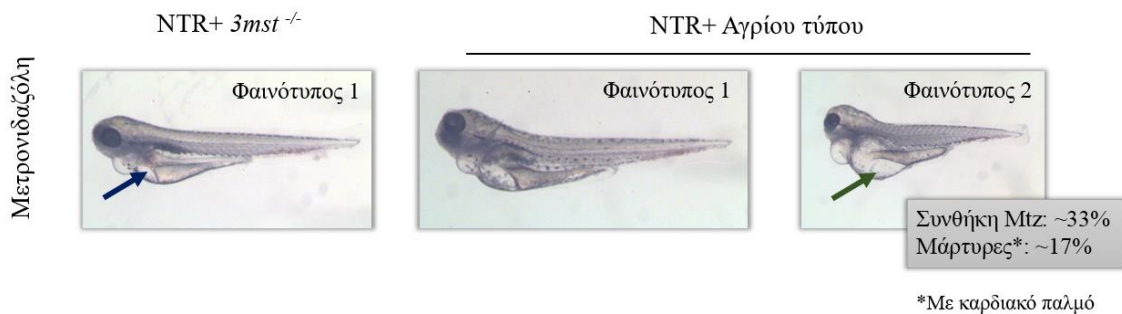
Τα διαγονιδιακά έμβρυα που εκτέθηκαν στη Mtz εμφανίζουν μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα ελαφρύ περικαρδιακό οίδημα και συσσώρευση αίματος καθώς η καρδιά σταματά να πάλλεται ή συσπάται ασθενώς και υπολειτουργεί για μερικές ώρες (φαινότυπος 1). Παρατηρείται επιπρόσθετα έντονο οίδημα που περιβάλλει την περιοχή της καρδιάς στο 17% του δείγματος των NTR+ αγρίου τύπου με επώαση στη μετρονιδαζόλη (φαινότυπος 2). Ένα ποσοστό ίσο με 50% στα αντίστοιχα έμβρυα – μάρτυρες χαρακτηρίζεται επίσης από έντονο οίδημα στην καρδιά, ενώ ο καρδιακός παλμός είναι κανονικός (Εικόνα 4.7A).

Στις 24hpt η αιματική ροή και ο καρδιακός κτύπος διακόπτονται πλήρως στα NTR+ έμβρυα της συνθήκης Mtz ενώ το περικαρδιακό οίδημα μεγεθύνεται και επεκτείνεται στο λεκιθικό χώρο (φαινότυπος 1). Η διαφορά έντασης στον σχηματισμό οιδήματος διατηρείται στα διαγονιδιακά έμβρυα αγρίου τύπου (φαινότυπος 2), σε ποσοστό ~33% στη συνθήκη Mtz και περίπου 17% στην περίπτωση ανάπτυξης απουσία φαρμάκου, όπου η καρδιά συνεχίζει να κτυπά (Εικόνα 4.7B). Οι δύο διακριτοί φαινότυποι σε κάθε συνθήκη είναι θνησιγόνοι. Τα υπόλοιπα έμβρυα-μάρτυρες και τα NTR- έμβρυα δεν εμφανίζουν τα φαινοτυπικά στοιχεία που αναλύθηκαν, ωστόσο σε ορισμένα σχηματίζεται περικαρδιακό οίδημα στις 3dpf, το οποίο συνιστά ενδογενές χαρακτηριστικό της σειράς και απορροφάται τις επόμενες ημέρες.

A. 7hpt



B. 24hpt



Εικόνα 4.6: Παρατήρηση φαινοτύπου διαγονιδιακών μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων μετά από μη επεμβατική εκτομή μυοκαρδίου μέσω χορήγησης Mtz 1mM για 4 ώρες. Α. Στις 7hpt τα NTR+ έμβρυα όπου προκλήθηκε βλάβη του μυοκαρδίου χαρακτηρίζονται από ελαφρύ περικαρδιακό οίδημα (επισημαίνεται με γαλάζιο βέλος), αιμάτωμα στη περιοχή της καρδιάς (μαύρο βέλος) και υποτυπώδη ή μηδαμινό καρδιακό παλμό (φαινότυπος 1). Ένα μέρος των NTR+ αγρίου τύπου παρουσία Mtz, εμφανίζει τα χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν και εντονότερο περικαρδιακό οίδημα (κόκκινο βέλος), γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως δεύτερος φαινότυπος. Έντονο οίδημα στην περιοχή της καρδιάς παρατηρείται και σε NTR+ αγρίου τύπου έμβρυα – μάρτυρες, τα οποία ωστόσο έχουν κανονικό καρδιακό κτύπο. Β. Μέσα σε 24hpt τα συμπτώματα επιδεινώνονται λόγω πλήρους διακοπής της αιματικής κυκλοφορίας και μεγέθυνσης και επέκτασης του οιδήματος στην περιοχή της λεκίθου (μπλε βέλος). Η διάκριση δύο φαινοτύπων λόγω διαφοράς στην ένταση του οιδήματος (πράσινο βέλος) διατηρείται. Τα ποσοστά εμφάνισης του δεύτερου φαινοτύπου μεταβάλλονται στις διαφορετικές χρονικές στιγμές παρατήρησης και αναγράφονται στην εικόνα. Οι φωτογραφίες προέκυψαν από παρατήρηση σε στερεοσκόπιο.

4.1.5 Συμπεριφορική δοκιμασία θιγμοτακτισμού

Προκειμένου να μελετηθεί η απόκριση των μεταλλαγμένων εμβρύων σε ουσίες που επάγουν συμπεριφορά που προσομοιάζει με άγχος, εκτέθηκαν *3-mst^{-/-}* και αγρίου τύπου έμβρυα ηλικίας 3 ημερών στο αντικαταθλιπτικό φάρμακο ρολιπράμη και μετρήθηκαν τα ποσοστά θιγμοτακτισμού. Δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ρολιπράμης (25μM και 50μM) και καταγράφηκε η τάση επαφής των εμβρύων με τα τοιχώματα των τρυβλίων Petri στη μία ώρα και στις τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου.

Μέσα σε μία ώρα μετά την προσθήκη της χαμηλότερης συγκέντρωσης ρολιπράμης, τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά θιγμοτακτισμού σε σχέση με τα έμβρυα αγρίου τύπου, ανεξάρτητα από το εάν είχαν αναπτυχθεί παρουσία ή απουσία φαρμάκου. Η αύξηση αυτή υποστηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα. Στις 4hpt αυτή η στατιστικά σημαντική διαφορά διατηρείται στην περίπτωση των εμβρύων – μαρτύρων, ωστόσο στη συνθήκη έκθεσης σε ρολιπράμη παρατηρείται παρόμοια τάση επαφής με τα τοιχώματα και οι ποσοστιαίες τιμές θιγμοτακτισμού εξισορροπούνται (Εικόνα 4.10A).

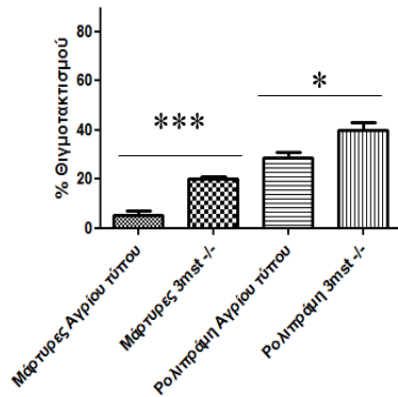
Το συμπεριφορικό πρότυπο που παρατηρήθηκε στη δοκιμασία θιγμοτακτισμού με 25μM ρολιπράμης για μία ώρα επιβεβαιώνεται και εμφανίζεται σε εντονότερο βαθμό στα πειράματα με τη χορήγηση φαρμάκου μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Με εξαίρεση το πρώτο πείραμα, στη 1hpt τα *3-mst^{-/-}* έμβρυα χαρακτηρίζονται από στατιστικά σημαντική αύξηση της αγχώδους συμπεριφοράς συγκριτικά με τα έμβρυα αγρίου τύπου, τόσο στην περίπτωση έκθεσης σε ρολιπράμη όσο και στη συνθήκη ελέγχου. Μετά το πέρας 4 ωρών επώασης στο φάρμακο, παρατηρούνται διακυμάνσεις στην εκδήλωση τάσης θιγμοτακτισμού. Εξηγώντας, στο 1^ο και στο 3^ο πείραμα η διαφορά που παρατηρείται στη 1hpt στα έμβρυα – μάρτυρες εξομαλύνεται, ενώ στο 2^ο πείραμα οι τιμές ακολουθούν τη μεταβολή που καταγράφεται στη μία ώρα χορήγησης ρολιπράμης, διατηρώντας τη στατιστική σημαντικότητα. Παράλληλα, στο διάγραμμα του 3^{ου} πειράματος ανιχνεύεται μία μη αναμενόμενη άνοδος των ποσοστών θιγμοτακτισμού στα έμβρυα αγρίου τύπου, συγκριτικά με τα μεταλλαγμένα έμβρυα (Εικόνα 4.10B). Οι παραπάνω διακυμάνσεις διορθώνονται στο συγκεντρωτικό διάγραμμα που προκύπτει με βάση τα αποτελέσματα όλων των πειραμάτων χημικής δοκιμής με 50μM ρολιπράμη (Εικόνα 4.11).

Τα αποτελέσματα για τη δοκιμασία θιγμοτακτισμού με την υψηλότερη συγκέντρωση ρολιπράμης προέρχονται από τρεις επαναλήψεις του πειράματος όπου κάθε φορά χρησιμοποιούνταν 18 έμβρυα ανά συνθήκη.

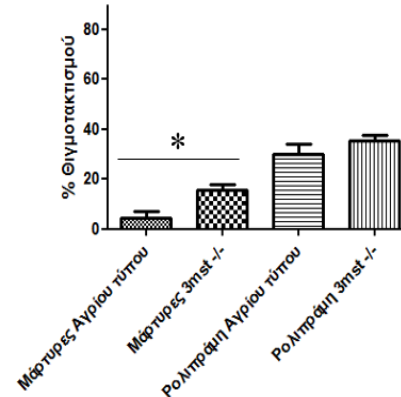
A

25μM Ρολιπράμης

Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (ρολιπράμη για 1 ώρα)



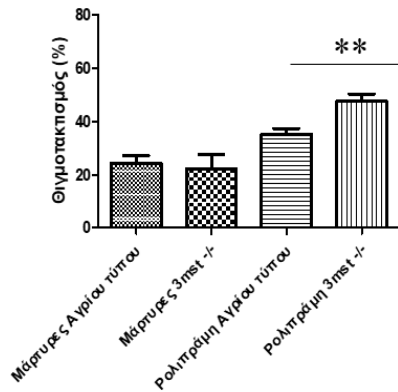
Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (ρολιπράμη για 4 ώρες)



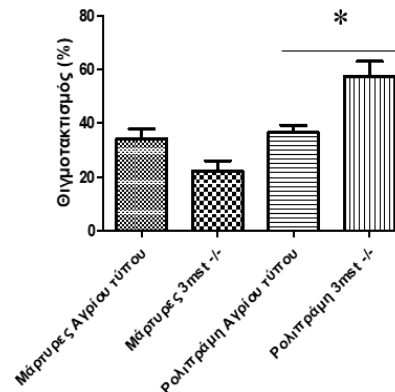
B

50μM Ρολιπράμης

Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (με ρολιπράμη για 1 ώρα)

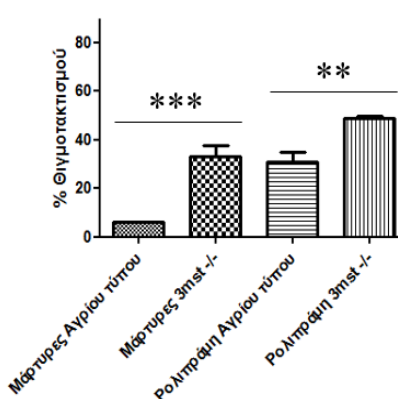


Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (με ρολιπράμη για 4 ώρες)

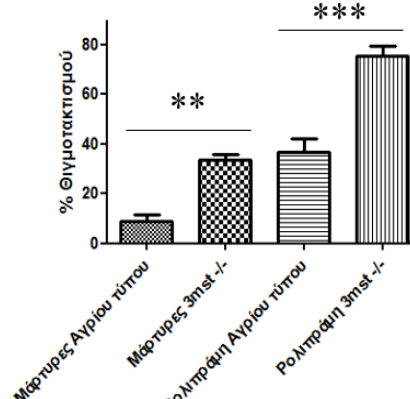


Πείραμα 1°

Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (με ρολιπράμη για 1 ώρα)

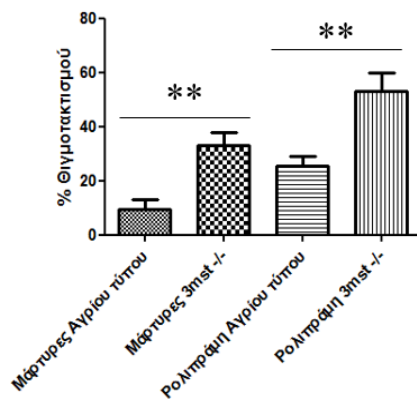


Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (με ρολιπράμη για 4 ώρες)

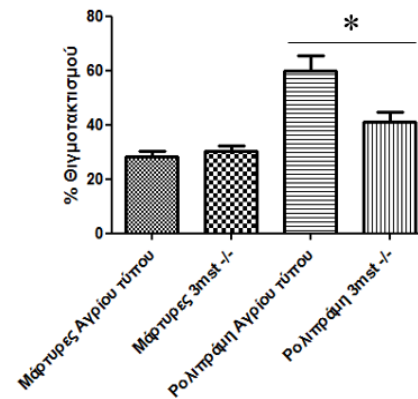


Πείραμα 2°

Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (ρολιπράμη για 1 ώρα)



Δοκιμασία θιγμοτακτισμού (ρολιπράμη για 4 ώρες)

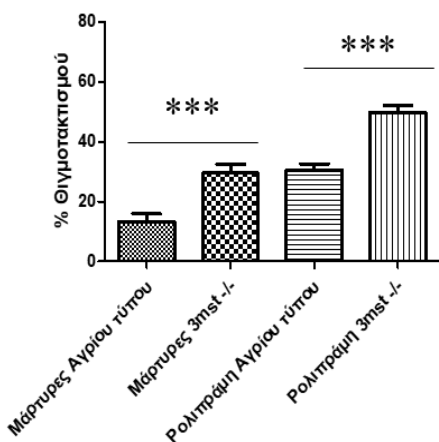


Πείραμα 3^ο

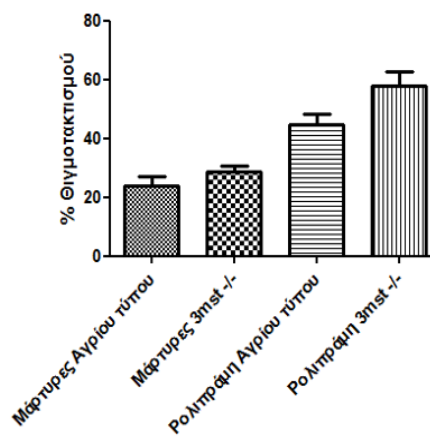
Εικόνα 4.10: Διαγράμματα στα οποία απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού θιγμοτακτισμού για τις 4 διαφορετικές συνθήκες στη 1hrt και 4hrt ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (± SEM), για κάθε πείραμα. Η στατιστική επεξεργασία των τιμών έγινε μέσω unpaired t-test και one-way ANOVA με το σημείο * να υποδηλώνει επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$, το ** επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.01$ και το *** επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.0001$.

50μM Ρολιπράμης

Συγκεντρωτικά δεδομένα (ρολιπράμη για 1 ώρα)



Συγκεντρωτικά δεδομένα (ρολιπράμη για 4 ώρες)



Εικόνα 4.11: Διαγράμματα στα οποία απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού θιγμοτακτισμού για τις 4 διαφορετικές συνθήκες στη 1hrt και 4hrt ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (± SEM), από τα συγκεντρωτικά δεδομένα των πειραμάτων χορήγησης 50μM ρολιπράμης. Σε 1hrt, τα μεταλλαγμένα έμβρυα εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά θιγμοτακτισμού σε σχέση με τα έμβρυα αγρίου τύπου τόσο στην περίπτωση της χορήγησης φαρμάκου όσο και στη συνθήκη ελέγχου. Η τάση αυτή δείχνει να διατηρείται στις 4hrt, χωρίς να υποστηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα. Η στατιστική επεξεργασία των τιμών έγινε μέσω δοκιμασίας one-way ANOVA με το σημείο *** να υποδηλώνει επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.0001$.

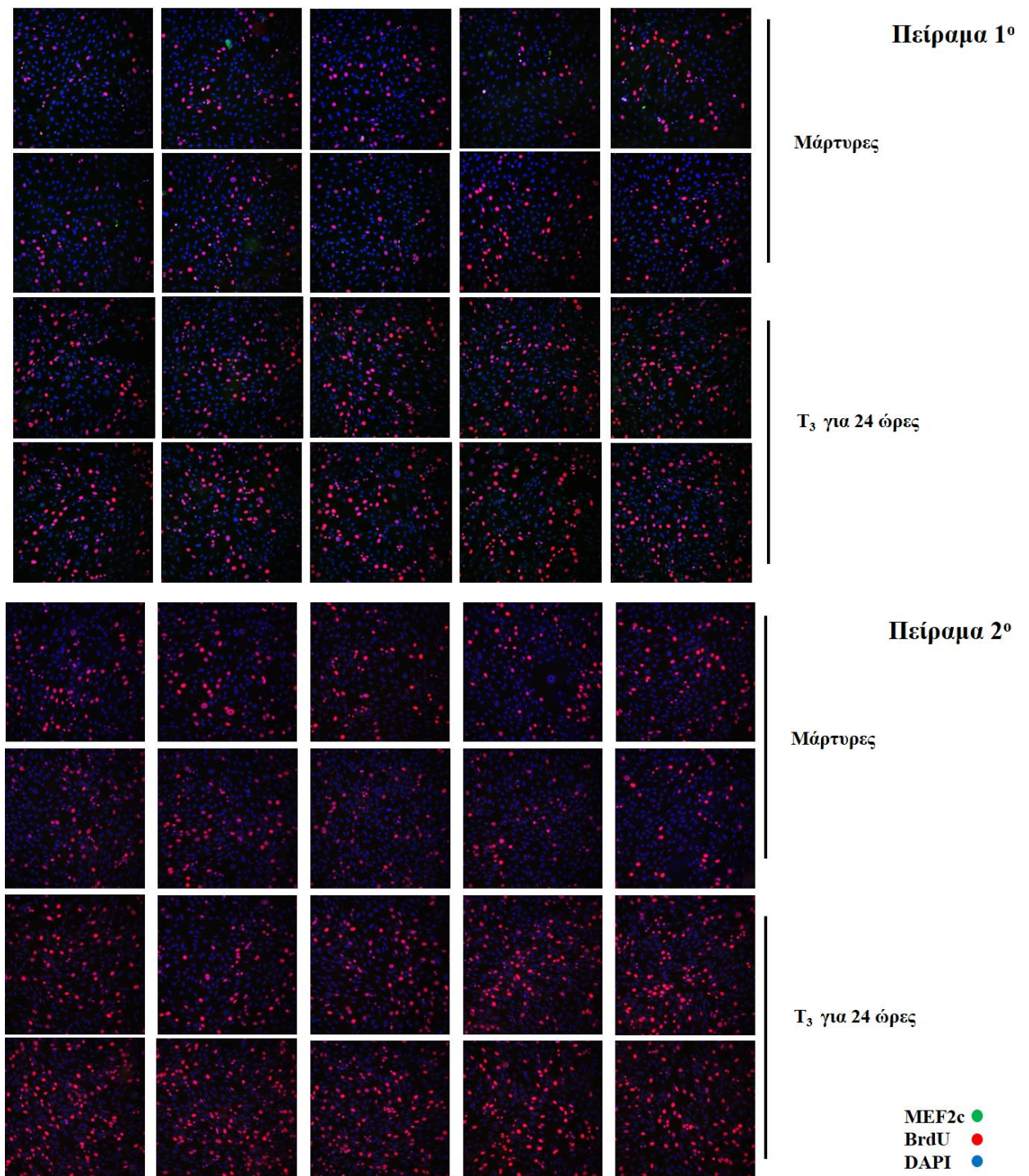
4.2 *In vitro* μελέτη της επίδρασης της T₃ στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της H9c2 κυτταρικής σειράς

Για τη διερεύνηση του ρόλου της T₃ στην πολλαπλασιαστική ικανότητα και τη διαφοροποίηση καρδιακών μυοβλαστών H9c2 πραγματοποιήθηκε χορήγηση της T₃ για 24 ώρες και BrdU για 4 ώρες πριν τη λήξη της επώασης της ορμόνης, σε κύτταρα της συγκεκριμένης σειράς. Τα κύτταρα αυτά είχαν υποστεί στέρηση ορού προκειμένου να αποφευχθεί η λήψη πειραματικού αποτελέσματος από τα ποικίλα συστατικά του. Ακολούθησε πείραμα ανοσοκυτταροχημείας για τη σήμανση του BrdU, ώστε να ανιχνευθούν τα κύτταρα που βρίσκονται σε φάση διαίρεσης, και του μεταγραφικού παράγοντα MEF2c με σκοπό τη μελέτη του σταδίου κυτταρικής διαφοροποίησης. Με τη χρήση κατάλληλου μέσου εγκλεισμού έγινε επιπρόσθετη πυρηνική σήμανση με DAPI.

