



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ  
Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
«ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΗΣ ΣΕΙΡΑΣ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ ΠΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ  
ΕΛΛΑΤΩΜΑΤΙΚΗ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ»

Ντούλιου Ευαγγελία  
Αριθμός Μητρώου: 41606  
Χημικός

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ: ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΕΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ'  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018



## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΜΠΕΗΣ, ΕΡΕΥΝΗΤΗΣ Γ΄  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΤΗΣ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΙΣΙΔΩΡΑ ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ  
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΒΙΟΦΥΣΙΚΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

## **ΤΟΠΟΣ ΔΙΕΞΑΓΩΓΗΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ  
ΙΔΡΥΜΑ ΙΑΤΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΡΕΥΝΩΝ ΑΚΑΔΗΜΙΑΣ ΑΘΗΝΩΝ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2017-2018



*Η παρούσα διπλωματική εργασία είναι αφιερωμένη στους φίλους μου Βασίλη Μουχτούρη και Βασίλη Τριχάκη, δύο ανθρώπους που κάνουν την ζωή μου πιο όμορφη, πιο φωτεινή, πιο χαρούμενη, πιο απλή, πιο ανθρώπινη...*



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους εποπτεύοντες Καθηγητές Δημήτριο Στραβοπόδη και Ισιδώρα Παπαδισέρη για την αμέριστη καθοδήγηση και συμπαράστασή τους. Η ανεκτίμητη υποστήριξη που μου έχουν προσφέρει ως φοιτήτριά τους μπορεί μόνο να συγκριθεί με την αγάπη και το πάθος που μου έχουν εμπνεύσει για την μαγευτική Επιστήμη της Βιολογίας. Χάρης σε αυτούς τα όνειρά μου γίνονται πραγματικότητα.

Ευχαριστώ θερμά τον Ερευνητή Δρ. Δημήτριο Μπέη για την εμπιστοσύνη και την υπομονή που μου έδειξε καθ' όλη την διάρκεια της χρονιάς. Ως μέλος της ομάδας του εξοικειώθηκα με ποικιλία τεχνικών και μεθόδων της σύγχρονης βιολογικής έρευνας, οι οποίες αποτελούν πολύτιμο εφόδιο για οποιονδήποτε νέο επιστήμονα. Οι παρατηρήσεις και οι συμβουλές του έπαιξαν καθοριστικό ρόλο στην διαμόρφωση του τρόπου σκέψης μου και τον εμπλουτισμό της διδακτικής μου εμπειρίας ως φοιτήτρια.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της ερευνητικής ομάδας του Δρ. Δημήτριου Μπέη, για την πολύτιμη βοήθεια και υποστήριξη που μου πρόσφεραν τον τελευταίο χρόνο. Ιδιαίτερος ευχαριστώ θερμά την μεταδιδάκτορα Αδαμαντία Αγάλου για την καθημερινή της επίβλεψη, τον χρόνο που μου αφιέρωσε και τις γνώσεις που μου μετέδωσε.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους και την οικογένειά μου για την υπομονή, την στήριξη, την κατανόηση και την αγάπη τους.





## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας μελετήσαμε μια μεταλλαγμένη σειρά zebrafish, με κωδικό όνομα s274, η οποία παρουσιάζει ελαττωματική καρδιακή ανάπτυξη και ο φαινότυπος κληρονομείται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο.

Αρχικά, μελετήσαμε τα χαρακτηριστικά και τα συμπτώματα του μεταλλαγμένου φαινοτύπου. Διαπιστώσαμε πως, πέρα από τα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου που ήταν ήδη γνωστά και τα οποία είναι παρατηρήσιμα από τις 48 ώρες μετά την γονιμοποίηση, τα μεταλλαγμένα έμβρυα παρουσιάζουν παθολογικό καρδιακό φαινότυπο ήδη από τις 24 ώρες μετά την γονιμοποίηση.

Προχωρήσαμε στην χαρτογράφηση της θέσης της μετάλλαξης στο χρωμόσωμα 12, με απώτερο στόχο την εύρεση του υπεύθυνου γονιδίου. Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική μελέτη σε βάσεις δεδομένων για κάθε μία από τις πιθανές μεταλλάξεις που έχουν ήδη χαρτογραφηθεί κατόπιν σύγκρισης της αλληλουχίας του μεταγραφώματος φυσιολογικών και μεταλλαγμένων εμβρύων της σειράς s274. Σκοπός της μελέτης αυτής ήταν η συλλογή πληροφοριών που θα μας βοηθήσουν να αξιολογήσουμε την πιθανότητα κάθε υποψήφια μετάλλαξη να είναι υπεύθυνη για τον παρατηρούμενο φαινότυπο

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε γονοτυπικό χαρακτηρισμό ενήλικων ατόμων της σειράς s274 (ετεροζυγώτες) και μεταλλαγμένων εμβρύων (ομοζυγώτες) για επτά υποψήφιες μεταλλάξεις σε τέσσερα διαφορετικά γονίδια. Ωστόσο, δεν καταφέραμε να προσδιορίσουμε το υπεύθυνο γονίδιο, καθώς παρατηρήθηκε συμφωνία φαινοτύπου και θεωρητικά αναμενόμενου γονοτύπου για τέσσερεις από τις μεταλλάξεις που μελετήσαμε.



## ABSTRACT

The topic of our study is the zebrafish (*danio rerio*) mutant line *s274*, which was identified in a forward genetic screen. The *s274* mutants are characterized by defective heart development. The phenotype is inherited in an autosomal recessive pattern and results in embryonic lethality.

The principal symptom of the *s274* phenotype is the detachment of the myocardium from the endocardium, which is observable in embryos after the developmental stage of 48 hours post fertilization. However, after thorough examination of the mutant phenotype, we discovered that a form of defective cardiac phenotype can be identified in embryos as young as 24 hours post fertilization.

The main part of our project consists of the mapping of the mutation site in chromosome 12. Using online biological databases, we evaluated the possible mutations which have been previously identified via comparison of mutant and wild-type embryo RNA-sequencing data, in an attempt to identify the mutations most probable to be responsible for the phenotype.

Finally, we proceeded to genotypic analysis of adult carriers of the *s274* mutation (heterozygotes) and mutant embryos (homozygotes), for seven potential mutations. Perfect cosegregation of the phenotype and the expected genotype was observed in four of the mutations that were tested. As a result, we could not identify which mutation is responsible for the phenotype.



## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Γενικές πληροφορίες για το ζωικό μοντέλο zebrafish</b>	<b>15</b>
1.1.1 Ταξινομική	15
1.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση	15
1.1.3 Διατροφή	16
1.1.4 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά	17
<b>1.2 Κύκλος ζωής και Ανάπτυξη</b>	<b>20</b>
1.2.1 Αναπαραγωγή	20
1.2.2 Αναπτυξιακά Στάδια	21
<b>1.3 Καρδιακή Μορφολογία και Ανάπτυξη</b>	<b>24</b>
1.3.1 Μορφολογία της καρδιάς των ενήλικων ατόμων zebrafish	24
1.3.2 Ανάπτυξη της καρδιάς κατά τα εμβρυϊκά στάδια	25
<b>1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα</b>	<b>30</b>
1.4.1. Γενικά	30
1.4.2 Πλεονεκτήματα της χρήσης του zebrafish στην Καρδιαγγειακή Έρευνα	32
1.4.3 Ηθικοί Περιορισμοί	33
<b>1.5 Χρήση του zebrafish στη γενετική ανάλυση</b>	<b>35</b>
1.5.1 Ορθόδρομη Γενετική Ανάλυση (Forward Genetic Screening)	35
1.5.2 Ανάδρομη Γενετική Ανάλυση (Reverse Genetic Screening)	37
1.5.3 Χρήση του zebrafish στον χημικό γενετικό έλεγχο (Chemical Genetic Screening)	39
<b>1.6 Η μεταλλαγμένη σειρά <i>s274</i></b>	<b>41</b>
1.6.1 Γενικά	41
1.6.2 Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου <i>s274</i>	41
1.6.3 Αναζήτηση του υπεύθυνου γονιδίου για τον φαινότυπο <i>s274</i>	45
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>49</b>
<b>3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>50</b>

3.1 Βιολογικό υλικό	50
3.2 Υλικά	51
3.2.1 Διαβίωση του ζωικού μοντέλου zebrafish	51
3.2.2 Χειρισμός των εμβρύων zebrafish	51
3.2.3 Απομόνωση DNA και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	52
3.3 Προγράμματα λογισμικού	54
3.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός–Αναλώσιμα	54
3.5 Μέθοδοι	55
3.5.1 Διαβίωση και διατροφή του πειραματικού μοντέλου zebrafish	55
3.5.2 Διασταυρώσεις και χειρισμός εμβρύων zebrafish	57
3.5.3 Απομόνωση DNA από ουραία πτερύγια ενήλικων ψαριών zebrafish	61
3.5.4 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης	62
3.5.5 Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφόρηση	65
3.5.6 Καθαρισμός προϊόντος PCR	67
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	69
4.1 Καρδιακός φαινότυπος της σειράς <i>s274</i> στις 24 hpf	69
4.2 Βιβλιογραφική μελέτη και αξιολόγηση μεταλλάξεων	72
4.3 Γονοτυπική ανάλυση πιθανών μεταλλάξεων	89
4.3.1 Γενικά	89
4.3.2 Γονίδιο <i>ace</i>	92
4.3.3 Γονίδιο <i>itga3b</i>	96
4.3.4 Γονίδιο <i>kat7b</i>	101
4.3.5 Γονίδιο <i>pcdh15b</i>	105
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	110
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	114

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Γενικές πληροφορίες για το ζωικό μοντέλο zebrafish

#### 1.1.1 Ταξινόμηση

Το zebrafish είναι ένα τροπικό ψάρι του γλυκού νερού, γνωστό με την επιστημονική ονομασία *Danio rerio*. Ανήκει στην κλάση των Ακτινοπτερυγίων, στην τάξη Cypriniformes και στην οικογένεια των Cyprinidae (Nelson, 2006). Υπάγεται στο γένος *Danio* ενώ είναι συγγενικό φυλογενετικά με το γένος *Devario*.

Πίνακας 1.1: Ταξινόμηση του zebrafish

<b>Υπερβασίλειο</b>	Eukaryota
<b>Βασίλειο</b>	Metazoa
<b>Φύλο</b>	Chordota
<b>Υποφύλο</b>	Vertebrata (Craniata)
<b>Ομοταξία</b>	Actinopterygii
<b>Υφομοταξία</b>	Neopterygii (Teleostei)
<b>Υπέρταξη</b>	Ostariophysi
<b>Τάξη</b>	Cypriniformes
<b>Οικογένεια</b>	Cyprinidae
<b>Γένος</b>	<i>Danio</i>
<b>Είδος</b>	<i>Danio rerio</i>

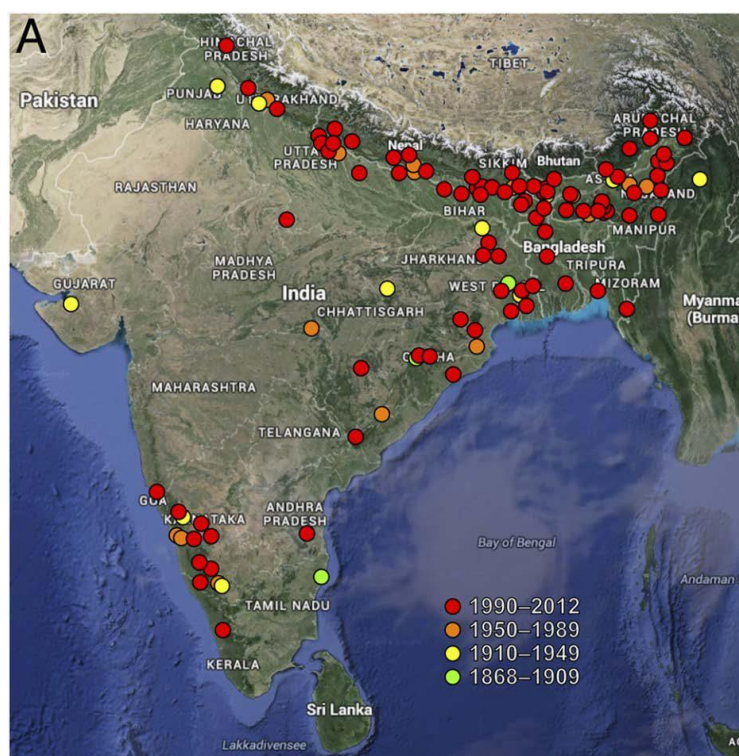
Για πολλά χρόνια μέχρι την ένταξή του στο γένος *Danio*, το zebrafish αναφερόταν στην επιστημονική βιβλιογραφία ως *Brachydanio rerio*.

#### 1.1.2 Γεωγραφική εξάπλωση

Το zebrafish ενδημεί στα 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.

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).

Δεν καθίσταται για βρώση, παρόλα αυτά έχει βρεθεί και σε πολλές περιοχές του κόσμου ως αλλόχθονο είδος, καθώς διαβεί σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών (pH: 6.5-8, θερμοκρασιακό εύρος: 12-39°C, αλατότητα: μεταξύ 0,01-0,8g/kg) (Engeszer et al., 2008; Arunachalam et al., 2013). Ο τόπος που ενδημεί (Νότια-Νοτιοανατολική Ασία και Ινδική χερσόνησος) θεωρείται γενικά το κέντρο της εξέλιξης των κυπρινοειδών, λόγω του μεγάλου αριθμού ειδών και της ποικιλίας που εμφανίζουν (Moyle et al., 2004).