Μετά από την απαραίτητη επεξεργασία, τα κύτταρα παρατηρήθηκαν και φωτογραφήθηκαν σε ορθό μικροσκόπιο φθορισμού (Εικόνα 4.12). Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η εικόνα που προκύπτει οφείλεται σε πραγματική αναγνώριση των πρωτογενών αντισωμάτων από τα συζευγμένα με φθορίζουσα ένωση δευτερογενή αντισώματα, αξιολογείται ο αρνητικός μάρτυρας (Εικόνα 4.13).

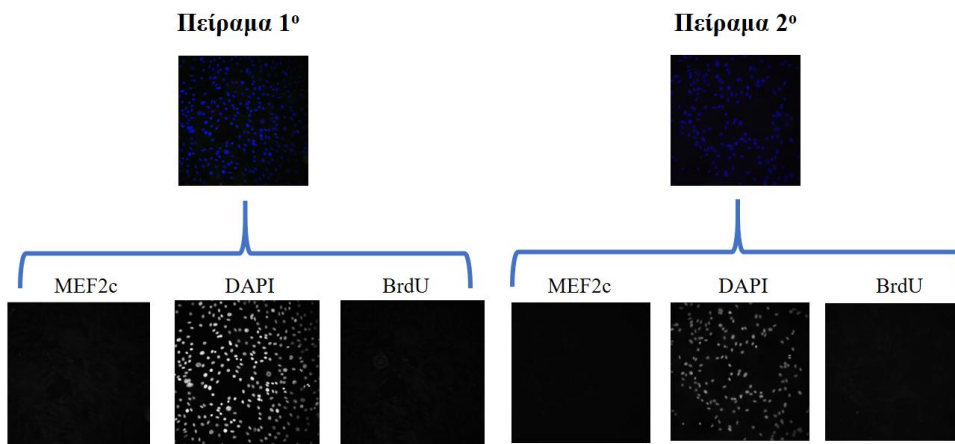
Εφόσον παρατηρήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού πως η σήμανση του BrdU είναι αυξημένη στα κύτταρα που χορηγήθηκε T₃ σε σχέση με τους μάρτυρες, ακολούθησε ακριβής μέτρηση των BrdU θετικών και DAPI κυττάρων με τη χρήση ειδικά διαμορφωμένου προγράμματος και υπολογισμός του ποσοστού BrdU+/DAPI σημασμένων κυττάρων για κάθε πεδίο. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση (unpaired t-test) η οποία αποκάλυψε την ύπαρξη στατιστικά σημαντικής διαφοράς στην αναλογία BrdU+/DAPI μεταξύ των κυττάρων που είχαν υποστεί επώαση με T₃ και των κυττάρων στα οποία δεν είχε χορηγηθεί ορμόνη (Εικόνα 4.14). Συγκεκριμένα, στη συνθήκη 24ωρης χορήγησης T₃ παρουσιάζεται αυξημένο ποσοστό διαιρούμενων κυττάρων ως προς το κυτταρικό σύνολο (DAPI) κατά μέσο όρο κατά 48,3 % σε σύγκριση με τα κύτταρα – μάρτυρες.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέρχονται από δύο επαναλήψεις του πειράματος, όπου κάθε φορά χρησιμοποιούνταν 1-2 καλυπτρίδες ανά συνθήκη. Κάθε καλυπτρίδα περιείχε περίπου 50.000 κύτταρα.

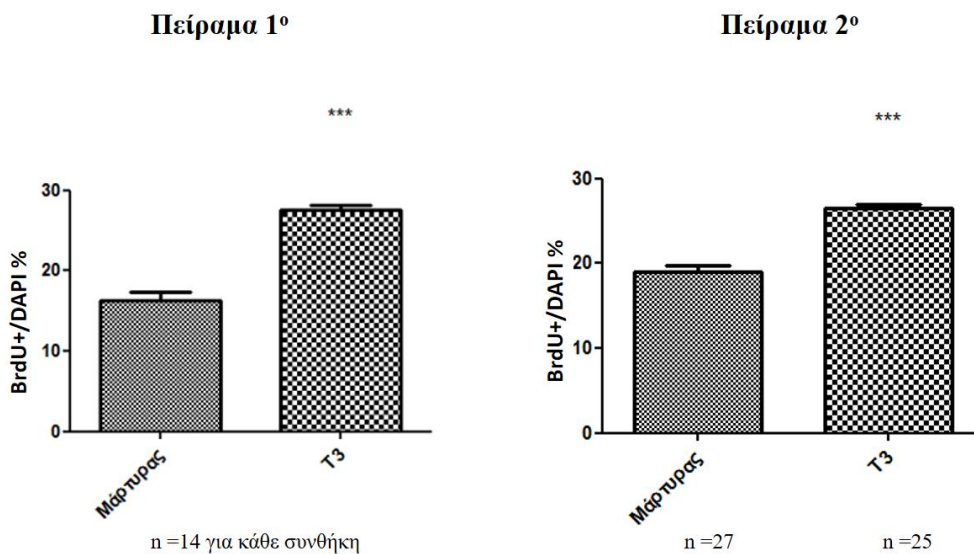


Εικόνα 4.12: Αποτελέσματα πειραμάτων ανοσοσήμανσης σε κύτταρα που έχουν υποστεί επώαση με T₃ και σε κύτταρα χωρίς χορήγηση ορμόνης (μάρτυρες). Το πρότυπο σήμανσης για το MEF2c (πράσινο), το BrdU (κόκκινο) και το DAPI (μπλε) είναι πυρηνικό. Σε όλα τα κύτταρα κάθε πεδίου παρατηρείται θετικό σήμα για τους δείκτες MEF2c και DAPI, ενώ ορισμένα καρδιομυοκύτταρα σημαίνονται με BrdU. Στην περίπτωση της συνθήκης της 24ωρης επώασης με T₃ ανιχνεύονται περισσότερα BrdU θετικά κύτταρα σε σύγκριση με τους μάρτυρες. Το σήμα για το MEF2c δε διαφοροποιείται μεταξύ των δύο συνθηκών. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από ορθό μικροσκόπιο φθορισμού με x20 φακό.

Αρνητικός μάρτυρας

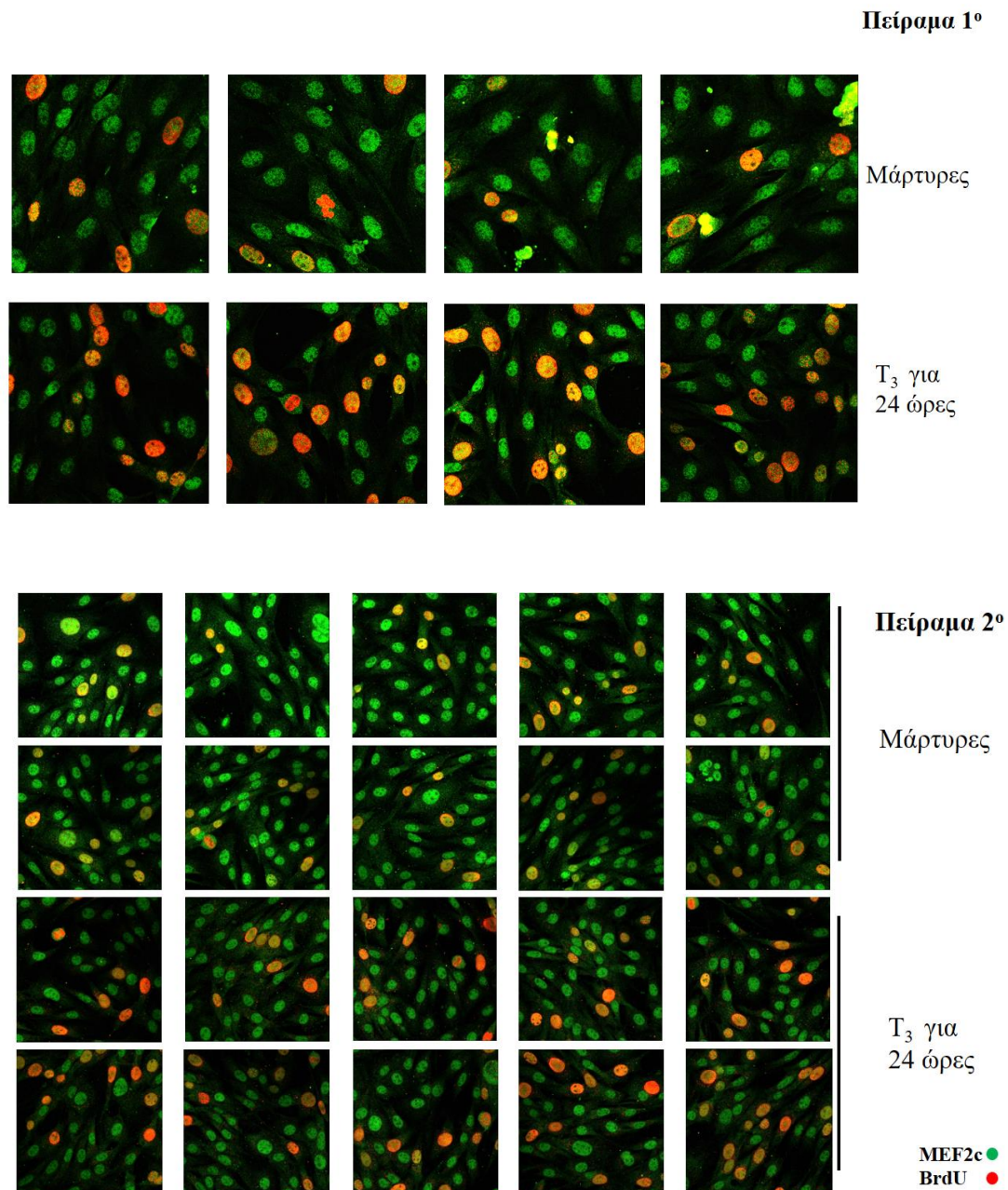


Εικόνα 4.13: Παρατήρηση του προτύπου σήμανσης στον αρνητικό μάρτυρα. Το δείγμα αρνητικού μάρτυρα αποτελούν κύτταρα τα οποία έχουν επωαστεί αποκλειστικά με δευτερογενή αντισώματα, ώστε να επιβεβαιωθεί πως αυτά δε δεσμεύονται σε επιπρόσθετες μη ειδικές θέσεις πέρα από τη σταθερή περιοχή των πρωτογενών αντισωμάτων. Πράγματι, από την παρατήρηση της εικόνας κάθε δείκτη ξεχωριστά, διαπιστώνεται πως δεν ανιχνεύεται σήμα φθορισμού στην περίπτωση του MEF2c και του BrdU χωρίς τη χορήγηση των αντίστοιχων πρωτογενών αντισωμάτων. Το DAPI ενσωματώνεται στον πυρήνα όλων των κυττάρων από το μέσο εγκλεισμού. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από ορθό μικροσκόπιο φθορισμού με x20 φακό.



Εικόνα 4.14: Διάγραμμα στο οποίο απεικονίζεται η μέση τιμή του ποσοστού BrdU+/DAPI σημασμένων κυττάρων ανά πεδίο για τις δύο διαφορετικές συνθήκες ± το σταθερό σφάλμα της μέσης τιμής (± SEM), για κάθε πείραμα. Ο αριθμός πεδίων (n) που λήφθηκαν ανά συνθήκη και σε κάθε πείραμα αναγράφεται στην εικόνα. Η στατιστική επεξεργασία των τιμών έγινε μέσω two-tailed t-test με το σημείο *** να υποδηλώνει επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.0001$.

Παράλληλα, σε κάθε πείραμα τα δείγματα παρατηρήθηκαν στο συνεστιακό μικροσκόπιο με μεγαλύτερη μεγέθυνση προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει διαφορά στη μορφολογία των κυττάρων και κατ' επέκταση στο στάδιο διαφοροποίησης τους μεταξύ των δύο συνθηκών. Ωστόσο, δεν εντοπίστηκε μεταβολή στο κυτταρικό σχήμα συγκρίνοντας τα δείγματα χορήγησης της T₃ με τους μάρτυρες (Εικόνα 4.15).



Εικόνα 4.15: Παρατήρηση της μορφολογίας των σημασμένων κυττάρων στις δύο διαφορετικές συνθήκες. Τόσο στην περίπτωση της χορήγησης T₃ όσο και στα κύτταρα – μάρτυρες παρατηρούνται διακλαδιζόμενα κύτταρα με έναν κεντρικό, στρογγυλό πυρήνα στο καθένα. Οι φωτογραφίες λήφθηκαν από συνεστιακό μικροσκόπιο με x40 φακό.

5. Συζήτηση

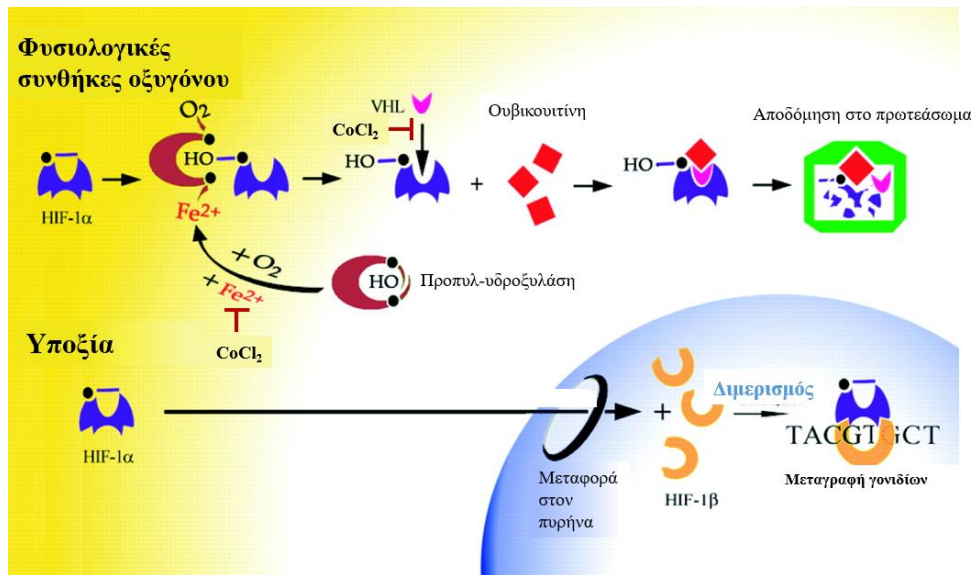
5.1 *In vivo* διερεύνηση της έλλειψης του ενζύμου 3MST στο ζωικό μοντέλο zebrafish

Στο παρελθόν το υδρόθειο ήταν ευρέως γνωστό για την τοξικότητά του, ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ως το τρίτο μέλος της οικογένειας αέριων διαβιαστών που συντίθεται από τους ζωντανούς οργανισμούς και έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον στον τομέα της έρευνας λόγω των πολλαπλών φυσιολογικών και παθολογικών ρόλων του σε ποικίλα συστήματα του σώματος. Η δράση του ενζύμου 3MST αποτελεί μία από τρεις πηγές ενζυματικής παραγωγής H_2S , εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και στο κυτοσόλιο και ανεπάρκεια ή έλλειψη αυτού οδηγεί στην ανθρώπινη ασθένεια mercaptolactate-cysteine disulfiduria. Παράλληλα, το zebrafish έχει αναδειχθεί τα τελευταία χρόνια σε ένα από τα χρησιμότερα ζωικά μοντέλα για τη μελέτη της ανάπτυξης των σπονδυλωτών, την *in vivo* διερεύνηση της λειτουργίας γονιδίων και τη μοντελοποίηση ανθρώπινων ασθενειών, εξαιτίας των ποικίλων πλεονεκτημάτων που προσφέρει (Beis and Stainier, 2006). Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διερευνήσαμε την επίδραση της έλλειψης του ενζύμου 3MST αξιοποιώντας το ζωικό μοντέλο zebrafish. Εξηγώντας, χρησιμοποιήσαμε μία σειρά zebrafish που έχει υποστεί στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο ορθόλογο γονίδιο του 3-MST, μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9. Η προσθήκη ενός παραπάνω νουκλεοτιδίου με την αζωτούχα βάση θυμίνη στην αλληλουχία του πρώτου εξωνίου του γονιδίου – στόχου, σε περιοχή κοντά στο κωδικόνιο έναρξης, πιστεύεται πως οδηγεί σε ανερμηνεύσιμη (nonsense), πλαισιοτροποποιητική μεταλλαγή που καθιστά το πρωτεϊνικό προϊόν μη λειτουργικό. Ωστόσο, τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα εμφανίζουν φυσιολογική μορφολογία και ανάπτυξη. Συνεπώς, εξετάσαμε την ανθεκτικότητά τους κάτω από διαφορετικές συνθήκες στρες για τον χαρακτηρισμό πιθανού παθολογικού φαινοτύπου, με απώτερο σκοπό τη διαλεύκανση του μοριακού μηχανισμού που σχετίζεται με τη λειτουργία του παραπάνω γονιδίου και κατ' επέκταση του υδρόθειου και την πιθανή εύρεση σύνδεσης αυτού με τον αντίστοιχο στον άνθρωπο.

Προκειμένου να εξετάσουμε την απόκριση των μεταλλαγμένων εμβρύων σε υποξικό περιβάλλον, προσθέσαμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου κοβαλτίου (1mM και 2mM) στο υδάτινο μέσο όπου αναπτύσσονταν zebrafish 3-*mst*^{-/-}

και αγρίου τύπου ηλικίας 1 ημέρας. Μέχρι και την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση τα έμβρυα δε χαρακτηρίζονταν από εμφανή φαινότυπο, ενώ στις 4dpf παρατηρήσαμε μείωση της κινητικότητας τόσο στα μεταλλαγμένα όσο και στα αγρίου τύπου έμβρυα συγκριτικά με τα έμβρυα – μάρτυρες, ειδικότερα στην υψηλότερη συγκέντρωση CoCl_2 . Επιπροσθέτως, μέσα σε 5 ημέρες χημικής επώασης καταγράψαμε ~50% θνησιμότητα στη συνθήκη χορήγησης 2mM CoCl_2 σε κάθε περίπτωση γονοτύπου.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν αναγνωρίσει τον ρόλο του χλωριούχου κοβαλτίου στην προώθηση απόκρισης που μιμείται την υποξία, εξαιτίας της σταθεροποίησης του επαγόμενου από την υποξία παράγοντα 1α (hypoxia-inducible factor 1α, HIF-1α). Εξηγώντας, η ενεργότητα του HIF-1α ελέγχεται μετα-μεταφραστικά με τη δράση εξαρτώμενων από το οξυγόνο προπυλ-υδροξυλασών. Σε φυσιολογικές συνθήκες οξυγόνου τα ένζυμα αυτά προσθέτουν μια ομάδα υδροξυλίου στον HIF-1α και τον στοχεύουν προς αποδόμηση στο πρωτεάσωμα. Η διαδικασία αυτή διευκολύνεται από τη δέσμευση της πρωτεΐνης καταστολέα όγκου von Hippel-Lindau (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein, pVHL). Στην υποξία, η ενεργότητα των προπυλ-υδροξυλασών μειώνεται, ο HIF-1α σταθεροποιείται και μεταφέρεται στον πυρήνα, όπου δημιουργεί ετεροδιμερές σύμπλοκο με τον παράγοντα HIF-1β ώστε να μεταγραφούν γονίδια – στόχοι που περιέχουν ανταποκρινόμενα σε HIF στοιχεία (HIF-responsive elements, HRE) στη ρυθμιστική τους περιοχή (Elks et al., 2015). Το χλωριούχο κοβάλτιο μπορεί να αντικαταστήσει το σίδηρο από το κέντρο δέσμευσης σιδήρου των προπυλ-υδροξυλασών και να αδρανοποιήσει την αντίδραση υδροξυλίωσης (Epstein et al., 2001). Επιπρόσθετα, συνδέεται άμεσα στον παράγοντα HIF-1α αναστέλλοντας τη δέσμευση της πρωτεΐνης VHL (Yuan et al., 2003) (Εικόνα 5.1). Συνεπώς, το CoCl_2 αποτελεί έναν αναγνωρισμένο παράγοντα χημικής υποξίας, ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί σε ποικίλα συστήματα (Hara et al., 2006; Liu et al., 1999) λόγω του χαμηλού κόστους και της ευκολίας ελέγχου του επιπέδου υποξίας μέσω μεταβολής της χορηγούμενης συγκέντρωσης.



Εικόνα 5.1: Σχηματική απεικόνιση της ρύθμισης της σταθεροποίησης του παράγοντα HIF-1α και η επίδραση του χλωριούχου κοβαλτίου. Ανατύπωση και τροποποίηση (LaManna et al., 2004)

Στο πλαίσιο αναζήτησης επιστημονικής βιβλιογραφίας, εντοπίσαμε διαφορετικούς συνδέσμους μεταξύ του ενδογενώς παραγόμενου υδρόθειου και της υποξικής απόκρισης. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί στοιχεία δέσμευσης HIF στον υποκινητή του ενζύμου CBS και έχει αποδειχθεί πως η υποξία αυξάνει τα επίπεδα του ενζύμου αυτού με έναν HIF-εξαρτώμενο τρόπο σε απομονωμένα ανθρώπινα κύτταρα γλοιοβλαστώματος (Takano et al., 2014). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με *in vivo* πειραματική προσέγγιση, καθώς αρουραίοι που είχαν τοποθετηθεί σε θάλαμο υποξίας παρουσίασαν αυξημένη έκφραση και ενεργότητα του CBS στην παρεγκεφαλίδα και τον φλοιό. Επιπρόσθετα, αποδείχθηκε πρόσφατα πως η χρόνια υποξία ενισχύει τα επίπεδα του H₂S και την έκφραση του ενζύμου CSE σε ένα μοντέλο ποντικού για την ισχαιμία του οπίσθιου άκρου (Kolluru et al., 2015). Σε μία επιπρόσθετη μελέτη, ο Flannigan και οι συνεργάτες του απέδειξαν σε μοντέλα αρουραίου και ποντικίου πως η ελάττωση της παραγωγής υδρόθειου που προέρχεται από το ένζυμο CSE μειώνει τη σταθερότητα του παράγοντα του HIF-1α, υποδεικνύοντας πως η ενδογενής βιοσύνθεση H₂S είναι σημαντική για τη σηματοδότηση HIF-1. Πράγματι, η χορήγηση μιας ένωσης απελευθέρωσης υδρόθειου που ονομάζεται διαλλυλ-δισουλφίδιο (diallyl disulfide, DADS) σταθεροποίησε την έκφραση του HIF-1α και ενίσχυσε τη μεταγραφή γονιδίων που αποκρίνονται στην υποξία (Flannigan et al., 2015). Παρομοίως, η προσθήκη εξωγενούς ουσίας-δότη H₂S σε ενδοθηλιακά κύτταρα τριχοειδών εγκεφάλου αρουραίου που είχαν υποστεί επώαση

με χλωριούχο κοβάλτιο οδήγησε σε αύξηση του HIF-1α σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης και ενίσχυση της δέσμευσης του συμπλόκου HIF-1 στο DNA (Liu et al., 2010).

Με βάση τις παραπάνω πληροφορίες συμπεραίνουμε πως τα αποτελέσματα μας υποστηρίζουν τον ρόλο του CoCl_2 στην προώθηση απόκρισης που μιμείται την υποξία εφόσον μετά από συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα εντοπίστηκε μείωση της κινητικότητας και των ποσοστών επιβίωσης σε έμβρυα zebrafish. Αξίζει να αναφερθεί πως οι παρατηρήσεις μας όσον αφορά τα ποσοστά θνησιμότητας και την απουσία μορφολογικού φαινοτύπου στις *3dprf* συμβαδίζουν με τα δεδομένα από προηγούμενη μελέτη εφαρμογής χλωριούχου κοβαλτίου σε έμβρυα zebrafish από τον Wu και τους συνεργάτες του (Wu et al., 2015). Ωστόσο, η ενδογενής παραγωγή υδρόθειου από το ένζυμο 3-MST δε δείχνει να συνδέεται με την απόκριση σε συνθήκες χημικά επαγόμενης υποξίας και τη σηματοδότηση HIF-1, καθώς τα έμβρυα zebrafish με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο στο ορθόλογο γονίδιο του *3-MST* σε ομόζυγη κατάσταση δε χαρακτηρίζονται από διαφορετική αντίδραση σε σύγκριση με τα έμβρυα φυσιολογικού γενετικού υποβάθρου κατά τη διάρκεια ανάπτυξης σε χλωριούχο κοβάλτιο.

Παράλληλα, δεδομένων των αντι-αποπτωτικών (Elrod et al., 2007; Sodha et al., 2008; Yao et al., 2010; Zhuo et al., 2009) και καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων του υδρόθειου (Calvert et al., 2009; Huang et al., 2012; Yong et al., 2008b), επιλέξαμε να συγκρίνουμε την ικανότητα ανάκαμψης του καρδιακού ιστού μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων. Με τη δημιουργία κατάλληλων διαγονιδιακών σειρών που βασίζονται στο σύστημα της ζύμης Gal4/UAS και τη χρήση του συστήματος NTR-Mtz, προκαλέσαμε μη επεμβατική, στοχευμένη καταστροφή καρδιομυοκυττάρων σε έμβρυα zebrafish ηλικίας 2 ή 3 ημερών και παρατηρήσαμε την απόκριση τους. Και στις δύο συνθήκες επώασης Mtz που δοκιμάστηκαν, τόσο τα έμβρυα με τη μεταλλαγή σε ομόζυγη κατάσταση όσο και τα έμβρυα με το φυσιολογικό αλληλόμορφο εμφάνισαν αιμάτωμα στην περιοχή της καρδιάς, περικαρδιακό οίδημα και επιβάρυνση του καρδιακού παλμού και της κυκλοφορίας. Τα χαρακτηριστικά αυτά επιδεινώθηκαν με αποτέλεσμα τα διαγονιδιακά έμβρυα στα οποία χορηγήθηκε μετρονιδαζόλη να πεθαίνουν μετά από 3-4 ημέρες. Η εμφάνιση εντονότερων συμπτωμάτων όσον αφορά το περικαρδιακό οίδημα στα διαγονιδιακά έμβρυα αγρίου τύπου στην περίπτωση

έκθεσης σε 1mM Mtz για 4 ώρες σχετίζεται με ενδογενή επιβάρυνση από το διαγονίδιο ή από τη συγκεκριμένη γέννα παρά με μειωμένη αναγεννητική ικανότητα καθώς ο φαινότυπος αυτός χαρακτηριζε και τα έμβρυα ελέγχου. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, φαίνεται πως το ένζυμο 3-MST δεν εμπλέκεται στη διαδικασία αναγέννησης του μυοκαρδίου στο zebrafish, ωστόσο το ζήτημα θα μπορούσε να διερευνηθεί περαιτέρω τροποποιώντας τη συγκέντρωση της μετρονιδαζόλης που χορηγείται, τον χρόνο επώασης και το αναπτυξιακό στάδιο των εμβρύων που εκτίθενται σε αυτή.

Συνεχίζοντας, το 3-MST είναι το μόνο ένζυμο ενδογενούς βιοσύνθεσης H₂S το οποίο έχει μιτοχονδριακό εντοπισμό ενώ παράλληλα τα κύτταρα του μυοκαρδίου βρίθουν από μιτοχόνδρια. Με βάση τα συγκεκριμένα χαρακτηριστικά αποφασίσαμε να ελέγξουμε την ανθεκτικότητα των μεταλλαγμένων προνυμφών στην καταστροφή των μιτοχονδρίων μέσω πρόκλησης οξειδωτικού στρες από το γνωστό ζιζανιοκτόνο παρακουάτ, εστιάζοντας στην επιρροή της καρδιακής λειτουργίας. Η μιτοχονδριακή τοξικότητα του PQ οφείλεται στην αναστολή του συμπλέγματος I της αναπνευστικής αλυσίδας η οποία οδηγεί σε μεταβολή της κατανάλωσης οξυγόνου, βλάβη του μεταβολισμού ενέργειας και αύξηση των ROS (Blanco-Ayala et al., 2014; Bretaud et al., 2004). Πράγματι, αφού τοποθετήσαμε μεταλλαγμένα και αγρίου τύπου zebrafish ηλικίας 5 ημερών σε νερό με 500μg/ml PQ παρατηρήσαμε πως μετά από 48 ώρες επώασης οι *3mst*^{-/-} προνύμφες εμφανίζουν αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας, αρρυθμίες και στατιστικά σημαντική ελάττωση του καρδιακού ρυθμού. Επομένως η έλλειψη του ενζύμου 3-MST καθιστά τις προνύμφες zebrafish περισσότερο ευαίσθητες στη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και τη συσσώρευση ενεργών ριζών οξυγόνου.

Επιπροσθέτως, επιβεβαιώσαμε τη δράση του PQ στην καταστροφή των μιτοχονδρίων εκτελώντας *in vivo* μιτοχονδριακή σήμανση σε προνύμφες zebrafish με τη φθορίζουσα χρωστική Mitotracker. Από τη συγκεκριμένη διαδικασία, εντοπίσαμε χαμηλό έως ανύπαρκτο σήμα φθορισμού στους νευρομαστούς των προνυμφών που είχαν υποστεί 48ωρη έκθεση σε PQ ενώ η οργάνωση των δομών αυτών ήταν φυσιολογική στις προνύμφες – μάρτυρες. Οι νευρομαστοί αποτελούν βασικά συνθετικά όργανα της πλευρικής γραμμής των ιχθύων. Παράλληλα, πρέπει να αναφερθεί πως παρατηρήσαμε μείωση της κινητικότητας σε όσες προνύμφες κατάφεραν να επιβιώσουν μετά από 2-3 ημέρες επώασης με παρακουάτ. Προηγούμενες μελέτες υποστηρίζουν πως η χορήγηση PQ οδηγεί σε ελάττωση της

μετακίνησης στο zebrafish (Bortolotto et al., 2014) καθώς και σε άλλα ζωικά μοντέλα όπως τη μύγα *Drosophila melanogaster* (Jimenez-Del-Rio et al., 2010) και το ποντίκι (Litteljohn et al., 2009; Shepherd et al., 2006), αποδίδοντας τον φαινότυπο αυτό στην ευαισθησία των ντοπαμινεργικών νευρώνων στο συγκεκριμένο φάρμακο (Brooks et al., 1999). Συνεπώς η βλάβη της κινητικής δραστηριότητας στο zebrafish που επάγεται από το παρακουάτ πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της απώλειας των νευρικών κυττάρων που παράγουν ντοπαμίνη αλλά και της αλλοίωσης του αισθητήριου συστήματος της πλευρικής γραμμής.

Προκειμένου να εξηγήσουμε την αυξημένη ευαισθησία των μεταλλαγμένων προνυμφών στο οξειδωτικό στρες, προχωρήσαμε σε βιβλιογραφική μελέτη για εύρεση πιθανής σύνδεσης του υδρόθειου με τη διαχείριση των ενεργών ριζών οξυγόνου. Πολυάριθμες δημοσιεύσεις αναφέρουν πως το H_2S έχει αντιοξειδωτική δράση είτε λόγω εκκαθάρισης των ROS μέσω ενίσχυσης μη ενζυματικών μηχανισμών ή/και λόγω αύξησης της έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων. Ορισμένοι από τους τρόπους με τους οποίους το υδρόθειο επιδρά στην αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες αναφέρονται παρακάτω:

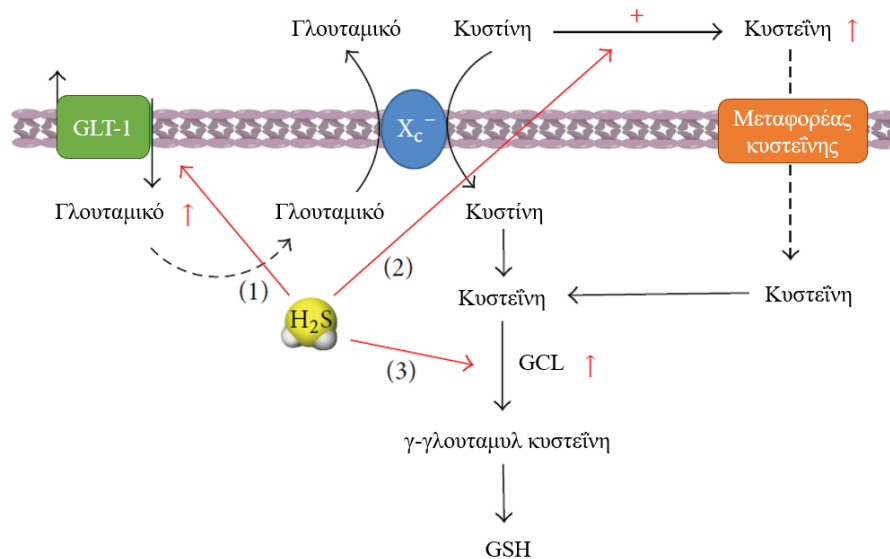
- Ενίσχυση της ενεργότητας των SOD. Στην έρευνα των Sun και συν. η επώαση νεογνικών καρδιομυοκυττάρων αρουαίου με $NaSH$, το οποίο αποτελεί δότη υδρόθειου, μειώνει τα επίπεδα των ROS σε συνθήκες υποξίας /επανοξυγόνωσης (Sun et al., 2012). Η ελάττωση αυτή συνδέθηκε με την παράλληλη αύξηση της ενεργότητας της Mn-SOD και της CuZn-SOD που παρατηρήθηκε. Προκειμένου να διαπιστώσουν αν η ενίσχυση της ενεργότητας των ενζύμων αυτών συνοδεύεται από τροποποίηση της έκφρασης τους, οι ερευνητές μέτρησαν τα πρωτεϊνικά επίπεδα των Mn-SOD και CuZn-SOD. Πράγματι, η έκφραση της Mn-SOD ήταν αυξημένη στα καρδιομυοκύτταρα που είχαν επωαστεί με $NaHS$, ωστόσο η έκφραση της CuZn-SOD δεν είχε μεταβληθεί. Η επαγωγή της ενεργότητας της CuZn-SOD αποδόθηκε σε πιθανή δέσμευση του υδρόθειου σε κρίσιμο σημείο του ενζύμου και αλλοστερική τροποποίηση αυτού καθώς επιβεβαίωσαν πως το H_2S μπορεί να συνδεθεί στο ένζυμο, αξιοποιώντας σύστημα ελεύθερο κυττάρων (cell free system) και θερμιδομετρική ανάλυση. Η άποψη πως το H_2S ασκεί προστατευτικό ρόλο αυξάνοντας τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων έχει υποστηριχθεί και από *in vivo* μελέτες σε αρουαίους (Liu et al., 2009; Su et al., 2009).

- Ενδοκυτταρική αύξηση της ανηγμένης γλουταθειόνης (glutathione, GSH). Η γλουταθειόνη αποτελεί ένα βασικό αντιοξειδωτικό μόριο στην κυτταρική άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες και συντίθεται ενδοκυτταρικά από κυστεΐνη. Υπάρχουν δύο μορφές κυστεΐνης, η οξειδωμένη κυστίνη και η ανηγμένη κυστεΐνη. Εξαιτίας της οξειδοαναγωγικής αστάθειας, η κυστεΐνη εξωτερικά του κυττάρου βρίσκεται υπό τη μορφή κυστίνης η οποία μεταφέρεται στα κύτταρα μέσω του αντι-μεταφορέα κυστίνης/γλουταμικού X_c^- . Στη συνέχεια η κυστίνη ανάγεται και χρησιμοποιείται για τη βιοσύνθεση της GSH (Lewerenz et al., 2012). Συνεπώς, το γλουταμικό αποτελεί κρίσιμο αναστολέα του συστήματος X_c^- . Οι Lu και συν. έδειξαν πως η εξωγενής χορήγηση υδρόθειου προστατεύει αστροκύτταρα αρουραίου από επαγόμενες από το H_2O_2 βλάβες μέσω προώθησης της πρόσληψης γλουταμικού από τον μεταφορέα γλουταμικού γλοίας 1 (glial glutamate transporter 1, GLT-1) και κατ' επέκταση μέσω αύξησης της μεταφοράς κυστίνης και τελικά επαγωγής της ενδοκυτταρικής παραγωγής GSH (Lu et al., 2008) (Εικόνα 5.2).

Σε μία επιπρόσθετη μελέτη, ο Kimura και οι συνεργάτες του πρότειναν έναν εναλλακτικό μηχανισμό συμβολής του H_2S στη μετατροπή των ενδοκυτταρικών επιπέδων GSH. Πιο συγκεκριμένα, ανέφεραν πως το υδρόθειο που παράγεται ενδογενώς στα κύτταρα μπορεί να απελευθερώνεται στον εξωκυττάριο χώρο και να ανάγει την κυστίνη σε κυστεΐνη η οποία στη συνέχεια εισάγεται στο κύτταρο μέσω ενός μεταφορέα κυστεΐνης διαφορετικού από το σύστημα X_c^- (Kimura et al., 2010). Παράλληλα, οι Jain και συν. απέδειξαν πως το υδρόθειο αυξάνει την παραγωγή GSH σε μονοκύτταρα μέσω επαγωγής της έκφρασης της καταλυτικής και ρυθμιστικής υπομονάδας της λιγάσης γλουταμικού – κυστεΐνης (glutamate-cysteine ligase, GCL) (Jain et al., 2014) (Εικόνα 5.2).

- Αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων θειορεδοξίνης. Η θειορεδοξίνη είναι ένα μικρό μόριο που περιλαμβάνει ένα μοτίβο Cys-Gly-Pro-Cys και μέσω αντιδράσεων οξειδοαναγωγής στα δύο κατάλοιπα κυστεΐνης συμβάλλει στην εκκαθάριση των ROS και την προστασία του κυττάρου έναντι του οξειδωτικού στρες (Nordberg and Arnér, 2001). Η χορήγηση εξωγενούς υδρόθειου αυξάνει την έκφραση της θειορεδοξίνης ενώ παράλληλα βελτιώνει τα συμπτώματα καρδιακής λειτουργίας και δομικών ανωμαλιών σε ποντίκια με ισχαιμική

καρδιακή ανεπάρκεια. Επιπρόσθετα, επαναλαμβάνοντας τα πειράματα σε μεταλλαγμένα για το γονίδιο της θειορεδοξίνης ποντίκια, δείχθηκε πως οι επιδράσεις του H₂S είναι εξαρτώμενες από τη θειορεδοξίνη (Nicholson et al., 2013).