Εικόνα 1.1: Γεωγραφική εξάπλωση του zebrafish (Parichy, 2015)

### 1.1.3 Διατροφή

Τα zebrafish είναι ζώα παμφάγα και τρέφονται με ζωοπλαγκτόν, έντομα, προνύμφες εντόμων, σκώληκες και μικρά καρκινοειδή. Επιπλέον, σε αναλύσεις πεπτικού περιεχομένου, έχουν εντοπιστεί φυτοπλαγκτόν, φύκη με νηματώδη



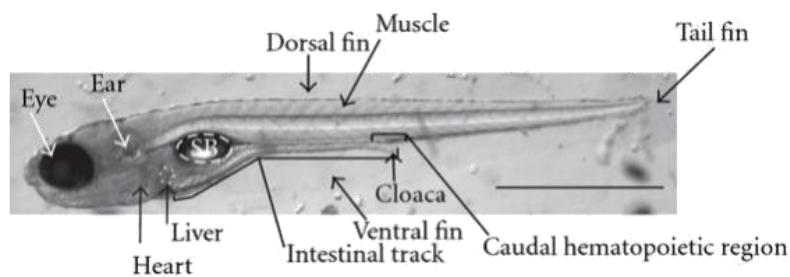
θαλλό, υλικό αγγειωδών φυτών, λέπια ιχθύων, αραχνοειδή και οργανικά θρύμματα (McClure et al., 2006; Spence et al., 2007).

Το Zebrafish μπορεί να λάβει εξωγενώς τροφή από την 5<sup>η</sup> μέρα ζωής μετά την γονιμοποίηση, όπου πρωτοανοίγει το στόμα του. Μέχρι τότε τρέφεται από την λέκιθο. Οι επόμενες 3-4 εβδομάδες ζωής, δηλαδή το στάδιο της προνύμφης, είναι και οι πλέον απαιτητικές σε ενέργεια. Σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, οι τροφές τους έχουν διάμετρο 150–200 μm και πρέπει να έχουν περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες πάνω από 45–60%, 6–10% σε λίπη και λιγότερο από 5% σε υδατάνθρακες. Από το στάδιο αυτό και έπειτα, το zebrafish μπορεί να τραφεί με τροφές διαμέτρου 400–600 μm και με περιεκτικότητα σε λίπη 10–15% (Spence et al., 2008).

#### **1.1.4 Μορφολογικά Χαρακτηριστικά**

Τα άτομα του είδους zebrafish έχουν ατρακτοειδή, πλευρικά πεπιοσμένο κορμό και το στόμα τους έχει φορά προς τα πάνω με την κάτω γνάθο να προεξέχει σε σχέση με την άνω γνάθο. Η κοινή τους ονομασία zebrafish ή αλλιώς ψάρι-ζέβρα, οφείλεται στο γεγονός ότι εμφανίζουν ένα ιδιαίτερο μοτίβο εναλλαγής σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων που εκτείνονται μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου, το οποίο θυμίζει τις ρίγες της ζέβρας. Το εδρικό πτερύγιο έχει επίσης χαρακτηριστικές ρίγες και διακλαδισμένες ακτίνες. Το μοτίβο οφείλεται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα μελανοφόρα (σκούρα μπλε), τα ξανθοφόρα (χρυσά) και τα ιριδοφόρα (ιριδίζοντα) 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 συγκαάλυψη (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).



**Εικόνα 1.2: Ανατομία προνύμφης zebrafish 6 ημερών (Goldsmith et al.,2012).**

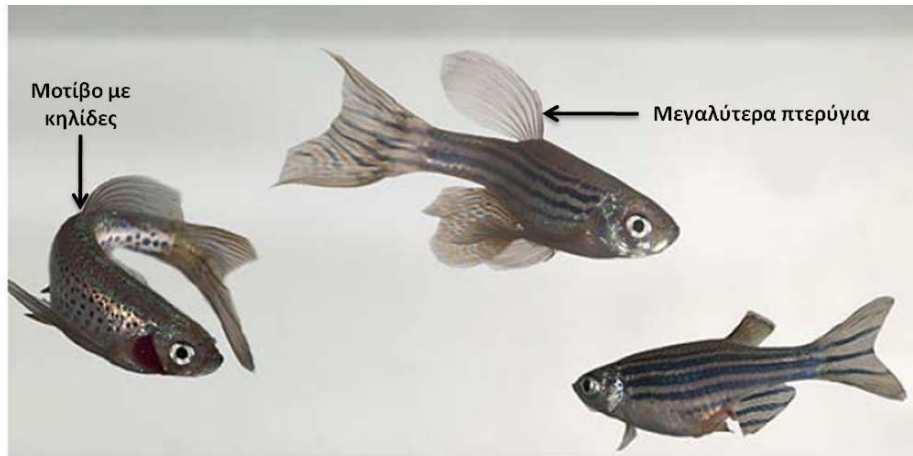
Το μέγεθος των zebrafish μπορεί να φτάσει τα 6,4 cm, ωστόσο σε συνθήκες αιχμαλωσίας, όπως στο εργαστήριο, σπάνια ξεπερνά τα 4 cm. Τα αρσενικά του είδους έχουν σχήμα τορπίλης, με χρυσές-ροζ λωρίδες ανάμεσα στις μπλε και μια σκουρόχρωμη λωρίδα στην κορυφή του ραχιαίου πτερυγίου. Τα θηλυκά χαρακτηρίζονται από μεγάλες υπόλευκες κοιλίες, ασημένιες αντί για χρυσές λωρίδες και κίτρινο ραχιαίο πτερύγιο. Επίσης, τα θηλυκά εμφανίζουν μια μικρή γεννητική θηλή μπροστά από το εδρικό πτερύγιο.



**Εικόνα 1.3: Αρσενικό (πάνω) και θηλυκό (κάτω) άτομο zebrafish**  
 (<https://wiki.med.harvard.edu/SysBio/Megason/CollectingEggs>)

Αξίζει να αναφερθούμε σε δύο διαφορετικές παραλλαγές του είδους, τις οποίες συναντάμε στη φύση και διαφέρουν μόνο ως προς τη μορφολογία. Τα άτομα της πρώτης παραλλαγής διαθέτουν σκουρόχρωμες κηλίδες κατά μήκος του κορμού τους. Αυτές αντικαθιστούν τις ρίγες του κλασικού μοτίβου και για αυτόν τον λόγο παραλλαγή αυτή ονομάζεται leopard. Τα άτομα της δεύτερης παραλλαγής φέρουν

τον κλασικό χρωματισμό που περιγράφηκε προηγουμένως, όμως, διαθέτουν πιο μακριά και πλατιά πτερύγια και ουρά.