Εικόνα 5.2: Το H₂S αυξάνει την ενδοκυτταρική σύνθεση της GSH. Η GSH προκύπτει από κυστεΐνη και το H₂S ενισχύει την παραγωγή της μέσω (1) επαγωγής της πρόσληψης γλουταμικού και κατ' επέκταση προώθησης της μεταφοράς κυστεΐνης μέσω του συστήματος X_c⁻ (2) εξωκυτταρικής αναγωγής της κυστίνης σε κυστεΐνη, η οποία στη συνέχεια μεταφέρεται στο εσωτερικό του κυττάρου μέσω συγκεκριμένου μεταφορέα (3) αύξησης της έκφρασης της GCL. Ανατύπωση (Xie et al., 2016).

Συλλογικά αυτά τα δεδομένα προτείνουν πως το υδρόθειο έχει την ικανότητα να απομακρύνει τις ενεργές ρίζες οξυγόνου ενδυναμώνοντας το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα. Για την επέκταση της συγκεκριμένης μελέτης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί εξωγενής χορήγηση υδρόθειου ως ενδεχόμενος τρόπος διάσωσης (rescue) του παθολογικού φαινοτύπου των ομόζυγων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο εμβρύων, προκειμένου να ελεγχθεί εάν η εκδήλωση ευαισθησίας στο οξειδωτικό στρες συνδέεται με την εμπλοκή του 3-MST στη βιοσύνθεση του H₂S ή με άλλη πιθανή λειτουργία του. Παραδείγματος χάριν, οι Nagahara και συν. αναφέρουν ότι το ένζυμο 3-MST δε συμμετέχει μόνο στον καταβολισμό της κυστεΐνης για την παραγωγή H₂S αλλά δρα και ως αντιοξειδωτική πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, υποστηρίζουν πως το οξειδοαναγωγικό δυναμικό ρυθμίζει την ενεργότητα του 3-MST στον αρουραίο μέσω ενδομοριακών αλλά και διαμοριακών «διακοπών - αισθητήρων». Οι διαμοριακοί διακόπτες περιλαμβάνουν επιφανειακά κατάλοιπα κυστεΐνης τα οποία

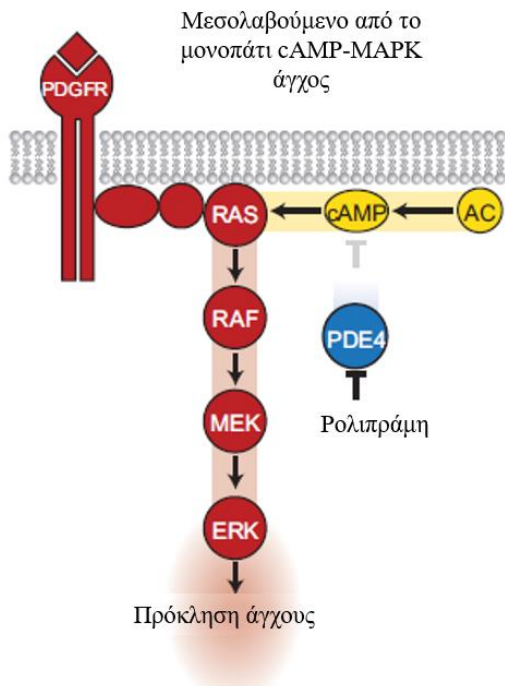
δημιουργούν δισουλφιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν ομοδιμερή. Η ανηγγμένη θειορεδοξίνη διασπά τον συγκεκριμένο δεσμό, επαναφέροντας την ενεργότητα του ενζύμου. Συνεπώς το 3-MST διαθέτει μια ισορροπία ανάμεσα στη μορφή μονομερούς (ενεργή κατάσταση) και διμερούς (ανενεργή κατάσταση) με τη βοήθεια οξειδωτικών και αναγωγικών ενώσεων. Όσον αφορά τον ενδομοριακό διακόπτη, το οξειδωτικό στρες προκαλεί μία παροδική μετατροπή του ενεργού καταλοίπου κυστεΐνης που οδηγεί στην αναστολή του ενζύμου. Υπό αυτές τις συνθήκες αυξάνεται το περιεχόμενο του κυττάρου σε κυστεΐνη η οποία αποτελεί πρόδρομη ένωση ποικίλων αντιοξειδωτικών πχ. θειορεδοξίνη και γλουταθειόνη. Και σε αυτή τη περίπτωση το ένζυμο επανέρχεται στην ενεργή του κατάσταση με τη δράση της ανηγγμένης θειορεδοξίνης. Έτσι, η οξειδοαναγωγική κατάσταση ρυθμίζει τη δραστηριότητα του 3-MST σε ενζυματικό επίπεδο και από την άλλη πλευρά, το 3-MST συμβάλλει στη διατήρηση της κυτταρικής οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Nagahara, 2012; Nagahara and Katayama, 2005; Nagahara et al., 2007).

Επίσης, όπως αναφέρθηκε το 3-MST αποτελεί πρωτεΐνη που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια ενώ συνεχώς αυξανόμενα δεδομένα υποστηρίζουν πως το υδρόθειο έχει την ικανότητα να προστατεύει τα μιτοχόνδρια και να προωθεί τη βιογένεση τους (Kamat et al., 2014; Untereiner et al., 2016). Γι' αυτό το λόγο, χρησιμοποιήσαμε τη φθορίζουσα χρωστική Mitotracker και συγκρίναμε το μιτοχονδριακό δυναμικό μεταξύ μεταλλαγμένων και αγρίου τύπου εμβρύων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Πράγματι στις 55hpf παρατηρήσαμε πως τα *3-mst^{-/-}* έμβρυα εμφανίζουν μειωμένη σήμανση μιτοχονδρίων στην κεφαλή και τη λεκιθική περιοχή, όμως η διαφορά αυτή σε σχέση με τα έμβρυα αγρίου τύπου εξομαλύνεται και δεν είναι ευδιάκριτη στα έμβρυα μεγαλύτερης ηλικίας. Συνεπώς προκειμένου να εξακριβωθεί εάν η απώλεια του ενζύμου 3-MST συνδέεται με την ακεραιότητα των μιτοχονδρίων θα χρειαστεί μελλοντικά να μελετηθεί η σήμανση με Mitotracker εμβρύων μεταγενέστερων αναπτυξιακών σταδίων με τη δημιουργία τομών πχ. σε vibratome και την περισσότερο λεπτομερή παρατήρηση αυτών σε συνεστιακό μικροσκόπιο. Παράλληλα, θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον η μελέτη της σήμανσης των μιτοχονδρίων του καρδιακού ιστού που παρατηρείται στις 72hpf μέσω ελέγχου συνεντοπισμού χρησιμοποιώντας τη διαγονιδιακή σειρά *cmlc2:EGFP*. Επιπλέον, τα μεταλλαγμένα zebrafish θα μπορούσαν να μελετηθούν περαιτέρω ως προς την ορθότητα της φυσιολογίας και της λειτουργικότητας των μιτοχονδρίων τους παραδείγματος χάριν με ανάλυση της

μιτοχονδριακής αναπνευστικής λειτουργίας (Flinn et al., 2009), του μεταβολισμού του μιτοχονδριακού DNA (Artuso et al., 2012), της κατανάλωσης οξυγόνου (Stackley et al., 2011), καθώς και της μιτοχονδριακής μεταφοράς ιόντων ασβεστίου και της αλλαγής διαπερατότητας αυτών (Azzolin et al., 2010).

Τέλος όπως προαναφέρθηκε, η έλλειψη του 3-MST οδηγεί στην ανθρώπινη ασθένεια mercaptolactate-cysteine disulfiduria, μια κληρονομική μεταβολική διαταραχή που στις περισσότερες περιπτώσεις σχετίζεται με μη φυσιολογική συμπεριφορά, νοητική καθυστέρηση, επιληπτικές κρίσεις και ψυχικές διαταραχές, ενώ η παθογένεση αυτής παραμένει άγνωστη (Crawhall et al., 1968; Nagahara et al., 2013). Τα 3-MST-knockout ποντίκια, εμφανίζουν αυξημένο άγχος που εκδηλώνεται μέσω της συμπεριφοράς καθώς και εγκεφαλική δυσλειτουργία. Ωστόσο τα ποντίκια αυτά δεν εμφανίζουν μη φυσιολογική μορφολογία εγκεφάλου (Nagahara et al., 2013). Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, κρίθηκε απαραίτητο τα ομόζυγα ως προς τη μετάλλαξη έμβρυα zebrafish να ελεγχθούν μέσω συμπεριφορικής μελέτης για τυχόν ύπαρξη μη φυσιολογικής συμπεριφοράς.

Η συμπεριφορική δοκιμασία που εκτελέσαμε βασίζεται στην απόκριση θιγμοτακτισμού, δηλαδή την τάση επαφής με κάποιο αντικείμενο λόγω αποφυγής έκθεσης σε ανοικτό πεδίο, η οποία αποτελεί έναν αναγνωρισμένο από την επιστημονική κοινότητα δείκτη άγχους στο zebrafish. Παράλληλα, χρησιμοποιήσαμε το αντικαταθλιπτικό φάρμακο ρολιπράμη που έχει διαπιστωθεί πως επάγει τη συγκεκριμένη συμπεριφορά σε αυτό το ζωικό μοντέλο, μέσω του RAS-MAPK σηματοδοτικού μονοπατιού. Εξηγώντας, η ρολιπράμη αναστέλλει με υψηλή εξειδίκευση την φωσφοδιεστεράση 4 (phosphodiesterase 4, PDE4). Το συγκεκριμένο ένζυμο καταλύει την υδρόλυση του κυκλικού νουκλεοτιδίου cAMP το οποίο έχει χαρακτηριστεί ως κρίσιμο μόριο για τον έλεγχο της διάθεσης (Maurice et al., 2014). Μέσω πειραμάτων ανοσοστυπώματος κατά Western και ανοσοκατακρήμνισης από την ερευνητική ομάδα της Lundegaard εντοπίστηκε πως η χορήγηση ρολιπράμης συνοδεύεται από μία άνοδο των επιπέδων GTP-RAS (ενεργή μορφή) και των φωσφορυλιωμένων κινασών ERK, αποδεικνύοντας πως ο μηχανισμός με τον οποίο η τροποποίηση της PDE4 και η αύξηση του cAMP προωθούν συμπεριφορά που προσομοιάζει με άγχος εμπλέκει την ενεργοποίηση της σηματοδότησης RAS-MAPK (Lundegaard et al., 2015) (Εικόνα 5.3).



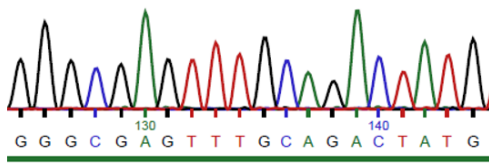
Εικόνα 5.3: Το αντικαταθλιπτικό φάρμακο ρολιπράμη προκαλεί συμπεριφορά που προσομοιάζει με άγχος σε έμβρυα και ενήλικα zebrafish, δρώντας ως αναστολέας της PDE4. Η τροποποίηση των επιπέδων cAMP λόγω της αδρανοποίησης της φωσφοδιεστεράσης από τη ρολιπράμη έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή αγχώδους συμπεριφοράς μέσω του μονοπατιού RAS-MAPK. Ανατύπωση (Lundegaard et al., 2015).

Στο πλαίσιο της δικής μας μελέτης, κατά τη δοκιμασία θιγμοτακτισμού εφαρμόσαμε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ρολιπράμης και καταγράψαμε την τάση επαφής *3-mst^{-/-}* και αγρίου τύπου εμβρύων με τα πλευρικά τοιχώματα του πεδίου στη μία ώρα και στις τέσσερις ώρες μετά τη χορήγηση του φαρμάκου. Αναλύοντας τα αποτελέσματα της παραπάνω πειραματικής διαδικασίας παρατηρήσαμε πως μετά από μία ώρα επώασης σε ρολιπράμη, τα μεταλλαγμένα έμβρυα εμφανίζουν μία σημαντική αύξηση στην απόκριση θιγμοτακτισμού σε σχέση με τα έμβρυα αγρίου τύπου τόσο στην περίπτωση της χορήγησης φαρμάκου όσο και στη συνθήκη ελέγχου. Συνεπώς μπορούμε να υποστηρίξουμε πως η απώλεια του ενζύμου 3-MST οδηγεί στην πρόκληση ενδογενούς αγχώδους συμπεριφοράς στο zebrafish η οποία εκδηλώνεται εντονότερα στην περίπτωση έκθεσης σε ουσίες επαγωγής άγχους και συμπεραίνουμε πως τα αποτελέσματά μας έρχονται σε συμφωνία με τον φαινότυπο των *3-MST*-knockout ποντικιών. Η τάση αυτή δείχνει να διατηρείται στις 4hpt χωρίς να υποστηρίζεται από στατιστική σημαντικότητα, ειδικότερα στην υψηλότερη συγκέντρωση ρολιπράμης. Πιθανότατα οι διαφορές εξομαλύνονται διότι στις

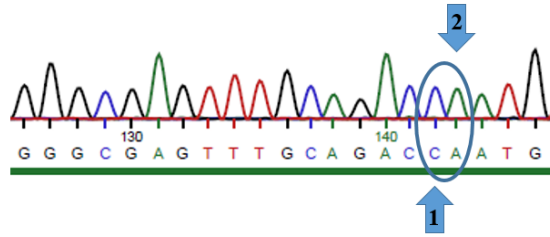
δεδομένες συνθήκες τα ποσοστά θιγμοτακτισμού δε μπορούν να υπερβούν ορισμένες τιμές, φθάνοντας σε ένα πλατό. Επίσης, όπως προτάθηκε και στην περίπτωση μελέτης της απόκρισης στο οξειδωτικό στρες, θα μπορούσε να ελεγχθεί εάν η εξωγενής χορήγηση υδρόθειου αποτελεί τρόπο διάσωσης του παθολογικού φαινοτύπου των ομόζυγων για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο εμβρύων και στη συνέχεια εάν αυτή επεμβαίνει στην παραγωγή του δεύτερου μηνύματος cAMP ή στο σηματοδοτικό μονοπάτι RAS/MAPK.

Με βάση όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, μεταλλαγμένα έμβρυα αλλά και ενήλικα zebrafish θα μπορούσαν να υποβληθούν σε επιπρόσθετες συμπεριφορικές μελέτες όπως τη δοκιμασία μεταφοράς σε νέο δοχείο (novel tank diving test) ή τον σκοτοτακτισμό (scototaxis) (Maximino et al., 2010) για επιβεβαίωση της συμπεριφορικής διαταραχής και του αυξημένου άγχους που εντοπίσαμε πως τα χαρακτηρίζει, προκειμένου να τα καταστήσουν μοντέλα μελέτης της ασθένειας mercaptolactate-cysteine disulfiduria. Επίσης, εφόσον ανιχνεύσαμε παθολογικό φαινότυπο που σχετίζεται με ευαισθησία στο οξειδωτικό στρες, γίνεται αντιληπτό πως τα zebrafish με τη στοχευμένη αυτή μετάλλαξη στο ορθόλογο γονίδιο του 3-MST έχουν την προοπτική να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για τη διερεύνηση των φυσιολογικών ρόλων του 3-MST και των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους αυτό δρα, με πιθανή αντιστοίχιση αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό. Κλείνοντας, σε μία επόμενη προσέγγιση της μελέτης της επίδρασης της έλλειψης του ενζύμου 3-MST θα είχε ενδιαφέρον η επικύρωση των αποτελεσμάτων και η *in vivo* διερεύνηση των μηχανισμών λειτουργίας εις βάθος αξιοποιώντας (1) μια δεύτερη μεταλλαγμένη σειρά zebrafish που έχει προκύψει με στοχευμένη μεταλλαξιγένεση του ορθόλογου γονιδίου του 3-MST μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 (Εικόνα 5.4) (2) επιλεκτικούς αναστολείς για αυτό το ένζυμο παραγωγής H₂S που ανακαλύφθηκαν και χαρακτηρίστηκαν πρόσφατα (Hanaoka et al., 2017).

A



B



Εικόνα 5.4: Χρωματογραφήματα από ανάλυση της αλληλουχίας δειγμάτων DNA που προήλθαν από ουρές ενήλικων ατόμων zebrafish αγρίου τύπου και της δεύτερης μεταλλαγμένης σειράς 3MST. Α. Απεικόνιση της ανάλυσης αλληλουχίας DNA από άτομο αγρίου τύπου. Β. Απεικόνιση της ανάλυσης αλληλουχίας DNA από άτομο με το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο σε ομόζυγη κατάσταση. Μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 έχουν προκληθεί δύο διαφορετικές μεταλλάξεις (1. Προσθήκη ενός νουκλεοτιδίου με βάση κυτοσίνη, 2. Αντικατάσταση μιας θυμίνης από αδενίνη) στην περιοχή του πρώτου εξωνίου του γονιδίου, κοντά στο κωδικόνιο έναρξης, που οδηγούν σε πρώιμο κωδικόνιο λήξης.

5.2 *In vitro* μελέτη της επίδρασης της T₃ στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση H9c2 καρδιακών μυοβλαστών

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, διερευνήσαμε επιπρόσθετα τον ρόλο της θυρεοειδούς ορμόνης T₃ στην πολλαπλασιαστική ικανότητα και την κυτταρική διαφοροποίηση χρησιμοποιώντας καρδιακούς μυοβλάστες της σειράς H9c2. Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε με την 24ωρη χορήγηση της ορμόνης σε κύτταρα της σειράς αυτής τα οποία είχαν υποστεί στέρωση ορού για ορισμένο χρονικό διάστημα, και την τεχνική της ανοσοκυτταροχημείας για την ανίχνευση του προστιθέμενου δείκτη πολλαπλασιασμού BrdU και του μεταγραφικού παράγοντα μυϊκής ανάπτυξης MEF2c. Έγινε επιπρόσθετη πυρηνική σήμανση με DAPI με τη χρήση του κατάλληλου μέσου εγκλεισμού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παραπάνω πειραματική διαδικασία υποδεικνύουν πως η χορήγηση της T₃ δρα επαγωγικά στην πολλαπλασιαστική ικανότητα των H9c2 καρδιακών μυοβλαστών καθώς εντοπίσαμε στατιστικά σημαντική αύξηση της κυτταρικής διαίρεσης στην περίπτωση επώασης με ορμόνη σε ποσοστό κατά μέσο όρο 48,3 %, σε σχέση με τη συνθήκη ελέγχου. Παράλληλα, η T₃ δε δείχνει να εμπλέκεται στη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης αφού δεν παρατηρήσαμε μεταβολή στα μορφολογικά κυτταρικά χαρακτηριστικά και στο πρότυπο σήμανσης του MEF2c.

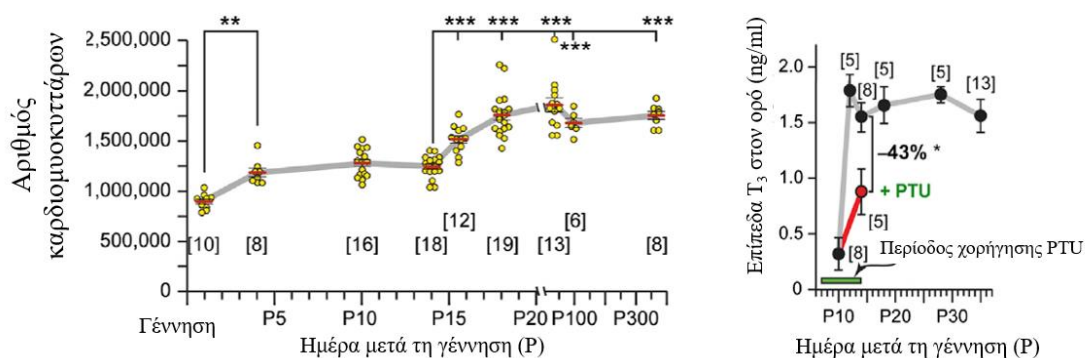
Τα δεδομένα σχετικά με την επιρροή των θυρεοειδικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων βρίσκονται διάσπαρτα σε ποικίλες δημοσιεύσεις και δεν έχουν διευκρινιστεί οι επαγόμενοι από τις θυρεοειδικές ορμόνες μηχανισμοί, ειδικότερα στην περίπτωση της ενίσχυσης της κυτταρικής διαίρεσης. Τα αποτελέσματα διαφορετικών μελετών για τη δράση της T₃ στις συγκεκριμένες κυτταρικές διαδικασίες είναι αντίθετα, καθιστώντας το ζήτημα αυτό αμφιλεγόμενο μέχρι σήμερα.

Στη μελέτη της Ledda-Columbano και των συνεργατών της διαπιστώνεται πως η T₃ σχετίζεται με την είσοδο καρδιομυοκυττάρων εκ νέου στον κυτταρικό κύκλο. Συγκεκριμένα, η χορήγηση της ορμόνης σε ενήλικους αρουραίους προκάλεσε μια αύξηση της κυκλίνης D1 σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης. Η κυκλίνη D1 αποτελεί

καθοριστικό ρυθμιστικό στοιχείο στον μηχανισμό ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης του ρετινοβλαστώματος (Rb) από το σύμπλοκο της κυκλίνης D1 και της κυκλινο-εξαρτώμενης κινάσης CDK4 έχει ως αποτέλεσμα την αποδέσμευση της μεταγραφικής ενεργότητας των μεταγραφικών παραγόντων της οικογένειας E2F και την προώθηση της μετάβασης του κυτταρικού κύκλου από την G₁ στην S φάση. Οι αλλαγές στη μεταγραφή και τη μετάφραση του γονιδίου της κυκλίνης D1 στα ώριμα καρδιομυοκύτταρα αρουραίου συνοδεύονται από σύνθεση DNA και αύξηση στη μιτωτική ενεργότητα (Ledda-Columbano et al., 2006).

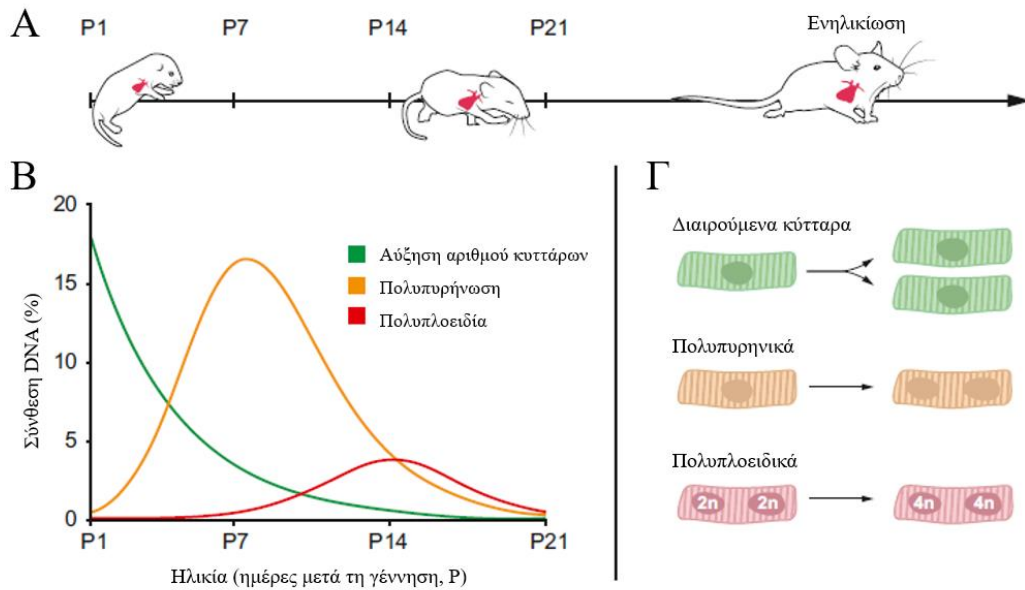
Μια πιο πρόσφατη μελέτη που υποστηρίζει τη συμβολή της T₃ στον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων είναι αυτή του Naqvi και των συνεργατών του. Είναι ευρέως αποδεκτό πως στο ποντίκι κατά τη πρώιμη νεογνική ηλικία τα καρδιομυοκύτταρα διαθέτουν ένα αναγεννητικό δυναμικό το οποίο χάνεται κατά την έβδομη ημέρα μετά τη γέννηση (postnatal day 7, P7) καθώς αυτά εισέρχονται σε ένα μη αντιστρεπτό, τελικό στάδιο διαφοροποίησης. Ωστόσο, η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα διαπίστωσε την ύπαρξη μιας δεύτερης, σύντομης περιόδου αύξησης του πληθυσμού των καρδιομυοκυττάρων μέσω πολλαπλασιασμού κατά την P15 (Εικόνα 5.5A) που συντονίζεται από την άνοδο των επιπέδων της T₃. Προκειμένου να διερευνηθεί η εμπλοκή της T₃ στην καρδιακή ανάπτυξη στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, προκλήθηκε αναστολή της βιοσύνθεσης της μέσω χορήγησης της ένωσης προπυλ-θιουρακίλη (propylthiouracil, PTU). Η επίδραση αυτή σε ποντίκια ηλικίας 7 ημερών είχε ως αποτέλεσμα στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων της ορμόνης στον ορό σε ποσοστό 43% στο στάδιο P14 (Εικόνα 5.5B) και αξιόλογη ελάττωση του βάρους της καρδιάς σε σχέση με το βάρος του σώματος. Επίσης, η παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της T₃ ανέστειλε πλήρως τη δεύτερη αναπτυξιακή αύξηση στον πληθυσμό των καρδιομυοκυττάρων ενώ η έκθεση απομονωμένων καρδιομυοκυττάρων από ποντίκια ηλικίας 14 ημερών σε T₃ (70nM) για 7 ημέρες οδήγησε σε ενίσχυση της σύνθεσης DNA. Επιπρόσθετα πειράματα απέδειξαν τη σύνδεση της δράσης της T₃ με τον αυξητικό παράγοντα τύπου ινσουλίνης (Insulin-like growth factor 1, IGF1), η οποία ενισχύει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των καρδιομυοκυττάρων μέσω ενεργοποίησης του σηματοδοτικού μονοπατιού IGF1-R/PI3K/Akt. Από τα παραπάνω ευρήματα γίνεται αντιληπτό πως η T₃ σχετίζεται θετικά με την αύξηση του μεγέθους της καρδιάς και την καρδιακή υπερπλασία κατά τη δεύτερη εβδομάδα ανάπτυξης των

ποντικίων μετά τη γέννηση επάγοντας εξαρτώμενο από τον IGF πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων (Naqvi et al., 2014).



Εικόνα 5.5: Η θυρεοειδική ορμόνη T₃ πυροδοτεί μια αύξηση της πολλαπλασιαστικής ικανότητας στο ποντίκι κατά τη 15^η ημέρα μετά τη γέννηση. Α. Απεικονίζεται ο συνολικός αριθμός καρδιομυοκυττάρων και στις δύο κοιλίες της καρδιάς ποντικίων διαφορετικής νεογνικής ηλικίας. Ανιχνεύονται δύο διακριτές περιόδους αύξησης του πληθυσμού των καρδιομυοκυττάρων, μια άνοδος κατά 40% μεταξύ των σταδίων P1 και P4 και μία προσθήκη ~500.000 καρδιομυοκυττάρων κατά τη 14^{ης} και τη 18^{ης} ημέρα μετά τη γέννηση. Β. Τα επίπεδα της T₃ στον ορό αυξάνονται αξιοσημείωτα μεταξύ των σταδίων P10 και P12 και παραμένουν σταθερά τις υπόλοιπες ημέρες. Η αύξηση αυτή καταργείται με την προσθήκη PTU (κόκκινη κουκίδα και πράσινη μπάρα στο διάγραμμα). Ο αριθμός των ποντικίων που μελετήθηκαν σε κάθε χρονική περίοδο αναφέρεται σε αγκύλες. Ανατύπωση (Naqvi et al., 2014).

Αντίθετα, σε μία δεύτερη μελέτη η ερευνήτρια Alkass και οι συνεργάτες της παρατήρησαν πως ο πολλαπλασιασμός των καρδιομυοκυττάρων είναι περιορισμένος στο ποντίκι κατά την πρώτη εβδομάδα μετά τη γέννηση, αποδίδοντας την καρδιακή ανάπτυξη σε μηχανισμό υπερτροφίας. Συγκεκριμένα, υποστήριζαν πως η σταδιακή απώλεια της πολλαπλασιαστικής ικανότητας των καρδιομυοκυττάρων οδηγεί σε περιορισμό του κυτταρικού κύκλου όπου το φαινόμενο της κυτοκίνησης αντικαθίσταται αρχικά από πολυπυρήνωση και στη συνέχεια από πολυπλοειδία (Εικόνα 5.6). Όσον αφορά τη δράση της T₃, δεδομένου του σημαντικού ρόλου της σηματοδότησης του IGF-1 στη καρδιακή ανάπτυξη και υπερτροφία (Carrasco et al., 2014; Delaughter et al., 1999), η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα πρότεινε πως η επαγόμενη από την T₃ ενεργοποίηση του μονοπατιού IGF1/IGF1-R/Akt πιθανότατα πυροδοτεί την υπερτροφική αύξηση των καρδιομυοκυττάρων παρά τον πολλαπλασιασμό κατά την νεογνική ηλικία στο ποντίκι (Alkass et al., 2015).



Εικόνα 5.6: Διαγραμματική απεικόνιση της σύνθεσης DNA των καρδιομυοκυττάρων στην αναπτυσσόμενη καρδιά του ποντικού. Ο πολλαπλασιασμός των καρδιομυοκυττάρων είναι περιορισμένος κατά τις πρώτες ημέρες μετά τη γέννηση και ακολουθείται από μία φάση πολυπυρήνωσης η οποία είναι μέγιστη κοντά στο στάδιο P7. Η δημιουργία πολυπλοειδικών καρδιομυοκυττάρων αποτελεί την τελευταία περίοδο της σύνθεσης DNA, φθάνοντας σε μέγιστο τη 14^η ημέρα μετά τη γέννηση. Ανατύπωση (Alkass et al., 2015).

Σε μια επιπρόσθετη, ενδιαφέρουσα μελέτη της επιστημονικής ομάδας της Yang διαπιστώθηκε πως η εβδομαδιαία επίδραση με T₃ (20ng/ml) προωθεί την ωρίμανση ανθρώπινων καρδιομυοκυττάρων που προέρχονται από επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (Human cardiomyocytes-derived from induced pluripotent stem cells, hiPSC-CMs). Η χορήγηση της ορμόνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων και την τροποποίηση της μορφολογίας τους καθώς απέκτησαν πιο επίμηκες σχήμα. Η υπερτροφική αυτή ανάπτυξη θεωρήθηκε φυσιολογική καθώς χαρακτηρίζεται από ενισχυμένη μιτοχondριακή δραστηριότητα και βελτίωση της παραγωγής δύναμης συστολής, συνοδευόμενη από μία αύξηση στο ρυθμό απελευθέρωσης και επαναπόσληψης ασβεστίου. Επίσης παρατηρήθηκε μειωμένο δυναμικό πολλαπλασιασμού το οποίο εξακριβώθηκε από τη μείωση στη σύνθεση DNA και την αυξημένη έκφραση του αναστολέα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21 (Yang et al., 2014).

Τα δεδομένα από την έρευνα των Yang και συν. για τη συμβολή της T_3 στην προώθηση εμφάνισης δομικών και λειτουργικών χαρακτηριστικών διαφοροποίησης ενισχύουν αποτελέσματα παλαιότερων μελετών σε καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από απομονωμένα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα ποντικού (Lee et al., 2010) και σε εμβρυικά καρδιομυοκύτταρα προβάτου *in vivo*. Ειδικότερα στην τελευταία περίπτωση, συμπεραίνεται πως η T_3 αποτελεί καθοριστικό παράγοντα ωρίμανσης των CMs του εμβρύου και μειώνει σημαντικά την αναγεννητική ικανότητα στον πληθυσμό καρδιομυοκυττάρων σε μία χρονική περίοδο λίγο πριν την γέννηση. Ωστόσο, η δραματική ελάττωση των επιπέδων της θυρεοειδικής ορμόνης συντελεί στην πρόκληση ανωμαλιών τόσο στη διαφοροποίηση των καρδιομυοκυττάρων όσο και στην καρδιακή ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό (Chattergoon et al., 2012). Αντίθετα, σε *in vitro* έρευνες εμβρυονικών καρδιομυοκυττάρων όρνιθας η T_3 δεν έδειξε να επηρεάζει την διαδικασία διαφοροποίησης ή την ικανότητα πολλαπλασιασμού (Svensson Holm et al., 2014).

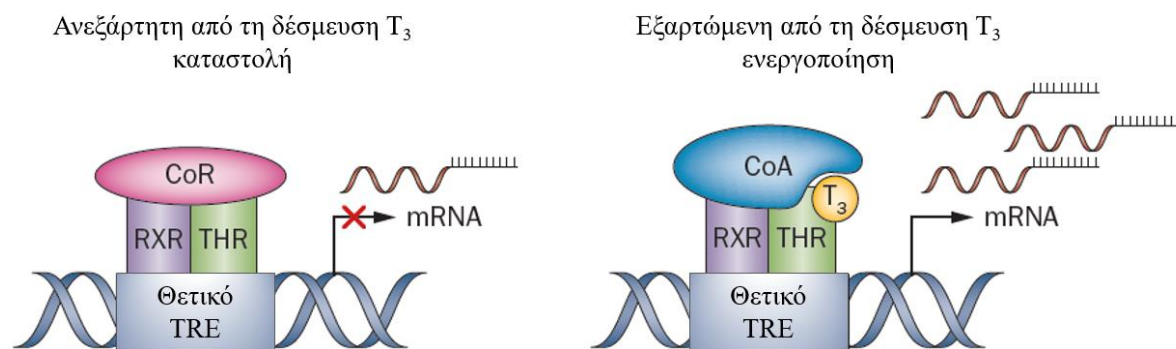
Συμπερασματικά, τα διαθέσιμα στοιχεία αποδεικνύουν πως η λειτουργία των θυρεοειδικών ορμονών στον πολλαπλασιασμό και την ωρίμανση των καρδιομυοκυττάρων δεν είναι ομοιογενής και εξαρτάται από τον οργανισμό που μελετάται, το αναπτυξιακό στάδιο (εμβρυική ή διαφοροποιημένη κατάσταση) και τη πειραματική προσέγγιση (*in vitro* ή *in vivo*) (Puzianowska-Kuznicka et al., 2006). Παράλληλα, καθοριστικής σημασίας κρίνονται τα εργαλεία και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση και την ταυτοποίηση των καρδιομυοκυττάρων, την ποσοτικοποίηση αυτών και τον προσδιορισμό της ενεργότητας του κυτταρικού κύκλου (Hirai et al., 2016).

Προκειμένου να γίνει περισσότερο κατανοητός ο τρόπος ενίσχυσης της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των καρδιομυοκυττάρων από την T_3 , θα αναφερθούν στη συνέχεια ορισμένοι μηχανισμοί σηματοδότησης και οι βασικές αρχές δράσης αυτής της θυρεοειδικής ορμόνης σε μοριακό επίπεδο.

Όσον αφορά τις γονιδιωματικές δράσεις, η ενεργός θυρεοειδική ορμόνη T_3 εισέρχεται στα κύτταρα – στόχους μέσω διαμεμβρανικών μεταφορέων και δεσμεύεται σε πυρηνικούς υποδοχείς θυρεοειδικών ορμονών $THR\alpha$ και $THR\beta$. Αυτοί οι υποδοχείς κωδικοποιούνται από δύο γονίδια, $THRA$ και $THRB$ αντίστοιχα και το εναλλακτικό μάτισμα και η χρήση διαφορετικών υποκινητών οδηγεί στην παραγωγή ποικιλίας

ισομορφών (THR α 1, α 2, α 3 και THR β 1, β 2, β 3) (Puzianowska-Kuznicka et al., 2006). Κάθε ισομορφή THR έχει μια διακριτή επικράτεια η οποία προωθεί τη δημιουργία διμερών και επηρεάζει τη δέσμευση των υποδοχέων στα αποκρινόμενα στις θυρεοειδείς ορμόνες στοιχεία (TRE) που τοποθετούνται στην περιοχή υποκινητή διαφόρων γονιδίων. Παραδείγματος χάριν, η ισομορφή THR α 1 η οποία εκφράζεται κυρίως στο μυοκάρδιο, τείνει να σχηματίζει ετεροδιμερή με υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος X (Retinoid acid X receptors, RXRs) (Ortiga-Carvalho et al., 2014).

Οι THRs μπορούν να δεσμευτούν στο DNA παρουσία αλλά και απουσία της T₃. Το ετεροδιμερές THR/RXR συνδέεται σε «θετικά ρυθμιζόμενα από την T₃» TRE απουσία θυρεοειδούς ορμόνης, στρατολογώντας συν-καταστολείς (co-repressor, CoR) που σταθεροποιούν τη δομή της χρωματίνης και καθιστούν την περιοχή μη προσιτή στο σύμπλοκο μεταγραφής. Ωστόσο, η δέσμευση της T₃ στον THR προκαλεί αλλαγές στη στερεοδιαμόρφωση που επιτρέπουν την απομάκρυνση των συν-καταστολέων, την προσέλκυση συν-ενεργοποιητών (co-activator, CoA) και κατ' επέκταση την ενεργοποίηση της μεταγραφής των γονιδίων – στόχων (Εικόνα 5.7) (Moore and Guy, 2005). Επίσης υπάρχουν γονίδια που περιέχουν «αρνητικά ρυθμιζόμενα» TRE, τα οποία ενεργοποιούνται απουσία θυρεοειδούς ορμόνης ενώ η δέσμευση του συμπλόκου THR-T₃ αναστέλλει την έκφραση τους (Nygård et al., 2003).



Εικόνα 5.7: Μοντέλο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης από τους υποδοχείς THRs και τη θυρεοειδική ορμόνη T₃. Ανατύπωση (Ortiga-Carvalho et al., 2014)

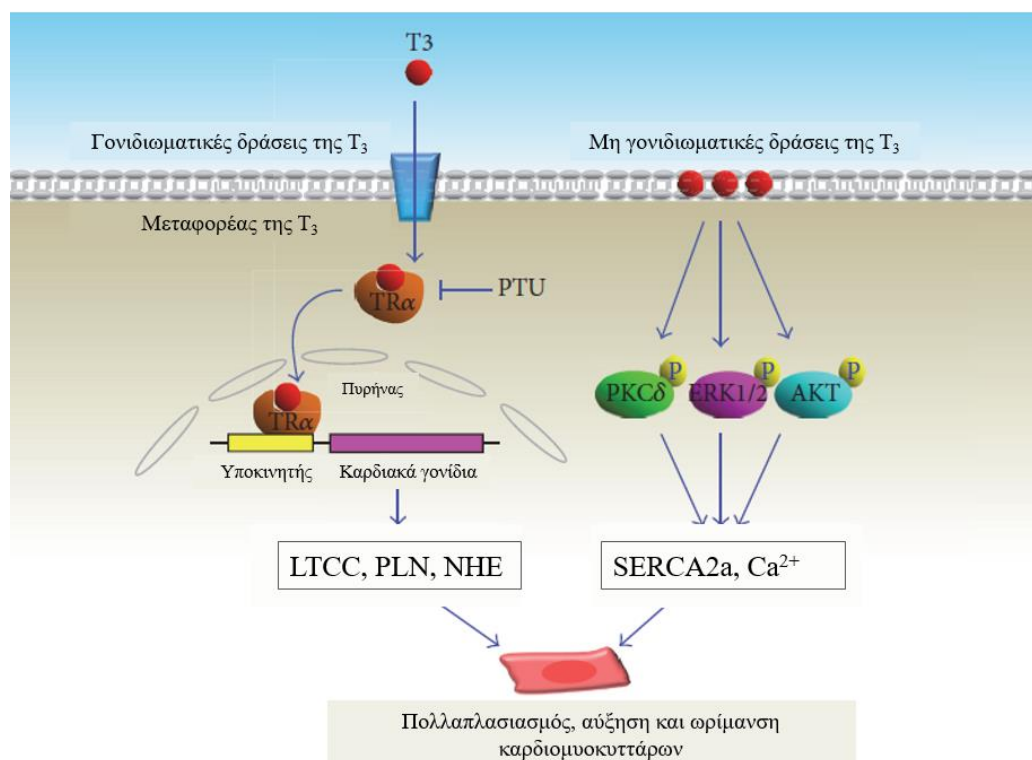
Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό πως η βιολογική επίδραση της T₃ σε έναν δεδομένο ιστό εξαρτάται από μία ποικιλία παραγόντων: την ποσότητα της ενεργούς ορμόνης, τα επίπεδα των διαφορετικών ισομορφών THR, τον τύπο των μορίων ετεροδιμερισμού – RXRs, την αλληλεπίδραση με διαφορετικούς συν-καταστολείς και συν-ενεργοποιητές,

τη δομή των TREs των υποκινητών των γονιδίων – στόχων κοκ (Cheng, 2000; Sadow et al., 2003; Szanto et al., 2004).