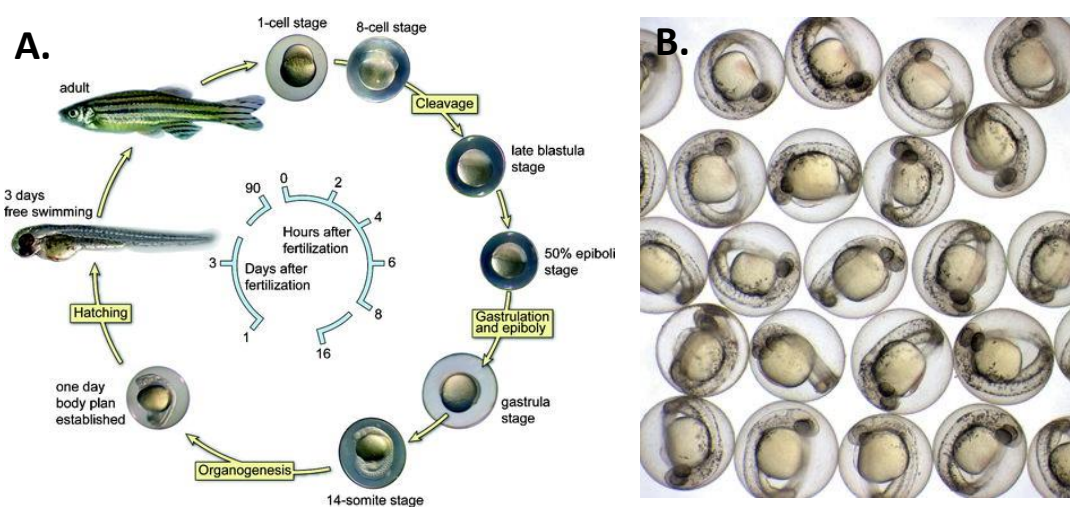
Εικόνα 1.4: Παραλλαγές του zebrafish

## 1.2 Κύκλος ζωής και Ανάπτυξη

### 1.2.1 Αναπαραγωγή

Η αναπαραγωγή των zebrafish πραγματοποιείται με εξωτερική γονιμοποίηση. Λαμβάνει χώρα από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο όταν βρίσκονται στη φύση και καθ' όλη τη διάρκεια του έτους σε εργαστηριακές συνθήκες. Η αναπαραγωγική συμπεριφορά επηρεάζεται σημαντικά από τη διαθεσιμότητα τροφής και από τη φωτοπερίοδο. Η ωορρηξία πυροδοτείται από την έκθεση του θηλυκού ατόμου σε εκκρινόμενες φερομόνες του αρσενικού (Eaton and Farley, 1974). Τα θηλυκά μπορούν να γεννούν, με διαλείμματα 2-3 ημερών, ως και 500 αυγά ανά 3 με 4 ημέρες σε ιδανικές συνθήκες (Engeszer et al., 2007).

Τα αυγά του zebrafish είναι διαυγή, 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 εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish είναι ταχεία, εφόσον στις πρώτες 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hours post fertilization, hpf) έχουν σχηματιστεί όλα τα κύρια όργανα. Μέσα στις 3 πρώτες ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (days post fertilization, dpf), τα έμβρυα εκκολάπτονται και αρχίζουν την αναζήτηση τροφής.



Εικόνα 1.5: Α) Κύκλος ζωής του zebrafish Β) Αυγά zebrafish

Ο κύκλος ζωής του είδους διαρκεί συνολικά 12 εβδομάδες καθώς μέσα σε 3-4 μήνες τα zebrafish φτάνουν σε σεξουαλική ωριμότητα. Στην φύση, ο μέσος όρος ζωής των ατόμων zebrafish είναι ένα έτος, ωστόσο εντός του εργαστηρίου η μέση διάρκεια ζωής ανέρχεται στα 3,5 χρόνια. Τα άτομα που ζουν υπό συνθήκες αιχμαλωσίας αναπτύσσουν συχνά κύρτωση της σπονδυλικής στήλης 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).

### 1.2.2 Αναπτυξιακά Στάδια

Η ανάπτυξη του zebrafish διακρίνεται στα εξής στάδια: το ζυγωτό (zygote), την περίοδο αυλακώσεων (cleavage), το βλαστίδιο (blastula), το γαστρίδιο (gastrula), την περίοδο κατάτμησης (segmentation), την φαρυγγική περίοδο (pharyngula), την περίοδο εκκόλαψης (hatching period) και την περίοδο της πρώιμης προνύμφης (early larva) (Kimmel et al., 1995; Slack, 2012).

- Το πρόσφατα γονιμοποιημένο αυγό παραμένει στο στάδιο του ζυγωτού (0 hpf—περίπου 30 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση) μέχρι και την ολοκλήρωση της πρώτης αυλάκωσης. Η γονιμοποίηση επάγει την ανύψωση του χορίου από το ζυγωτό και ενεργοποιεί κυτταροπλασματικές κινήσεις, οι οποίες είναι εμφανείς μετά από περίπου 10 λεπτά.
- Κατά την περίοδο των αυλακώσεων (περίπου 30 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση— $2\frac{1}{4}$  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 (2-3mm) 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 συγκυττιακή 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 (5¼ hpf–10 hpf) 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 (10 hpf–24 hpf) ξεκινά η δημιουργία των σωματιτών 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 (24 hpf–48 hpf) 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 (48 hpf–72 hpf) 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 και εξαρτάται από το πάχος του χορίου και τη μυϊκή δραστηριότητα του εμβρύου (Kimmel et al., 1995). Οι εκκολαπτόμενες πρώιμες προνύμφες έχουν μήκος περίπου 3 mm και αρχίζουν να προσκολλώνται σε σκληρές επιφάνειες μέσω μικρών εκκριτικών κυττάρων της επιδερμίδας της κεφαλής τους (Laale, 1977). Σε αυτό το στάδιο ξεκινούν επίσης δραστηριότητες όπως η κολύμβηση (Kimmel et al., 1995).
- Στο στάδιο της πρώιμης προνύμφης (ξεκινά στις 72 hpf 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 1.6: Εμβρυϊκά αναπτυξιακά στάδια zebrafish (Kimmel et al. 1995)

### 1.3 Καρδιακή Μορφολογία και Ανάπτυξη

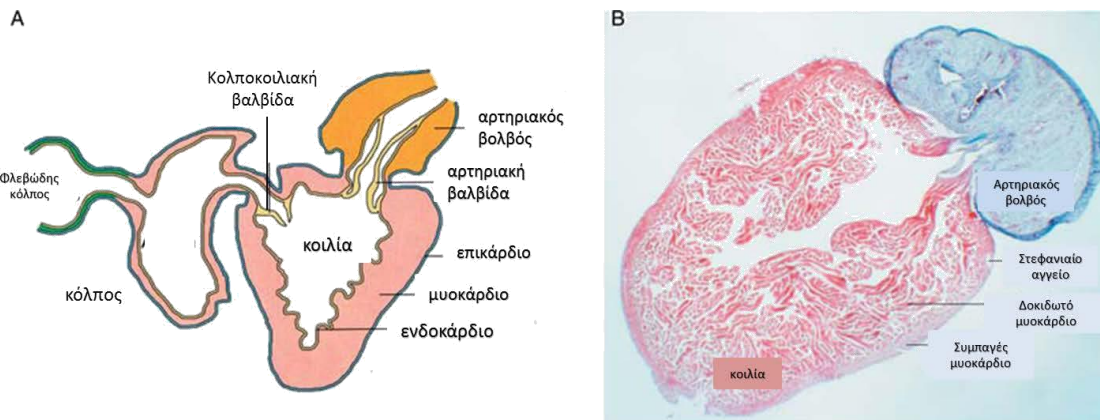
#### 1.3.1 Μορφολογία της καρδιάς των ενήλικων ατόμων zebrafish

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 πτερυγίου. Κατά την ανάπτυξη των σπονδυλωτών, η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που αναπτύσσεται και ξεκινά να λειτουργεί. Στο zebrafish, η καρδιά ξεκινά να πάλλεται ήδη από την ηλικία των 24 ωρών μετά τη γονιμοποίηση. Είναι δίχωρη και μορφολογικά αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα που ονομάζεται μυοκάρδιο και ένα εσωτερικό που ονομάζεται ενδοκάρδιο. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών ιστών πραγματοποιείται από ένα εκτενές στρώμα θεμέλιας ουσίας που ονομάζεται καρδιακή γέλη (Armstrong and Bischoff, 2004).