Ο ρόλος του υποδοχέα THRα1 στη διαφοροποίηση του μυοκαρδίου έχει μελετηθεί σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2. Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε με τη πρόκληση στέρησης ορού σε κύτταρα της συγκεκριμένης σειράς τα οποία στη συνέχεια αναπτύχθηκαν απουσία ή παρουσία του εξειδικευμένου αναστολέα του THRα1 αποβουτυλ-δρονεδρόνη (debutyl-dronedarone, DbD). Η πρωτεϊνική έκφραση του υποδοχέα βρέθηκε αυξημένη σε κύτταρα που είχαν υποστεί στέρηση για 3 ημέρες σε σύγκριση με μη διαφοροποιημένους μυοβλάστες όπου είχαν επωαστεί αποκλειστικά με ορό, ενώ το DbD δεν έδειξε να επηρεάζει την απόκριση αυτή. Μορφολογικά, πριν τη στέρηση ορού, οι μονοπύρρηνοι μυοβλάστες έχουν στρογγυλό, επίπεδο σχήμα όμως μετά από τριήμερη επώαση απουσία ορού τα κύτταρα επιμηκύνονται και συχνά συντήκονται για να σχηματίσουν πολυπυρηνικά συγκύτια, διατεταγμένα σε γραμμική, παράλληλη σειρά. Η χορήγηση του DbD ανέστειλε τη διαδικασία αυτή καθώς τα κύτταρα εμφάνιζαν ένα φαινότυπο παρόμοιο με αυτόν των μυοβλαστών ενώ είχαν αναπτυχθεί για 3 ημέρες με ελεύθερο από ορό θρεπτικό υλικό (Pantos et al., 2008). Συνεπώς, ο THRα1 φαίνεται πως είναι κρίσιμος για τη διαδικασία της κυτταρικής διαφοροποίησης και η αλληλεπίδραση με την προστιθέμενη T₃ θα μπορούσε να οδηγήσει σε στρατολόγηση διαφορετικών παραγόντων και ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση συγκεκριμένων γονιδιακών στοιχείων αναστρέφοντας την ωρίμανση και ενισχύοντας την ικανότητα πολλαπλασιασμού σε κύτταρα της σειράς H9c2.

Μέσω των γονιδιωματικών αποκρίσεων στα καρδιομυοκύτταρα και της ενεργοποίησης του THRα από την T₃ έχει διαπιστωθεί πως ρυθμίζεται η έκφραση διαφόρων γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων αυτών που κωδικοποιούν τα LTCC, τους φορείς NHE και την φωσφολαμπάνη (phospholamban, PLN). Οι δράσεις της θυρεοειδικής ορμόνης T₃ που δε συντονίζονται από τους πυρηνικούς THRs ονομάζονται μη γονιδιωματικές, συμβαίνουν με ταχύτερο ρυθμό και το σήμα μπορεί να ξεκινά από την πλασματική μεμβράνη, το κυτταρόπλασμα ή ακόμα και από υποδοχείς εντοπισμένους στα μιτοχόνδρια. Οι επιδράσεις αυτές έχουν επιβεβαιωθεί στα καρδιομυοκύτταρα αφού έχει παρατηρηθεί μετά από την προσθήκη T₃ ταχεία αύξηση φωσφορυλίωσης διαφορετικών κινασών, όπως της πρωτεϊνικής κινάσης C δ (protein kinase C delta, PKCδ), των ERK1/2 και της Akt, η οποία σχετίζεται με τη ρύθμιση της ATPάσης SERCA2a και των ενδοκυτταρικών επιπέδων Ca²⁺. Ο

συνδυασμός των παραπάνω επιδράσεων και η εμπλοκή διαφορετικών ρυθμιστικών παραγόντων προκαλούν δομικές και λειτουργικές αλλαγές στα καρδιομυοκύτταρα, οδηγώντας στην καρδιακή αύξηση, τον πολλαπλασιασμό ή την ωρίμανση (Εικόνα 5.8) (Cai et al., 2016; Yang et al., 2014).

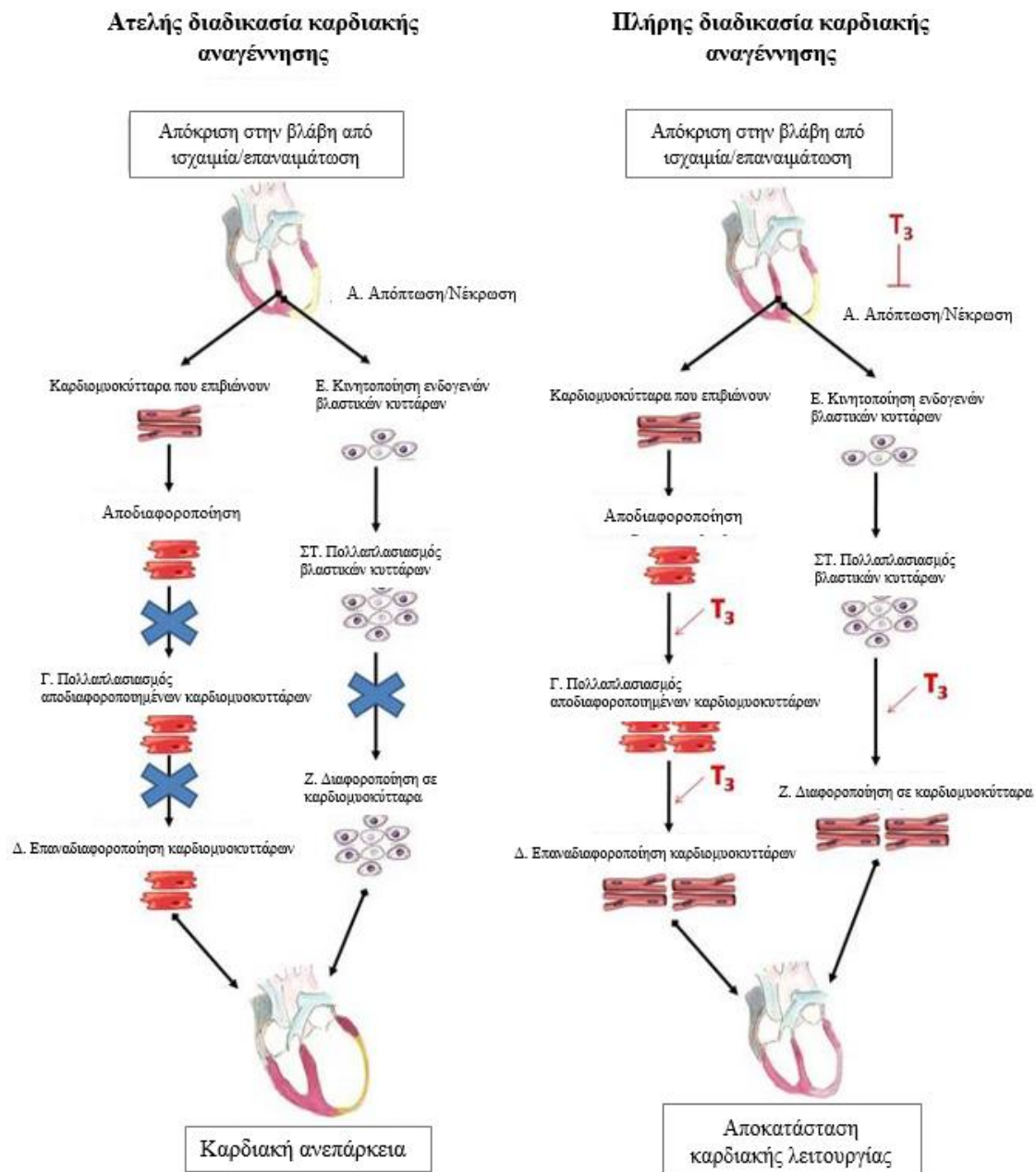


Εικόνα 5.8: Η T_3 επάγει τον πολλαπλασιασμό, την αύξηση και την ωρίμανση των καρδιομυοκυττάρων μέσω γονιδιωματικών και μη γονιδιωματικών επιδράσεων. Ανατύπωση (Cai et al., 2016).

Συνοψίζοντας, η ενίσχυση του πολλαπλασιασμού σε καρδιακούς μυοβλάστες H9c2 μετά από εξωγενή χορήγηση T_3 πιθανότατα σχετίζεται με την επαγωγή ή αδρανοποίηση της γονιδιακής έκφρασης μέσω του $THR\alpha 1$. Παραδείγματος χάριν, η δέσμευση της θυρεοειδικής ορμόνης στη συγκεκριμένη ισομορφή THR μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση της μεταγραφής και της μετάφρασης της κυκλίνης D1 και την αναστολή του καταστολέα κυκλινο-εξαρτώμενων κινασών p21. Ωστόσο, για την εξακρίβωση των παραπάνω υποθέσεων κρίνεται απαραίτητη η μελέτη του ζητήματος εις βάθος μέσω της διεξαγωγής επιπρόσθετων πειραματικών διαδικασιών όπως ποσοτική real-time PCR για ανίχνευση πιθανών τροποποιήσεων στο προφίλ γονιδιακής έκφρασης ή Northern blot, ανοσοσύτρωμα κατά Western κοκ.

Η εξακρίβωση των μονοπατιών σηματοδότησης και των μοριακών μηχανισμών δράσης της T_3 στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση καρδιομυοκυττάρων

διαφορετικού γενετικού υποβάθρου και αναπτυξιακού σταδίου μπορεί να ενισχύσει τη χρησιμότητα και την κλινική εφαρμογή των θυρεοειδικών ορμονών στον άνθρωπο, παρέχοντας μία ευκαιρία διαχείρισης ή ακόμη και θεραπείας της καρδιακής ανεπάρκειας μέσω της επαγωγής της αναγέννησης του μυοκαρδίου (Εικόνα 5.9).



Εικόνα 5.9: Η T₃ συμβάλλει στην καρδιακή αναγέννηση μετά από την ισχαιμία/επαναιμάτωση περιορίζοντας τη νέκρωση-απόπτωση και προωθώντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση προϋπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων. Επίσης, μπορεί να επάγει τη διαφοροποίηση βλαστικών κυττάρων σε λειτουργικά καρδιομυοκύτταρα. Ανατύπωση (http://en.pharmacology.med.uoa.gr/fileadmin/pharmacology.med.uoa.gr/uploads/Image1_en.jpg)

6. Βιβλιογραφία

- Alkass, K., Panula, J., Westman, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., and Bergmann, O. (2015). No Evidence for Cardiomyocyte Number Expansion in Preadolescent Mice. *Cell* 163, 1026–1036.
- Ampola, M.G., Efron, M.L., Bixby, E.M., and Meshorer, E. (1969). Mental Deficiency and a New Aminoaciduria. *Am. J. Dis. Child.* 117, 66–70.
- Anlezark, G.M., Melton, R.G., Sherwood, R.F., Coles, B., Friedlos, F., and Knox, R.J. (1992). The bioactivation of 5-(aziridin-1-yl)-2,4-dinitrobenzamide (CB1954)--I. Purification and properties of a nitroreductase enzyme from *Escherichia coli*--a potential enzyme for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Biochem. Pharmacol.* 44, 2289–2295.
- Arai, M., Alpert, N.R., MacLennan, D.H., Barton, P., and Periasamy, M. (1993). Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ. Res.* 72, 463–469.
- Armstrong, E.J., and Bischoff, J. (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ. Res.* 95, 459–470.
- Artuso, L., Romano, A., Verri, T., Domenichini, A., Argenton, F., Santorelli, F.M., and Petruzzella, V. (2012). Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 1002–1011.
- Auer, T.O., and Del Bene, F. (2014). CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods San Diego Calif* 69, 142–150.
- Azzolin, L., Basso, E., Argenton, F., and Bernardi, P. (2010). Mitochondrial Ca²⁺ transport and permeability transition in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 1775–1779.
- Babenko, A.P., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1998). A view of sur/KIR6.X, KATP channels. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 667–687.
- Baker, K., Warren, K.S., Yellen, G., and Fishman, M.C. (1997). Defective “pacemaker” current (I_h) in a zebrafish mutant with a slow heart rate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4554–4559.
- Bakkers, J. (2011). Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* 91, 279–288.
- Barbazuk, W.B., Korf, I., Kadavi, C., Heyen, J., Tate, S., Wun, E., Bedell, J.A., McPherson, J.D., and Johnson, S.L. (2000). The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res.* 10, 1351–1358.
- Beis, D., and Stainier, D.Y.R. (2006). In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends Cell Biol.* 16, 105–112.

- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabé-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, J., Alkass, K., Buchholz, B.A., Druid, H., Jovigne, S. and Frisé, J. (2009). Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 324, 98–102.
- Blackburn, P.R., Campbell, J.M., Clark, K.J., and Ekker, S.C. (2013). The CRISPR system--keeping zebrafish gene targeting fresh. *Zebrafish* 10, 116–118.
- Blanco-Ayala, T., Andérica-Romero, A.C., and Pedraza-Chaverri, J. (2014). New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic. Res.* 48, 623–640.
- Bortolotto, J.W., Cognato, G.P., Christoff, R.R., Roesler, L.N., Leite, C.E., Kist, L.W., Bogo, M.R., Vianna, M.R., and Bonan, C.D. (2014). Long-term exposure to paraquat alters behavioral parameters and dopamine levels in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish* 11, 142–153.
- Bournele, D., and Beis, D. (2016). Zebrafish models of cardiovascular disease. *Heart Fail. Rev.* 21, 803–813.
- Bretau, S., Lee, S., and Guo, S. (2004). Sensitivity of zebrafish to environmental toxins implicated in Parkinson's disease. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 857–864.
- Brooks, A.I., Chadwick, C.A., Gelbard, H.A., Cory-Slechta, D.A., and Federoff, H.J. (1999). Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. *Brain Res.* 823, 1–10.
- Brown, D., Samsa, L., Qian, L., and Liu, J. (2016). Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3, 13.
- Bucci, M., Papapetropoulos, A., Vellecco, V., Zhou, Z., Pyriochou, A., Roussos, C., Roviezzo, F., Brancaleone, V., and Cirino, G. (2010). Hydrogen sulfide is an endogenous inhibitor of phosphodiesterase activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1998–2004.
- Buja, L.M. (2005). Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol. Off. J. Soc. Cardiovasc. Pathol.* 14, 170–175.
- Cahill, T.J., Choudhury, R.P., and Riley, P.R. (2017). Heart regeneration and repair after myocardial infarction: translational opportunities for novel therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*
- Cai, W.-F., Liu, G.-S., Wang, L., Paul, C., Wen, Z.-L., and Wang, Y. (2016). Repair Injured Heart by Regulating Cardiac Regenerative Signals. *Stem Cells Int.* 2016, 6193419.
- Calvert, J.W., Jha, S., Gundewar, S., Elrod, J.W., Ramachandran, A., Pattillo, C.B., Kevil, C.G., and Lefer, D.J. (2009). Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. *Circ. Res.* 105, 365–374.
- Calvert, J.W., Coetzee, W.A., and Lefer, D.J. (2010). Novel insights into hydrogen sulfide-mediated cytoprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1203–1217.
- Carrasco, L., Cea, P., Rocco, P., Peña-Oyarzún, D., Rivera-Mejias, P., Sotomayor-Flores, C., Quiroga, C., Criollo, A., Ibarra, C., Chiong, M. and Lavandero, S. (2014). Role of

Heterotrimeric G Protein and Calcium in Cardiomyocyte Hypertrophy Induced by IGF-1. *J. Cell. Biochem.* *115*, 712–720.

- Cesselli, D., Jakoniuk, I., Barlucchi, L., Beltrami, A.P., Hintze, T.H., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ. Res.* *89*, 279–286.
- Chablais, F., Veit, J., Rainer, G., and Jaźwińska, A. (2011). The zebrafish heart regenerates after cryoinjury-induced myocardial infarction. *BMC Dev. Biol.* *11*, 21.
- Chan, P.K., Lin, C.C., and Cheng, S.H. (2009). Noninvasive technique for measurement of heartbeat regularity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *BMC Biotechnol.* *9*, 11.
- Chassot, B., Pury, D., and Jaźwińska, A. (2016). Zebrafish fin regeneration after cryoinjury-induced tissue damage. *Biol. Open* *5*, 819–828.
- Chattergoon, N.N., Giraud, G.D., Louey, S., Stork, P., Fowden, A.L., and Thornburg, K.L. (2012). Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 397–408.
- Cheng, S.Y. (2000). Multiple mechanisms for regulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *1*, 9–18.
- Cheng, S.-Y., Leonard, J.L., and Davis, P.J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* *31*, 139–170.
- Coons, A.H., Creech, H.J., and Jones, R.N. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp. Biol. Med.* *47*, 200–202.
- Crawhall, J.C., Parker, R., Sneddon, W., Young, E.P., Ampola, M.G., Efron, M.L., and Bixby, E.M. (1968). Beta mercaptolactate-cysteine disulfide: analog of cystine in the urine of a mentally retarded patient. *Science* *160*, 419–420.
- Cuevas, J., Bassett, A.L., Cameron, J.S., Furukawa, T., Myerburg, R.J., and Kimura, S. (1991). Effect of H⁺ on ATP-regulated K⁺ channels in feline ventricular myocytes. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *261*, H755–H761.
- Curado, S., Anderson, R.M., Jungblut, B., Mumm, J., Schroeter, E., and Stainier, D.Y.R. (2007). Conditional targeted cell ablation in zebrafish: A new tool for regeneration studies. *Dev. Dyn.* *236*, 1025–1035.
- Curado, S., Stainier, D.Y.R., and Anderson, R.M. (2008). Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies. *Nat. Protoc.* *3*, 948–954.
- Davies, K.J. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* *61*, 1–31.
- Delaughter, M.C., Taffet, G.E., Fiorotto, M.L., Entman, M.L., and Schwartz, R.J. (1999). Local insulin-like growth factor I expression induces physiologic, then pathologic, cardiac

- hypertrophy in transgenic mice. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1923–1929.
- Delov, V., Muth-Köhne, E., Schäfers, C., and Fenske, M. (2014). Transgenic fluorescent zebrafish Tg(fli1:EGFP)y1 for the identification of vasotoxicity within the zFET. *Aquat. Toxicol.* *150*, 189–200.
- Dorsky, R.I., Raible, D.W., and Moon, R.T. (2000). Direct regulation of nacre, a zebrafish MITF homolog required for pigment cell formation, by the Wnt pathway. *Genes Dev.* *14*, 158–162.
- Eaton, R.C., and Farley, R.D. (1974). Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory. *Copeia 1974*, 195–204.
- Edwards, D.I. (1993). Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J. Antimicrob. Chemother.* *31*, 9–20.
- Elks, P.M., Renshaw, S.A., Meijer, A.H., Walmsley, S.R., and van Eeden, F.J. (2015). Exploring the HIFs, buts and maybes of hypoxia signalling in disease: lessons from zebrafish models. *Dis. Model. Mech.* *8*, 1349–1360.
- Elrod, J.W., Calvert, J.W., Morrison, J., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., Kimura, H., Chow, C.W. and Lefer, D.J. (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 15560–15565.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, D., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield and C.J., Ratcliffe, P.J. (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* *107*, 43–54.
- Esaki, M., Hoshijima, K., Kobayashi, S., Fukuda, H., Kawakami, K., and Hirose, S. (2007). Visualization in zebrafish larvae of Na(+) uptake in mitochondria-rich cells whose differentiation is dependent on foxi3a. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *292*, 470-480.
- Ewen, E.P., Snyder, C.M., Wilson, M., Desjardins, D., and Naya, F.J. (2011). The Mef2A Transcription Factor Coordinately Regulates a Costamere Gene Program in Cardiac Muscle. *J. Biol. Chem.* *286*, 29644–29653.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* *408*, 239–247.
- Flannigan, K.L., Agbor, T.A., Motta, J.-P., Ferraz, J.G.P., Wang, R., Buret, A.G., and Wallace, J.L. (2015). Proresolution effects of hydrogen sulfide during colitis are mediated through hypoxia-inducible factor-1. *FASEB J.* *29*, 1591–1602.
- Flinn, L., Mortiboys, H., Volkmann, K., Köster, R.W., Ingham, P.W., and Bandmann, O. (2009). Complex I deficiency and dopaminergic neuronal cell loss in parkin-deficient zebrafish (*Danio rerio*). *Brain J. Neurol.* *132*, 1613–1623.