Το μη-οξυγονωμένο αίμα εισέρχεται στην καρδιά μέσω του φλεβώδους κόλπου (sinus venosus) του οποίου τα τοιχώματα 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. Εν συνεχεία, το αίμα εισέρχεται μέσω της φλεβοκοιλιακής βαλβίδας στον κόλπο. Ο κόλπος διαθέτει ένα λεπτό μυώδες τοίχωμα ενώ στον αυλό σχηματίζεται ένα χαλαρό πλέγμα. Έπειτα ο κόλπος συσπάται ενώ η κοιλία διαστέλλεται με αποτέλεσμα το αίμα να μεταφερθεί στη δεύτερη μέσω της κολποκοιλιακής βαλβίδας (Atrioventricular Valve – AV valve). Η κοιλία φέρει ένα πολύ παχύτερο τοίχωμα σε σχέση με αυτό του κόλπου, το οποίο αποτελείται από δύο στοιβάδες: μια εξωτερική μυϊκή στοιβάδα και μια εσωτερική σπογγώδη στοιβάδα. Η σύσπαση της κοιλίας δημιουργεί υψηλή σχετικά πίεση η οποία ωθεί το αίμα προς τον αρτηριακό βολβό (bulbus arteriosus) μέσω της αορτικής βαλβίδας που ενώνει τις δύο περιοχές (Bulboventricular Valve – BV valve). Ο αρτηριακός βολβός αποτελείται από μία εσωτερική στιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων τα οποία περιβάλλονται από ένα παχύ στρώμα αποτελούμενο από ιστό ελαστικών ινών και 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 (Bakkers 2011, Hu et al., 2001; Poon and Brand, 2013).



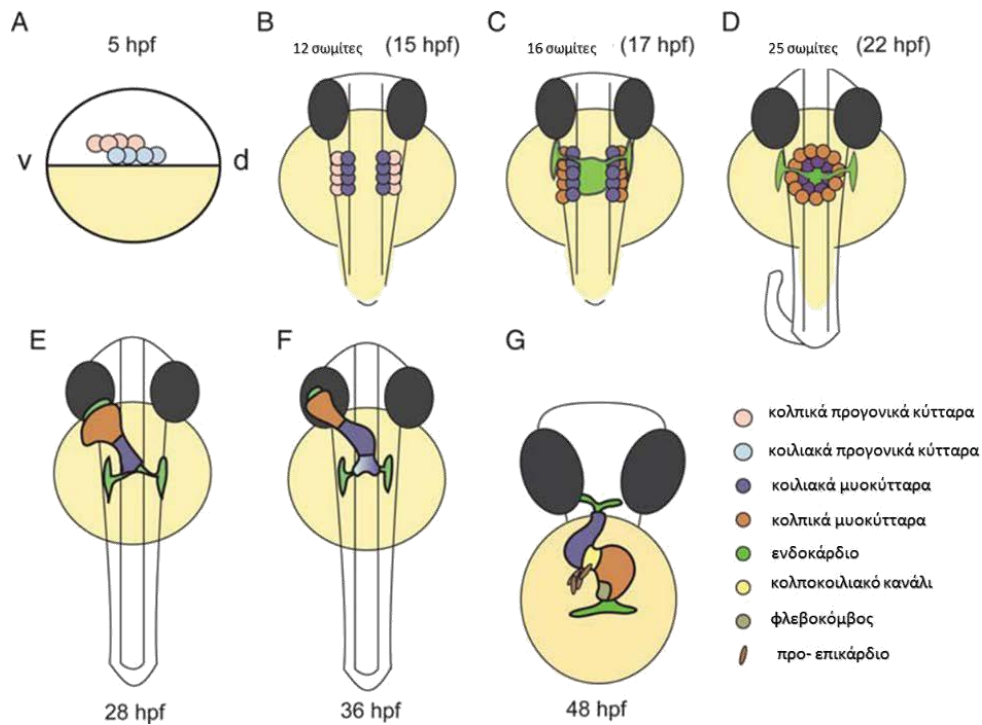
**Εικόνα 1.7: Αναπαράσταση της καρδιάς ενήλικων ατόμων zebrafish** Α) Σχηματική αναπαράσταση των δύο θαλάμων της καρδιάς- κόλπος, κοιλία – καθώς επίσης και των περιοχών: φλεβώδης κόλπος, κολποκοιλιακή βαλβίδα, αρτηριακός βολβός και αορτική βαλβίδα. Τέλος, σχηματίζονται οι τρεις ιστοί που διαμορφώνουν τον καρδιακό μυ: επικάρδιο, μυοκάρδιο και ενδοκάρδιο. Β) Ιστολογική απεικόνιση της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού της καρδιάς των ενήλικων zebrafish. (Poon and Brand, 2013).

### 1.3.2 Ανάπτυξη της καρδιάς κατά τα εμβρυϊκά στάδια

Η ανάπτυξη της καρδιάς στο zebrafish αρχίζει με την παρουσία των πρόδρομων καρδιακών κυττάρων (Cardiac Progenitor Cells, CPCs) στην περιοχή της οριακής ζώνης (marginal zone) πριν από τη φάση της γαστριδίωσης (Stainier et al., 1993). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

- Στο στάδιο των 5 hpf το έμβρυο βρίσκεται στη φάση του βλαστιδίου, το οποίο καλύπτει περίπου το 50% της λεκίθου. Σε αυτό το σημείο, τα CPCs βρίσκονται τοποθετημένα σε δύο συστάδες κατά μήκος της οριακής ζώνης. Τα πρόδρομα κύτταρα του κόλπου τοποθετούνται πιο κοιλιακά σε σχέση με τα πρόδρομα κύτταρα της κοιλίας. Κατά τη φάση της γαστριδίωσης, τα CPCs μετακινούνται ραχιαία κατά μήκος της περιοχής της μέσης γραμμής (mid-line) ώστε να καταλήξουν στην περιοχή της προσθιοπλάγιας μεσοδερμικής πλάκας (Anterior Lateral Plate Mesoderm, ALPM).

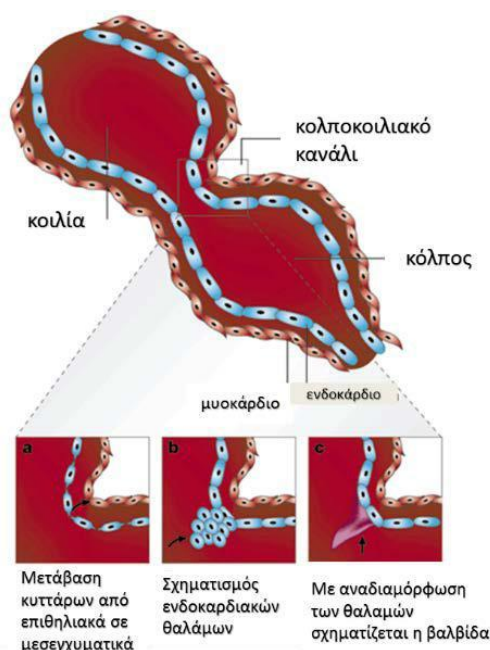
- Η καρδιακή διαφοροποίηση ξεκινά στα πρόδρομα κοιλιακά καρδιομυοκύτταρα με την έκφραση των καρδιακών μυοσινών στο στάδιο των 12 σωματιών. Στη συνέχεια, ο μυοκαρδιακός ιστός επεκτείνεται με συνεχή διαφοροποίηση στις πλευρικές περιοχές του ALPM ενώ δίπλα σε αυτά διαφοροποιούνται τα μελλοντικά κολπικά καρδιομυοκύτταρα. Ενώ τα ενδοκαρδιακά κύτταρα έχουν ήδη μεταναστεύσει από το ALPM κατά μήκος της μέσης γραμμής, τα μυοκαρδιακά κύτταρα υιοθετούν αυτή τη συμπεριφορά λίγο αργότερα.
- Όταν και οι δύο συστάδες κυττάρων βρεθούν στη μέση γραμμή σχηματίζουν μια δομή καρδιακού δίσκου με τα ενδοκαρδιακά κύτταρα να βρίσκονται εσωτερικά αυτού (κεντρικά), τα κοιλιακά καρδιομυοκύτταρα να τα περιβάλλουν σχηματίζοντας ομόκεντρο κύκλο και τα κολπικά καρδιομυοκύτταρα να βρίσκονται στην περιφέρεια. Με τη μορφοποίηση της καρδιάς ο δίσκος αυτός μετατρέπεται στον καρδιακό σωλήνα. Το ενδοκάριο σχηματίζει την εσωτερική επένδυση του μυοκαρδιακού σωλήνα.
- Στις 28 hpf ο γραμμικός καρδιακός σωλήνας έχει πλέον σχηματιστεί, με τον φλεβικό πόλο να εντοπίζεται πρόσθια και αριστερά και τον αρτηριακό πόλο να βρίσκεται στη μέση γραμμή. Η διαφοροποίηση της καρδιάς συνεχίζεται στον αρτηριακό πόλο με αποτέλεσμα νέα καρδιομυοκύτταρα να προστεθούν στην περιοχή αυτή.
- Στις 36 hpf ξεκινάει η συστροφή (looping) της καρδιάς με τη μετατόπιση της κοιλίας κατά μήκος της μέσης γραμμής με αποτέλεσμα η στένωση στην περιοχή της κολποκοιλιακής βαλβίδας να γίνεται για πρώτη φορά ορατή. Ο καρδιακός σωλήνας εξακολουθεί να συστρέφεται σχηματίζοντας μια δομή που ομοιάζει με το γράμμα S. Ελλειψοειδή εξωκαρδιακά προ-επικαρδιακά κύτταρα βρίσκονται κοντά στο κολποκοιλιακό κανάλι απ' όπου ξεκινούν να καλύπτουν το μυοκάριο σχηματίζοντας το επικαρδιακό στρώμα. Ο φλεβόκομβος βρίσκεται στην εσωτερική καμπυλότητα του κόλπου κοντά στον φλεβικό πόλο (Bakkers, 2011).



Εικόνα 1.8: Στάδια της καρδιακής ανάπτυξης του zebrafish (Bakkers, 2011)

- 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) (Christoffels et al., 2004). Η καμπυλότητα αυτή οφείλεται στα επιμήκη καρδιομυοκύτταρα και ενισχύεται και από την έναρξη της αιματικής ροής. Η επιμήκυνση αναστέλλεται από την εγγενή συσταλτικότητα η οποία προστατεύει από φαινόμενα καρδιακής διαστολής (Auman et al., 2007).
- Στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο της καρδιάς, λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός των κολποκοιλιακών βαλβίδων. Οι βαλβίδες είναι απαραίτητες για την αποφυγή φαινομένων παλινδρόμησης του αίματος από την κοιλία πίσω στον κόλπο κατά τη συστολή της. Η σύνθεσή τους ξεκινά με τη δημιουργία ενός ενδοκαρδιακού επάρματος (cushion) στην περιοχή του κολποκοιλιακού διαύλου. Τα ενδοκαρδιακά κύτταρα της περιοχής που άπτονται της καρδιακής γέλης λαμβάνουν σήματα από το κανάλι για να μεταπέσουν από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT). Τα ενδοκαρδιακά κύτταρα μεταναστεύουν μέσα

στην καρδιακή γέλη και πολλαπλασιάζονται για να γεμίσουν αυτές τις τοπικές διογκώσεις (Bakkers, 2011). Η διαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών κυττάρων ξεκινά στις 36 hpf, οπότε τα παρακείμενα ενδοκαρδιακά κύτταρα του κολποκοιλιακού καναλιού γίνονται κυβοειδή και ξεκινούν να εκφράζουν το μόριο διακυτταρικής επικοινωνίας Dm-grasp (Beis et al., 2005). Μέχρι περίπου τις 48 hpf, έχει δημιουργηθεί μία στοιβάδα κυβοειδών κυττάρων που εκφράζουν το εν λόγω μόριο, σε αντίθεση με τα υπερκείμενα πλακώδη κύτταρα που οριοθετούν το μυοκάρδιο που δεν το εκφράζουν. Επιπλέον, τα κυβοειδή κύτταρα σχηματίζουν προεκτάσεις εντός της καρδιακής γέλης. Ωστόσο, η παραπάνω θεωρία σχετικά με τον σχηματισμό των βαλβίδων αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα καθώς έχει προταθεί από ερευνητικές ομάδες ότι δεν λαμβάνει χώρα ο μηχανισμός της μετάβασης των κυττάρων από ενδοθηλιακά σε μεσεγχυματικά αλλά εγκόλπωση των ενδοκαρδιακών κυττάρων (Scherz et al., 2008).



**Εικόνα 1.9: Ανάπτυξη των καρδιακών επαρμάτων των βαλβίδων (Stainier, 2001)**

Για τη διαφοροποίηση των καρδιακών κυττάρων απαραίτητα είναι τα σηματοδοτικά μονοπάτια *Bmp* (Kishimoto et al., 1997) και *Nodal* τα οποία όταν ενεργοποιηθούν επάγουν τη σύνθεση του μεταγραφικού παράγοντα *Nkx2.5*, ο

ο οποίος με τη σειρά του επάγει την έκφραση του γονιδίου *gata5*. Επίσης, σημαντικός είναι και ο μεταγραφικός παράγοντας Hand2 ο οποίος επάγει παρόμοια διαδικασία (Reiter et al., 2001).

Όσον αφορά τον σχηματισμό των βαλβίδων, τα μοριακά σήματα που απαιτούνται είναι, όπως και σε όλα τα αμνιωτά, τα σηματοδοτικά μονοπάτια Notch, NFAT, ErbB και Tgfβ (Chang et al., 2004; Timmerman et al. 2004; Beis et al. 2005; Scherz et al. 2008). Για την πραγματοποίηση του EMT απαραίτητο είναι επίσης το σηματοδοτικό μονοπάτι Wnt/β-catenin το οποίο επάγει τη σύνθεση της υαλουρονικής συνθετάσης 2.