- Frangogiannis, N.G. (2006). The Mechanistic Basis of Infarct Healing. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1907–1939.
- Gadalla, M.M., and Snyder, S.H. (2010). Hydrogen sulfide as a gasotransmitter. *J. Neurochem.* 113, 14–26.
- Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Inverte, J., Rodriguez-Sinovas, A., and Piper, H.M. (2012). Calcium-mediated cell death during myocardial reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 94, 168–180.
- Gemberling, M., Bailey, T.J., Hyde, D.R., and Poss, K.D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet.* TIG 29, 611–620.
- Geng, B., Yang, J., Qi, Y., Zhao, J., Pang, Y., Du, J., and Tang, C. (2004). H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313, 362–368.
- Geng, B., Cui, Y., Zhao, J., Yu, F., Zhu, Y., Xu, G., Zhang, Z., Tang, C., and Du, J. (2007). Hydrogen sulfide downregulates the aortic L-arginine/nitric oxide pathway in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1608-1618.
- Gereben, B., Zavacki, A.M., Ribich, S., Kim, B.W., Huang, S.A., Simonides, W.S., Zeöld, A., and Bianco, A.C. (2008). Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr. Rev.* 29, 898–938.
- Gerlai, R. (2003). Zebra Fish: An Uncharted Behavior Genetic Model. *Behav. Genet.* 33, 461–468.
- Goolish, E.M., and Okutake, K. (1999). Lack of gas bladder inflation by the larvae of zebrafish in the absence of an air-water interface. *J. Fish Biol.* 55, 1054–1063.
- Griffiths, G., Burke, B., and Lucocq, J. (1993). *Fine Structure Immunocytochemistry* (Berlin ; New York: Springer-Verlag).
- Guo, S. (2004). Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? *Genes Brain Behav.* 3, 63–74.
- Gut, P., Reischauer, S., Stainier, D.Y.R., and Arnaout, R. (2017). LITTLE FISH, BIG DATA: ZEBRAFISH AS A MODEL FOR CARDIOVASCULAR AND METABOLIC DISEASE. *Physiol. Rev.* 97, 889–938.
- Haigis, M.C., and Yankner, B.A. (2010). The aging stress response. *Mol. Cell* 40, 333–344.
- Halpern, M.E., Rhee, J., Goll, M.G., Akitake, C.M., Parsons, M., and Leach, S.D. (2008). Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish* 5, 97–110.
- Hanaoka, K., Sasakura, K., Suwanai, Y., Toma-Fukai, S., Shimamoto, K., Takano, Y., Shibuya, N., Terai, T., Komatsu, T., Ueno, T., Ogasawara, Y., Watanabe, Y., Kimura, H., Wang, C., Uchiyama, M., Kojima, H., Okabe, T., Urano, Y., Shimizu, T. and Nagano, T. (2017). Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H₂S-producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-site Cysteine Persulfide. *Sci. Rep.* 7, srep40227.

- Hannestad, U., Mårtensson, J., Sjö Dahl, R., and Sörbo, B. (1981). 3-Mercaptolactate cysteine disulfiduria: Biochemical studies on affected and unaffected members of a family. *Biochem. Med.* 26, 106–114.
- Hara, A., Niwa, M., Aoki, H., Kumada, M., Kunisada, T., Oyama, T., Yamamoto, T., Kozawa, O., and Mori, H. (2006). A new model of retinal photoreceptor cell degeneration induced by a chemical hypoxia-mimicking agent, cobalt chloride. *Brain Res.* 1109, 192–200.
- Harrison, R.G. (1910). The outgrowth of the nerve fiber as a model of protoplasmatic movement. *J.Exp.Zool* 9, 787-846
- He, H., Giordano, F.J., Hilal-Dandan, R., Choi, D.J., Rockman, H.A., McDonough, P.M., Bluhm, W.F., Meyer, M., Sayen, M.R., Swanson, E. and Dillmann, W.H. (1997). Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J. Clin. Invest.* 100, 380–389.
- Hirai, M., Cattaneo, P., Chen, J., and Evans, S.M. (2016). Revisiting Preadolescent Cardiomyocyte Proliferation in Mice. *Circ. Res.* 118, 916–919.
- Hu, L.-F., Li, Y., Neo, K.L., Yong, Q.C., Lee, S.W., Tan, B.K.H., and Bian, J.-S. (2011). Hydrogen Sulfide Regulates Na⁺/H⁺ Exchanger Activity via Stimulation of Phosphoinositide 3-Kinase/Akt and Protein Kinase G Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 339, 726–735.
- Hu, N., Yost, H.J., and Clark, E.B. (2001). Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *Anat. Rec.* 264, 1–12.
- Huang, C.-J., Tu, C.-T., Hsiao, C.-D., Hsieh, F.-J., and Tsai, H.-J. (2003). Germ-line transmission of a myocardium-specific GFP transgene reveals critical regulatory elements in the cardiac myosin light chain 2 promoter of zebrafish. *Dev. Dyn.* 228, 30–40.
- Huang, J., Wang, D., Zheng, J., Huang, X., and Jin, H. (2012). Hydrogen sulfide attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced by abdominal aortic coarctation in rats. *Mol. Med. Rep.* 5, 923–928.
- Hughes, M.N., Centelles, M.N., and Moore, K.P. (2009). Making and working with hydrogen sulfide. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1346–1353.
- Iervasi, G., Pingitore, A., Landi, P., Raciti, M., Ripoli, A., Scarlattini, M., L'Abbate, A., and Donato, L. (2003). Low-T3 Syndrome: A Strong Prognostic Predictor of Death in Patients With Heart Disease. *Circulation* 107, 708–713.
- Jabbar, A., Pingitore, A., Pearce, S.H.S., Zaman, A., Iervasi, G., and Razvi, S. (2016). Thyroid hormones and cardiovascular disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 39–55.
- Jain, S.K., Huning, L., and Micinski, D. (2014). Hydrogen Sulfide Upregulates Glutamate–Cysteine Ligase Catalytic Subunit, Glutamate–Cysteine Ligase Modifier Subunit, and Glutathione and Inhibits Interleukin-1 β Secretion in Monocytes Exposed to High Glucose Levels. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* 12, 299–302.

- Jimenez-Del-Rio, M., Guzman-Martinez, C., and Velez-Pardo, C. (2010). The effects of polyphenols on survival and locomotor activity in *Drosophila melanogaster* exposed to iron and paraquat. *Neurochem. Res.* 35, 227–238.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606–609.
- Joshi, M., and Deshpande, J.D. (2010). Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int. J. Biomed. Res.* 2, 81–97.
- Kaasik, A., Paju, K., Vetter, R., and Seppet, E.K. (1997). Thyroid hormones increase the contractility but suppress the effects of β -adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc. Res.* 35, 106–112.
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2010). Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *J. Biol. Chem.* 285, 21903–21907.
- Kamat, P., Kalani, A., Tyagi, S., and Tyagi, N. (2014). Hydrogen sulfide promotes mitochondrial biogenesis through PPAR γ activation in intra-cerebral administration of homocysteine (1126.18). *FASEB J.* 28, 1126.18.
- Karra, R., Knecht, A.K., Kikuchi, K., and Poss, K.D. (2015). Myocardial NF- κ B activation is essential for zebrafish heart regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13255–13260.
- Katsouda, A., Bibli, S.-I., Pyriochou, A., Szabo, C., and Papapetropoulos, A. (2016). Regulation and role of endogenously produced hydrogen sulfide in angiogenesis. *Pharmacol. Res.* 113, 175–185.
- Kaufman, C.K., White, R.M., and Zon, L. (2009). Chemical genetic screening in the zebrafish embryo. *Nat. Protoc.* 4, 1422–1432.
- Kikuchi, K., Holdway, J.E., Major, R.J., Blum, N., Dahn, R.D., Begemann, G., and Poss, K.D. (2011). Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Dev. Cell* 20, 397–404.
- Kim, J., Wu, Q., Zhang, Y., Wiens, K.M., Huang, Y., Rubin, N., Shimada, H., Handin, R.I., Chao, M.Y., Tuan, T.-L., Starnes and V.A., Lien, C.-L. (2010). PDGF signaling is required for epicardial function and blood vessel formation in regenerating zebrafish hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 17206–17210.
- Kimes, B.W., and Brandt, B.L. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp. Cell Res.* 98, 367–381.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253–310.
- Kimura, H. (2011). Hydrogen sulfide: its production, release and functions. *Amino Acids* 41, 113–121.

- Kimura, H. (2013). Physiological role of hydrogen sulfide and polysulfide in the central nervous system. *Neurochem. Int.* *63*, 492–497.
- Kimura, H. (2014a). The physiological role of hydrogen sulfide and beyond. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *41*, 4–10.
- Kimura, H. (2014b). Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 783–793.
- Kimura, Y., Goto, Y.-I., and Kimura, H. (2010). Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. *Antioxid. Redox Signal.* *12*, 1–13.
- Klein, I., and Danzi, S. (2007). Thyroid disease and the heart. *Circulation* *116*, 1725–1735.
- Kolluru, G.K., Bir, S.C., Yuan, S., Shen, X., Pardue, S., Wang, R., and Kevil, C.G. (2015). Cystathionine γ -lyase regulates arteriogenesis through NO-dependent monocyte recruitment. *Cardiovasc. Res.* *107*, 590–600.
- Konishi, T., Takeyasu, A., Natsume, T., Furusawa, Y., and Hieda, K. (2011). Visualization of Heavy Ion Tracks by Labeling 3'-OH Termini of Induced DNA Strand Breaks. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* *52*, 433–440.
- Laale, H.W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *J. Fish Biol.* *10*, 121–173.
- Laggner, H., Muellner, M.K., Schreier, S., Sturm, B., Hermann, M., Exner, M., Geimner and B.M.K., Kapiotis, S. (2007). Hydrogen sulphide: A novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCl. *Free Radic. Res.* *41*, 741–747.
- Lam, S.H., Wu, Y.L., Vega, V.B., Miller, L.D., Spitsbergen, J., Tong, Y., Zhan, H., Govindarajan, K.R., Lee, S., Mathavan, S., Murthy, K.R.K., Buhler, D.R., Liu, E.T. and Gong, Z. (2006). Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. *Nat. Biotechnol.* *24*, 73–75.
- LaManna, J.C., Chavez, J.C., and Pichiule, P. (2004). Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J. Exp. Biol.* *207*, 3163–3169.
- Lanni, A., Moreno, M., and Goglia, F. (2016). Mitochondrial Actions of Thyroid Hormone. *Compr. Physiol.* *6*, 1591–1607.
- Larson, E.T., O'Malley, D.M., and Melloni, R.H. (2006). Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish. *Behav. Brain Res.* *167*, 94–102.
- Ledda-Columbano, G.M., Molotzu, F., Pibiri, M., Cossu, C., Perra, A., and Columbano, A. (2006). Thyroid hormone induces cyclin D1 nuclear translocation and DNA synthesis in adult rat cardiomyocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *20*, 87–94.
- Lee, K.W., Webb, S.E., and Miller, A.L. (1999). A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation. *Dev. Biol.* *214*, 168–180.

- Lee, S.W., Cheng, Y., Moore, P.K., and Bian, J.-S. (2007). Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 1142–1147.
- Lee, Y.-K., Ng, K.-M., Chan, Y.-C., Lai, W.-H., Au, K.-W., Ho, C.-Y.J., Wong, L.-Y., Lau, C.-P., Tse, H.-F., and Siu, C.-W. (2010). Triiodothyronine promotes cardiac differentiation and maturation of embryonic stem cells via the classical genomic pathway. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 1728–1736.
- Lehner, B., Sandner, B., Marschallinger, J., Lehner, C., Furtner, T., Couillard-Despres, S., Rivera, F.J., Brockhoff, G., Bauer, H.-C., Weidner, N. and Aigner, L. (2011). The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival. *Cell Tissue Res.* 345, 313–328.
- Lepilina, A., Coon, A.N., Kikuchi, K., Holdway, J.E., Roberts, R.W., Burns, C.G., and Poss, K.D. (2006). A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 127, 607–619.
- Lewandoski, M. (2001). Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* 2, 743–755.
- Lewerenz, J., Hewett, S.J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P.W., Kalivas, P.W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., Smith, S.B., Ganapathy, V. and Maher, P. (2012). The Cystine/Glutamate Antiporter System xc⁻ in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Novel Therapeutic Opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 522–555.
- Li, L., and Moore, P.K. (2008). Putative biological roles of hydrogen sulfide in health and disease: a breath of not so fresh air? *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 84–90.
- Li, L., Yan, B., Shi, Y.-Q., Zhang, W.-Q., and Wen, Z.-L. (2012). Live Imaging Reveals Differing Roles of Macrophages and Neutrophils during Zebrafish Tail Fin Regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 25353–25360.
- Lin, L.Y., Horng, J.L., Kunkel, J.G. and Hwang, P.-P. (2006). Proton pump-rich cell secretes acid in skin of zebrafish larvae. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, 371–378.
- Litteljohn, D., Mangano, E., Shukla, N., and Hayley, S. (2009). Interferon- γ deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. *Neuroscience* 164, 1894–1906.
- Liu, F., Walmsley, M., Rodaway, A., and Patient, R. (2008). Fli1 Acts at the Top of the Transcriptional Network Driving Blood and Endothelial Development. *Curr. Biol.* 18, 1234–1240.
- Liu, H., Bai, X.-B., Shi, S., and Cao, Y.-X. (2009). Hydrogen sulfide protects from intestinal ischaemia-reperfusion injury in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 207–212.
- Liu, J., Zhou, Y., Qi, X., Chen, J., Chen, W., Qiu, G., Wu, Z., and Wu, N. (2017). CRISPR/Cas9 in zebrafish: an efficient combination for human genetic diseases modeling. *Hum. Genet.* 136, 1–12.

- Liu, X., Pan, L., Zhuo, Y., Gong, Q., Rose, P., and Zhu, Y. (2010). Hypoxia-inducible factor-1 α is involved in the pro-angiogenic effect of hydrogen sulfide under hypoxic stress. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 1550–1554.
- Liu, X.H., Kirschenbaum, A., Yao, S., Stearns, M.E., Holland, J.F., Claffey, K., and Levine, A.C. (1999). Upregulation of vascular endothelial growth factor by cobalt chloride-simulated hypoxia is mediated by persistent induction of cyclooxygenase-2 in a metastatic human prostate cancer cell line. *Clin. Exp. Metastasis* 17, 687–694.
- Liu, Y.-H., Lu, M., Hu, L.-F., Wong, P.T.-H., Webb, G.D., and Bian, J.-S. (2012). Hydrogen Sulfide in the Mammalian Cardiovascular System. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 141–185.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J. Vis. Exp.* 63, e3998
- Lu, M., Hu, L.-F., Hu, G., and Bian, J.-S. (2008). Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1705–1713.
- Lundegaard, P.R., Anastasaki, C., Grant, N.J., Sillito, R.R., Zich, J., Zeng, Z., Paranthaman, K., Larsen, A.P., Armstrong, J.D., Porteous, D.J. and Patton, E.E. (2015). MEK Inhibitors Reverse cAMP-Mediated Anxiety in Zebrafish. *Chem. Biol.* 22, 1335–1346.
- MacRae, C.A., and Peterson, R.T. (2003). Zebrafish-based small molecule discovery. *Chem. Biol.* 10, 901–908.
- Malekova, L., Krizanova, O., and Ondrias, K. (2009). H₂S and HS(-) donor NaHS inhibits intracellular chloride channels. *Gen. Physiol. Biophys.* 28, 190–194.
- Marín-García, J. (2010). Thyroid hormone and myocardial mitochondrial biogenesis. *Vascul. Pharmacol.* 52, 120–130.
- Marrack J. (1934). Nature of Antibodies. *Nat.* 133, 292-293.
- Martinez, F. (2016). Thyroid hormones and heart failure. *Heart Fail. Rev.* 21, 361–364.
- Mathai, J.C., Missner, A., Kügler, P., Saparov, S.M., Zeidel, M.L., Lee, J.K., and Pohl, P. (2009). No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 16633–16638.
- Maurice, D.H., Ke, H., Ahmad, F., Wang, Y., Chung, J., and Manganiello, V.C. (2014). Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 290–314.
- Maximino, C., de Brito, T.M., da Silva Batista, A.W., Herculano, A.M., Morato, S., and Gouveia, A. (2010). Measuring anxiety in zebrafish: a critical review. *Behav. Brain Res.* 214, 157–171.
- McClure, M. (1999). Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae). *J. Morphol.* 241, 83–105.