## 1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish στην επιστημονική έρευνα

### 1.4.1. Γενικά

Τα τελευταία χρόνια το zebrafish έχει αναδειχθεί σε ένα πολλά υποσχόμενο και ευρέως χρησιμοποιούμενο ζωικό μοντέλο, 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:

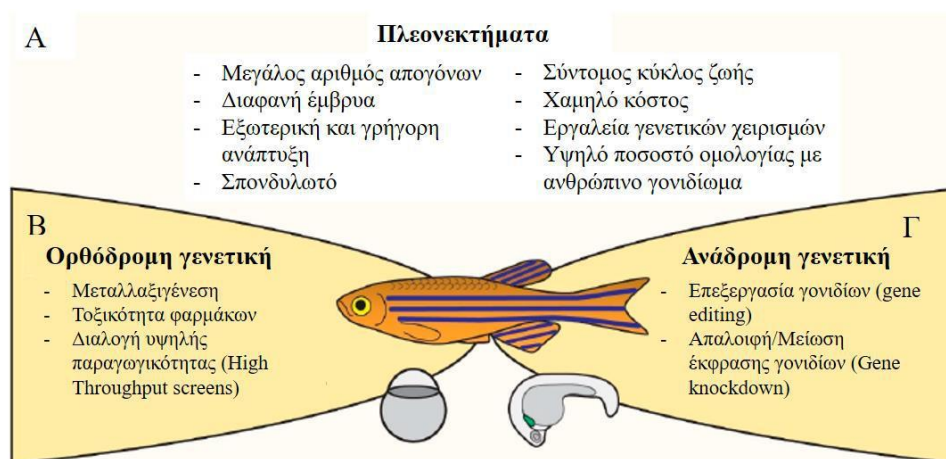
- Τα zebrafish, λόγω της ανθεκτικότητας και του μικρού μεγέθους τους, διατηρούνται εύκολα σε σχέση με άλλα πειραματόζωα. Μια μικρή εργαστηριακή εγκατάσταση ενυδρείου μπορεί να συντηρήσει περισσότερα από 1000 ζώα (Pooh and Brand, 2013).
- Το κόστος συντήρησης μιας μονάδας zebrafish δεν θεωρείται υψηλό συγκριτικά με το αντίστοιχο κόστος για μια μονάδα θηλαστικών, παρέχοντας τη δυνατότητα διατήρησης μιας τέτοιας μονάδας ακόμα και σε εργαστήρια με λιγότερους οικονομικούς πόρους. Οι διατροφικές απαιτήσεις των ιχθύων και οι απαιτήσεις της συντήρησης μιας εγκατάστασης γλυκού νερού είναι αυτές που καθορίζουν το σχετικά χαμηλό οικονομικό κόστος (Allen and Neely, 2010).
- Τα ενήλικα άτομα zebrafish γίνονται σεξουαλικά ώριμα ήδη από την ηλικία των 3 μηνών μετά τη γονιμοποίηση και σε ιδανικές συνθήκες, ένα μεμονωμένο ζεύγος αναπαραγωγής, μπορεί να παράγει εκατοντάδες αυγά εβδομαδιαίως, διευκολύνοντας γενετικές και στατιστικές αναλύσεις (Brown et al., 2016).
- Η αλληλουχία του γονιδιώματος του zebrafish έχει πλήρως αποκρυπτογραφηθεί (Postlethwait et al., 1998). Τα γονιδιώματα του zebrafish και του ανθρώπου έχουν υψηλή ομολογία (προσεγγίζει το 80%) και περιέχουν ορθόλογα γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα και ρυθμιστικά μόρια που ελέγχουν παρόμοιες διαδικασίες στην ανάπτυξη και την ομοίωση (Strahle and Grabher, 2010). 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 μεταλλαγές 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).

- Σε αντίθεση με τα συστήματα θηλαστικών, όπως το ποντίκι, τα έμβρυα zebrafish αναπτύσσονται εξωτερικά του σώματος της μητέρας και είναι ουσιαστικά διαυγή, καθιστώντας εύκολη την *in vivo* παρατήρηση της ανάπτυξής τους (*ex utero*). 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 ανάπτυξη των zebrafish είναι ταχεία και ο σχηματισμός των περισσότερων οργάνων ολοκληρώνεται τις πρώτες πέντε ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα όργανα του εμβρύου διαθέτουν μικρό μέγεθος και μπορούν ολόκληρα να παρατηρηθούν με τεχνικές μικροσκοπίας και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού να επιτευχθεί τρισδιάστατη απεικόνισή τους (Beis and Stainier, 2006).
- Είναι πολύ συνήθης η κατασκευή διαγονιδιακών οικογενειών zebrafish με τη χρήση φθοριζουσών ουσιών για παρατήρηση και ζωντανή απεικόνιση συγκεκριμένων ιστών και συστημάτων σε στερεοσκόπιο ή μικροσκόπιο φθορισμού.
- Τα έμβρυα μπορούν να εκτεθούν και να απορροφήσουν χημικές ενώσεις (φάρμακα, μεταλλαξιγόνα που έχουν διαλυθεί στο νερό) μέσω παθητικής διάχυσης. 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).



**Εικόνα 1.10: Το ζωικό μοντέλο zebrafish** Α) Τα πλεονεκτήματα του zebrafish ως πειραματόζωο και οι προσεγγίσεις Β) της ορθόδρομης γενετικής και Γ) της ανάδρομης γενετικής ανάλυσης για τη μελέτη ασθενειών (Brown et al., 2016)

#### 1.4.2 Πλεονεκτήματα της χρήσης του zebrafish στην Καρδιαγγειακή Έρευνα

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; Bakkers, 2011):

- Η εξωτερική ανάπτυξη διαφανών εμβρύων επιτρέπει την άμεση και μη επεμβατική παρατήρηση της διαδικασίας της ανάπτυξης και της μορφολογίας 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 zebrafish στην αρχική φάση της ανάπτυξής τους δεν εξαρτώνται από το κυκλοφορικό σύστημα για την κάλυψη των αναγκών τους σε οξυγόνο. Αντίθετα, λόγω της λεπτής και διαπερατής επιδερμίδας τους, δέχονται οξυγόνο από το νερό του περιβάλλοντός τους μέσω διάχυσης. Επομένως, τα γενετικά τροποποιημένα zebrafish με παθολογικούς καρδιακούς φαινοτύπους συνήθως επιβιώνουν και αναπτύσσονται για διάστημα έως 7 ημέρες επιτρέποντας τη λεπτομερή ανάλυση φαινοτύπων, που σε άλλα συστήματα θα ήταν αδύνατη καθώς θα επέφεραν θνησιμότητα.
- Η καρδιά των zebrafish είναι δίχωρη και άρα απλούστερη από την καρδιά των θηλαστικών, επομένως είναι πιο εύκολη η μελέτη της λειτουργίας της. Ταυτόχρονα, τα γονίδια που ρυθμίζουν τα κύρια στάδια της ανάπτυξής της είναι συντηρημένα μεταξύ των σπονδυλωτών επομένως και στο zebrafish. 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).