- McClure, M.M., McIntyre, P.B., and McCune, A.R. (2006). Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J. Fish Biol.* *69*, 553–570.
- McGuire, S.E., Roman, G., and Davis, R.L. (2004). Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.* *TIG 20*, 384–391.
- Milan, D.J., Peterson, T.A., Ruskin, J.N., Peterson, R.T., and MacRae, C.A. (2003). Drugs that induce repolarization abnormalities cause bradycardia in zebrafish. *Circulation* *107*, 1355–1358.
- Moore, J.M.R., and Guy, R.K. (2005). Coregulator Interactions with the Thyroid Hormone Receptor. *Mol. Cell. Proteomics* *4*, 475–482.
- Moro, E., Ozhan-Kizil, G., Mongera, A., Beis, D., Wierzbicki, C., Young, R.M., Bournele, D., Domenichini, A., Valdivia, L.E., Lum, L., Chen, C., Amatruda, J.F., Tiso, N., Weidinger, G. and Argenton, F. (2012). In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains. *Dev. Biol.* *366*, 327–340.
- Motoike, T., Loughna, S., Perens, E., Roman, B.L., Liao, W., Chau, T.C., Richardson, C.D., Kawate, T., Kuno, J., Weinstein, B.M. Stainier, D.Y. and Sato, T.N. (2000). Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* *28*, 75–81.
- Nagahara, N. (2012). Regulation of Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Activity Via Intrasubunit and Intersubunit Redox-Sensing Switches. *Antioxid. Redox Signal.* *19*, 1792–1802.
- Nagahara, N., and Katayama, A. (2005). Post-translational regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase via a low redox potential cysteine-sulfenate in the maintenance of redox homeostasis. *J. Biol. Chem.* *280*, 34569–34576.
- Nagahara, N., Ito, T., Kitamura, H., and Nishino, T. (1998). Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem. Cell Biol.* *110*, 243–250.
- Nagahara, N., Ito, T., and Minami, M. (1999). Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histol. Histopathol.* *14*, 1277–1286.
- Nagahara, N., Yoshii, T., Abe, Y., and Matsumura, T. (2007). Thioredoxin-dependent Enzymatic Activation of Mercaptopyruvate Sulfurtransferase AN INTERSUBUNIT DISULFIDE BOND SERVES AS A REDOX SWITCH FOR ACTIVATION. *J. Biol. Chem.* *282*, 1561–1569.
- Nagahara, N., Nagano, M., Ito, T., Shimamura, K., Akimoto, T., and Suzuki, H. (2013). Antioxidant enzyme, 3-mercaptopruvate sulfurtransferase-knockout mice exhibit increased anxiety-like behaviors: a model for human mercaptolactate-cysteine disulfiduria. *Sci. Rep.* *3*.
- Naqvi, N., Li, M., Calvert, J.W., Tejada, T., Lambert, J.P., Wu, J., Kesteven, S.H., Holman, S.R., Matsuda, T., Lovelock, J.D., Howard, W.W., Iismaa, S.E., Chan, A.Y., Crawford,

- B.H., Wagner, M.B., Martin, D.I.K., Lefer, D.J., Graham, R.M., Husain, A. (2014). A proliferative burst during preadolescence establishes the final cardiomyocyte number. *Cell* *157*, 795–807.
- Nelson, J.S. (2006). *Fishes of the World* (Hoboken, N.J: Wiley).
- Nicholson, C.K., Lambert, J.P., Molkentin, J.D., Sadoshima, J., and Calvert, J.W. (2013). Thioredoxin 1 is essential for sodium sulfide-mediated cardioprotection in the setting of heart failure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 744–751.
- Ninov, N., Borius, M., and Stainier, D.Y.R. (2012). Different levels of Notch signaling regulate quiescence, renewal and differentiation in pancreatic endocrine progenitors. *Development* *139*, 1557–1567.
- Nordberg, J., and Arnér, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* *31*, 1287–1312.
- Nygård, M., Wahlström, G.M., Gustafsson, M.V., Tokumoto, Y.M., and Bondesson, M. (2003). Hormone-dependent repression of the E2F-1 gene by thyroid hormone receptors. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *17*, 79–92.
- Olas, B. (2015). Hydrogen sulfide in signaling pathways. *Clin. Chim. Acta* *439*, 212–218.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Sidhaye, A.R., and Wondisford, F.E. (2014). Thyroid hormone receptors and resistance to thyroid hormone disorders. *Nat. Rev. Endocrinol.* *10*, 582–591.
- Pantos, C., Malliopoulou, V., Paizis, I., Moraitis, P., Mourouzis, I., Tzeis, S., Karamanoli, E., Cokkinos, D.D., Carageorgiou, H., Varonos, D., and Cokkinos, D.V. (2003). Thyroid hormone and cardioprotection: Study of p38 MAPK and JNKs during ischaemia and at reperfusion in isolated rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* *242*, 173–180.
- Pantos, C., Xinaris, C., Mourouzis, I., Perimenis, P., Politi, E., Spanou, D., and Cokkinos, D.V. (2008). Thyroid hormone receptor alpha 1: a switch to cardiac cell “metamorphosis”? *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* *59*, 253–269.
- Pantos, C., Mourouzis, I., Saranteas, T., Clavé, G., Ligeret, H., Noack-Fraissignes, P., Renard, P.-Y., Massonneau, M., Perimenis, P., Spanou, D., Kostopanagiotou, G. and Cokkinos, D.V. (2009). Thyroid hormone improves postischaemic recovery of function while limiting apoptosis: a new therapeutic approach to support hemodynamics in the setting of ischaemia-reperfusion? *Basic Res. Cardiol.* *104*, 69–77.
- Papapetropoulos, A., Pyriochou, A., Altaany, Z., Yang, G., Marazioti, A., Zhou, Z., Jeschke, M.G., Branski, L.K., Herndon, D.N., Wang, R. and Szabó, C. (2009). Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 21972–21977.
- Paravicini, T.M., and Touyz, R.M. (2006). Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc. Res.* *71*, 247–258.
- Parichy, D.M. (2006). Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity* *97*, 200–210.

- Pisharath, H., Rhee, J.M., Swanson, M.A., Leach, S.D., and Parsons, M.J. (2007). Targeted ablation of beta cells in the embryonic zebrafish pancreas using *E. coli* nitroreductase. *Mech. Dev.* *124*, 218–229.
- Poon, K.L., and Brand, T. (2013). The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* *2013*, 4.
- Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* *298*, 2188–2190.
- Postlethwait, J.H., Yan, Y.L., Gates, M.A., Horne, S., Amores, A., Brownlie, A., Donovan, A., Egan, E.S., Force, A., Gong, Z., Goutel, C., Fritz, A., Kelsh, R., Knapik, E., Liao, E., Paw, B., Ransom, D., Singer, A., Thomson, M., Abduljabbar, T.S., Yelick, P., Beier, D., Joly, J.S., Larhammar, D., Rosa, F., Westerfield, M., Zon, L.I., Johnson, S.L. and Tablot, W.S. (1998). Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map. *Nat. Genet.* *18*, 345–349.
- Puzianowska-Kuznicka, M., Pietrzak, M., Turowska, O., and Nauman, A. (2006). Thyroid hormones and their receptors in the regulation of cell proliferation. *Acta Biochim. Pol.* *53*, 641–650.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* *24*, 981–990.
- Richendrfer, H., Pelkowski, S.D., Colwill, R.M., and Creton, R. (2012). On the edge: Pharmacological evidence for anxiety-related behavior in zebrafish larvae. *Behav. Brain Res.* *228*, 99–106.
- Rodondi, N., den Elzen, W.P.J., Bauer, D.C., Cappola, A.R., Razvi, S., Walsh, J.P., Asvold, B.O., Iervasi, G., Imaizumi, M., Collet, T.-H., Bremner, A., Maisonneuve, P., Sgabri, J.A., Khaw, K.-T., Vanderpump, M.P.J., Newman, A.B., Cornuz, J., Franklyn, J.A., Westendorp, R.G.J., Vittinghoff, E. and Gussekloo, J. (2010). Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA* *304*, 1365–1374.
- Sabri, A., Hughie, H.H., and Lucchesi, P.A. (2003). Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 731–740.
- Sadow, P.M., Chassande, O., Gauthier, K., Samarut, J., Xu, J., O'Malley, B.W., and Weiss, R.E. (2003). Specificity of thyroid hormone receptor subtype and steroid receptor coactivator-1 on thyroid hormone action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E36–46.
- Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 675–687.
- Sawyer, D.B. (2011). Oxidative Stress in Heart Failure: What Are We Missing? *Am. J. Med. Sci.* *342*, 120–124.
- Schieber, M., and Chandel, N.S. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.* *24*, R453–R462.

- Schnabel, K., Wu, C.-C., Kurth, T., and Weidinger, G. (2011). Regeneration of Cryoinjury Induced Necrotic Heart Lesions in Zebrafish Is Associated with Epicardial Activation and Cardiomyocyte Proliferation. *PLOS ONE* 6, e18503.
- Searcy, D.G., and Lee, S.H. (1998). Sulfur reduction by human erythrocytes. *J. Exp. Zool.* 282, 310–322.
- Sehnert, A.J., Huq, A., Weinstein, B.M., Walker, C., Fishman, M., and Stainier, D.Y.R. (2002). Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility. *Nat. Genet.* 31, 106–110.
- Sehring, I.M., Jahn, C., and Weidinger, G. (2016). Zebrafish fin and heart: what's special about regeneration? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 40, 48–56.
- Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.-D., Guerquin-Kern, J.-L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.
- Shams, S., Chatterjee, D., and Gerlai, R. (2015). Chronic social isolation affects thigmotaxis and whole-brain serotonin levels in adult zebrafish. *Behav. Brain Res.* 292, 283–287.
- Shepherd, K.R., Lee, E.-S.Y., Schmued, L., Jiao, Y., Ali, S.F., Oriaku, E.T., Lamango, N.S., Soliman, K.F.A., and Charlton, C.G. (2006). The potentiating effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on paraquat-induced neurochemical and behavioral changes in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 83, 349–359.
- Shibuya, N., Mikami, Y., Kimura, Y., Nagahara, N., and Kimura, H. (2009a). Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *J. Biochem. (Tokyo)* 146, 623–626.
- Shibuya, N., Tanaka, M., Yoshida, M., Ogasawara, Y., Togawa, T., Ishii, K., and Kimura, H. (2009b). 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 703–714.
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., Ogasawara, Y., Fukui, K., Nagahara, N., and Kimura, H. (2013). A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells. *Nat. Commun.* 4, 1366.
- Shukla, V., Mishra, S.K., and Pant, H.C. (2011). *Oxidative Stress in Neurodegeneration*.
- Siwik, D.A., Pagano, P.J., and Colucci, W.S. (2001). Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C53-60.
- Slack, J.M.W. (2012). *Essential Developmental Biology* (Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell).
- Sodha, N.R., Clements, R.T., Feng, J., Liu, Y., Bianchi, C., Horvath, E.M., Szabo, C., and Sellke, F.W. (2008). The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 33, 906–913.

- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., and Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev.* 83, 13–34.
- Stackley, K.D., Beeson, C.C., Rahn, J.J., and Chan, S.S.L. (2011). Bioenergetic profiling of zebrafish embryonic development. *PLoS One* 6, e25652.
- Stainier, D.Y., Lee, R.K., and Fishman, M.C. (1993). Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation. *Dev. Camb. Engl.* 119, 31–40.
- Stainier, D.Y., Weinstein, B.M., Detrich, H.W., Zon, L.I., and Fishman, M.C. (1995). *Cloche*, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Dev. Camb. Engl.* 121, 3141–3150.
- Su, Y.-W., Liang, C., Jin, H.-F., Tang, X.-Y., Han, W., Chai, L.-J., Zhang, C.-Y., Geng, B., Tang, C.-S., and Du, J.-B. (2009). Hydrogen sulfide regulates cardiac function and structure in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 73, 741–749.
- Sun, W.-H., Liu, F., Chen, Y., and Zhu, Y.-C. (2012). Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 421, 164–169.
- Sun, Y.-G., Cao, Y.-X., Wang, W.-W., Ma, S.-F., Yao, T., and Zhu, Y.-C. (2008). Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 79, 632–641.
- Svensson Holm, A.B., Lindgren, I., Österman, H., and Altimiras, J. (2014). Thyroid hormone does not induce maturation of embryonic chicken cardiomyocytes in vitro. *Physiol. Rep.* 2.
- Szanto, A., Narkar, V., Shen, Q., Uray, I.P., Davies, P.J.A., and Nagy, L. (2004). Retinoid X receptors: X-ploring their (patho)physiological functions. *Cell Death Differ.* 11 Suppl 2, S126-143.
- Takano, N., Peng, Y.-J., Kumar, G.K., Luo, W., Hu, H., Shimoda, L.A., Suematsu, M., Prabhakar, N.R., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factors regulate human and rat cystathionine β -synthase gene expression. *Biochem. J.* 458, 203–211.
- Tang, G., Wu, L., Liang, W., and Wang, R. (2005). Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 1757–1764.
- Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279, L1005-1028.
- Trachootham, D., Alexandre, J., and Huang, P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 579–591.

- Tsutsui, H., Kinugawa, S., and Matsushima, S. (2011). Oxidative stress and heart failure. *AJP Heart Circ. Physiol.* *301*, H2181–H2190.
- Untereiner, A.A., Fu, M., Módos, K., Wang, R., Ju, Y., and Wu, L. (2016). Stimulatory effect of CSE-generated H₂S on hepatic mitochondrial biogenesis and the underlying mechanisms. *Nitric Oxide Biol. Chem.* *58*, 67–76.
- Wang, R. (2012). Physiological Implications of Hydrogen Sulfide: A Whiff Exploration That Blossomed. *Physiol. Rev.* *92*, 791–896.
- Wang, Y., Zhao, X., Jin, H., Wei, H., Li, W., Bu, D., Tang, X., Ren, Y., Tang, C., and Du, J. (2009). Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 173–179.
- Westerfield, M. (2000). *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish* (M. Westerfield, Univ. of Oregon Press, Eugene).
- White, R.M., Sessa, A., Burke, C., Bowman, T., LeBlanc, J., Ceol, C., Bourque, C., Dovey, M., Goessling, W., Burns, C.E. and Zon, L.I. (2008). Transparent adult zebrafish as a tool for in vivo transplantation analysis. *Cell Stem Cell* *2*, 183–189.
- Wu, C.-C., Kruse, F., Vasudevarao, M.D., Junker, J.P., Zebrowski, D.C., Fischer, K., Noël, E.S., Grün, D., Berezikov, E., Engel, F.B., van Oudenaarden, A., Weidinger, G. and Bakkers, J. (2016). Spatially Resolved Genome-wide Transcriptional Profiling Identifies BMP Signaling as Essential Regulator of Zebrafish Cardiomyocyte Regeneration. *Dev. Cell* *36*, 36–49.
- Wu, Y.-C., Chang, C.-Y., Kao, A., Hsi, B., Lee, S.-H., Chen, Y.-H., and Wang, I.-J. (2015). Hypoxia-induced retinal neovascularization in zebrafish embryos: a potential model of retinopathy of prematurity. *PloS One* *10*, e0126750.
- Xie, Z.-Z., Liu, Y., and Bian, J.-S. (2016). Hydrogen Sulfide and Cellular Redox Homeostasis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*, 6043038.
- Yang, X., Rodriguez, M., Pabon, L., Fischer, K.A., Reinecke, H., Regnier, M., Sniadecki, N.J., Ruohola-Baker, H., and Murry, C.E. (2014). Tri-iodo-L-thyronine Promotes the Maturation of Human Cardiomyocytes-Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *72*, 296–304.
- Yao, J., and Eghbali, M. (1992). Decreased collagen gene expression and absence of fibrosis in thyroid hormone-induced myocardial hypertrophy. Response of cardiac fibroblasts to thyroid hormone in vitro. *Circ. Res.* *71*, 831–839.
- Yao, L.-L., Huang, X.-W., Wang, Y.-G., Cao, Y.-X., Zhang, C.-C., and Zhu, Y.-C. (2010). Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by preventing GSK-3 β -dependent opening of mPTP. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *298*, H1310-1319.
- Yong, Q.C., Pan, T.-T., Hu, L.-F., and Bian, J.-S. (2008a). Negative regulation of β -adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 701–710.

- Yong, Q.C., Pan, T.-T., Hu, L.-F., and Bian, J.-S. (2008b). Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *44*, 701–710.
- Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, D.E. (2003). Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J. Biol. Chem.* *278*, 15911–15916.
- Zhao, W., Zhang, J., Lu, Y., and Wang, R. (2001). The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J.* *20*, 6008–6016.
- Zhuo, Y., Chen, P.-F., Zhang, A.-Z., Zhong, H., Chen, C.-Q., and Zhu, Y.-Z. (2009). Cardioprotective effect of hydrogen sulfide in ischemic reperfusion experimental rats and its influence on expression of survivin gene. *Biol. Pharm. Bull.* *32*, 1406–1410.
- Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L., and Sollott, S.J. (2000). Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* *192*, 1001–1014.

Αναφορές

<http://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence>

<http://aquagroup.weebly.com/photos--videos.html>

https://faculty.unlv.edu/wmojica/PCR_LAB2.htm

<http://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

<http://www.uoneuro.uoregon.edu/k12/zfk12.html>

<http://zebrafishing.blogspot.gr/>

<http://www.zmsystems.co.uk>

http://en.pharmacology.med.uoa.gr/fileadmin/pharmacology.med.uoa.gr/uploads/Image1_en.jpg

Περίληψη

Το υδρόθειο (H₂S) είναι ένα άχρωμο, εύφλεκτο αέριο και στο παρελθόν ήταν ευρέως γνωστό για την τοξικότητά του. Τα τελευταία χρόνια έχει αναγνωριστεί ο ρόλος του ως ένα σηματοδοτικό μόριο που συντίθεται από τους ζωντανούς οργανισμούς και αποτελεί το τρίτο μέλος της οικογένειας των αέριων διαβιβαστών. Μία από τις κύριες πηγές ενδογενούς ενζυματικής παραγωγής υδρόθειου είναι το μονοπάτι του 3-μερκατοπυροσταφυλικού (3-MP)/ θειομεταφοράση του 3-μερκατοπυροσταφυλικού (3-MST). Το zebrafish είναι ένα ζωικό μοντέλο που προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των θηλαστικών όσον αφορά τη μελέτη της ανάπτυξης των σπονδυλωτών και τη μοντελοποίηση των ανθρώπινων ασθενειών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε μία σειρά zebrafish που έχει υποστεί στοχευμένη μεταλλαξιγένεση στο ορθόλογο γονίδιο του 3-MST μέσω του συστήματος CRISPR/Cas9 και πραγματοποιήσαμε συμπεριφορικές και χημικές δοκιμές με σκοπό τον χαρακτηρισμό παθολογικού φαινοτύπου, καθώς τα ομόζυγα για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο έμβρυα αναπτύσσονται φυσιολογικά. Οι 3-*mst*^{-/-} προνύμφες εμφανίζουν αρρυθμίες, μειωμένο καρδιακό παλμό και αυξημένα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τις αγρίου τύπου προνύμφες κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες που επάγονται με το γνωστό ζιζανιοκτόνο παρακουάτ. Επίσης, παρατηρήσαμε στα μεταλλαγμένα έμβρυα έντονη απόκριση θιγμοτακτισμού και ευαισθησία σε ουσίες οι οποίες επάγουν συμπεριφορά που προσομοιάζει με άγχος. Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν πως η συγκεκριμένη σειρά έχει την προοπτική να αποτελέσει χρήσιμο εργαλείο για τη διερεύνηση των φυσιολογικών ρόλων του 3-MST και των μοριακών μηχανισμών με τους οποίους αυτό δρα, με πιθανή αντιστοίχιση αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό. Παράλληλα, στο πλαίσιο της συγκεκριμένης εργασίας μελετήσαμε τον ρόλο της θυρεοειδικής ορμόνης Τριωδοθυρονίνης (T₃) στον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση καρδιακών μυοβλαστών H9c2. Πειράματα ανοσοκυτταροχημείας αποκάλυψαν πως η T₃ ενισχύει την πολλαπλασιαστική ικανότητα των H9c2 κυττάρων καθώς παρατηρήσαμε αυξημένη κατά 48% σήμανση με BrdU στη συνθήκη χορήγησης ορμόνης σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Απώτερο σκοπό της μελέτης αποτελεί η διευκρίνιση του τρόπου δράσης της T₃ στη φυσιολογία των καρδιομυοκυττάρων, προκειμένου να αποτελέσει ένα νέο θεραπευτικό παράγοντα αντιμετώπισης του εμφράγματος μυοκαρδίου και άλλων καρδιαγγειακών νοσημάτων στον άνθρωπο.

Summary

Hydrogen sulfide (H₂S) is a colorless, flammable gas with the characteristic smell of rotten eggs. H₂S has profound biological effects within living organisms and is now increasingly being considered as the third member of the gasotransmitter family. One major source for endogenous intramitochondrial production of H₂S is the 3-mercaptopyruvate (3-MP) / 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST) pathway. Zebrafish offers several advantages over mammalian model organisms for the study of vertebrate development and pathophysiology. These include: high fecundity, rapid and external development of transparent embryos, genetic tractability and remarkable regenerative capacity during both embryonic and adult stages. In the present study, we use a zebrafish line where we induced via a CRISPR mediated approach, a targeted mutation in the orthologue gene of *3-MST*. *3-mst*^{-/-} embryos appear morphologically normal and we are therefore testing their tolerance under different stress conditions (i.e. chemically induced hypoxia via cobalt chloride or mitochondrial damage via paraquat). Mutant larvae show arrhythmias, a reduced heartbeat and an increased mortality rate when compared to wild type larvae following paraquat treatment. In addition, we observed induced anxiety-like behavior in mutant embryos measured by a thigmotaxis assay both in physiological conditions and when treated with the anxiogenic drug rolipram. Furthermore, we studied the ability for cardiac regeneration of the *3-mst* mutant line in early developmental stages, by inducing non-invasively myocardial cell damage. These approaches will help us generate a 3-MST model that could potentially provide a detailed picture of how this enzyme functions and its role in diseases. An additional aim of this study was to determine whether the thyroid hormone Triiodothyronine (T₃) has a putative role in the proliferation or the differentiation of H9c2 myoblasts. Cell immunofluorescent microscopy showed that T₃ significantly promoted the H9c2 proliferation as we identified a ~48% increase in BrdU staining compared to the control cells. Our final purpose is to uncover the T₃-induced mechanisms in cardiomyocyte physiology in order to provide a therapeutic opportunity for promoting cardiac repair in patients with acute myocardial infarction and other cardiovascular diseases.