### 1.4.3 Ηθικοί Περιορισμοί

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μια κοινή απαίτηση για τον περιορισμό των πειραμάτων σε ζώα και για το λόγο αυτό η χρήση αυγών του είδους zebrafish είναι πλέον αποδεκτή (Gellert and Heinrichsdorff, 2001; Lammer et al., 2009). Με τον όρο «έμβρυο» ορίζεται το στάδιο εκείνο που περιλαμβάνει την περίοδο μετά τη γονιμοποίηση όπου σχηματίζεται το ζυγωτό μέχρι την εκκόλαψη. Στο στάδιο ανάπτυξης που λαμβάνει χώρα έξω από το αυγό αποκαλείται ελεύθερο έμβρυο

(Lammer et al., 2009). Συγκεκριμένο πρωτόκολλο ισχύει για ελέγχους με τη χρήση εμβρύων του είδους *Danio rerio* (OECD, 2006; ISO, 2006). Τα είδη ιχθύων, μπορεί να θεωρούνται σχετικά απλοί οργανισμοί συγκριτικά με τα θηλαστικά, κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει στην περίπτωση του γονιδιώματος του zebrafish, το οποίο περιέχει 25 ζεύγη χρωμοσωμάτων, δηλαδή 2 παραπάνω ζεύγη συγκριτικά με το ανθρώπινο γονιδίωμα που περιέχει 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων (Hill et al., 2005), και εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με τα θηλαστικά (Liu et al., 2007). Λόγω των βασικών ομοιοτήτων των σπονδυλωτών, το zebrafish μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο στην έρευνα ασθενειών (Scholz et al., 2008).

## 1.5 Χρήση του zebrafish στη γενετική ανάλυση

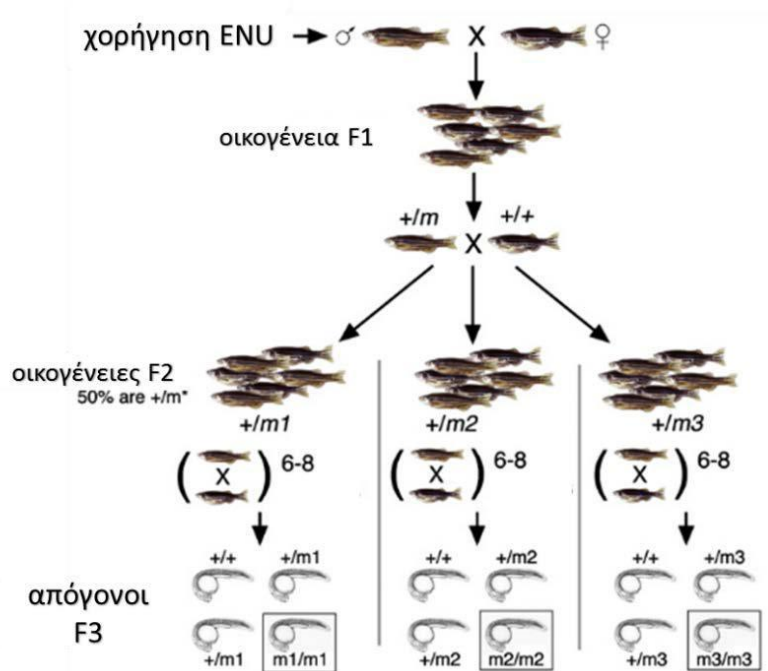
### 1.5.1 Ορθόδρομη Γενετική Ανάλυση (Forward Genetic Screening)

Στόχος της ορθόδρομης γενετικής ανάλυσης είναι η ταυτοποίηση γονιδίων που εμπλέκονται σε ένα βιολογικό μονοπάτι μέσω της μελέτης του γονιδιώματος πληθυσμών του zebrafish που διαθέτουν γενετικές τροποποιήσεις ικανές να μεταβάλλουν τη λειτουργία ενός γονιδίου (Lawson and Wolfe, 2011).

Η πρώτη προσέγγιση της διαδικασίας αυτής είναι η δημιουργία κληρονομήσιμων μεταλλαγών στο γονιδίωμα των zebrafish τα οποία στη συνέχεια θα ελεγχθούν για τυχόν φαινοτυπικές ανωμαλίες. Αρχικά, οι ερευνητές χρησιμοποιούσαν τη μέθοδο της ακτινοβόλησης με ακτίνες γ προκειμένου να δημιουργήσουν θραύσεις στα χρωμοσώματα και με αυτόν τον τρόπο να προκαλέσουν παθολογικούς φαινότυπους (Chakrabarti et al., 1983; Walker and Streisinger, 1983). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή προκαλούσε μεγάλης κλίμακας βλάβες στο γονιδίωμα και επομένως καθιστούσε δύσκολο τον εντοπισμό του υπεύθυνου γονιδίου για κάθε παθολογικό φαινότυπο. Για τον λόγο αυτό, αργότερα προτιμήθηκε η μέθοδος εξωγενούς χορήγησης του χημικού N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (N-ethyl-N-nitrosourea, ENU) σε αρσενικά άτομα zebrafish. Το χημικό αυτό προκαλεί μεταλλάξεις στα σπερματικά κύτταρα των ατόμων και κάθε μεταλλαγμένος φαινότυπος που προκαλείται από αυτό αντιστοιχίζεται σε μεταλλαγή ενός μόνο γονιδίου (Mullins et al., 1994; Solnica-Krezel et al., 1994).

Οι πρώτοι γενετικοί έλεγχοι μεγάλης κλίμακας που πραγματοποιήθηκαν εστίασαν στον χαρακτηρισμό πλήθους μεταλλαγμένων φαινοτύπων εμβρύων τρίτης γενιάς. Η παρατήρησή τους γινόταν σε απλό στερεοσκόπιο ενώ ο τρόπος κληρονόμησης των συγκεκριμένων φαινοτύπων ήταν υπολειπόμενος. Σε αυτή, λοιπόν, την περίπτωση, αρσενικά άτομα στα οποία είχε χορηγηθεί ENU διασταυρώθηκαν αρχικά με θηλυκά αγρίου τύπου ώστε να προκύψει ένας μεγάλος πληθυσμός απογόνων (F1) (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996). Με βάση τις γνώσεις μας για τη δράση του ENU, αναμένεται ότι κάθε ένα άτομο της F1 γενιάς θα έχει τουλάχιστον μία γενετική βλάβη ικανή να προκαλέσει έναν εμβρυϊκό φαινότυπο. Τα άτομα της πρώτης γενιάς εκτρέφονται μέχρι την ενηλικίωση εντός του εργαστηρίου ώστε στη συνέχεια μετά από διασταύρωση με ενήλικα αγρίου

τύπου να δώσουν μια νέα γενιά (F2) φορέων της μετάλλαξης. Τέλος, τα άτομα της F2 γενιάς διασταυρώνονται μεταξύ τους προκειμένου να δώσουν απογόνους (F3) με τη μελέτη των οποίων θα γίνει ο χαρακτηρισμός του εμβρυϊκού μεταλλαγμένου φαινοτύπου. Με τον τρόπο αυτό χαρακτηρίστηκαν τουλάχιστον 6000 εμβρυϊκοί παθολογικοί φαινότυποι και ταυτοποιήθηκε μεγάλος αριθμός από τα υπεύθυνα γονίδια (Driever et al., 1996; Haffter et al., 1996).



**Εικόνα 1.11: Σχηματική απεικόνιση ορθόδρομης γενετικής ανάλυσης και ελέγχου των διασταυρώσεων της F2 γενιάς (Lawson and Wolfe, 2011)**

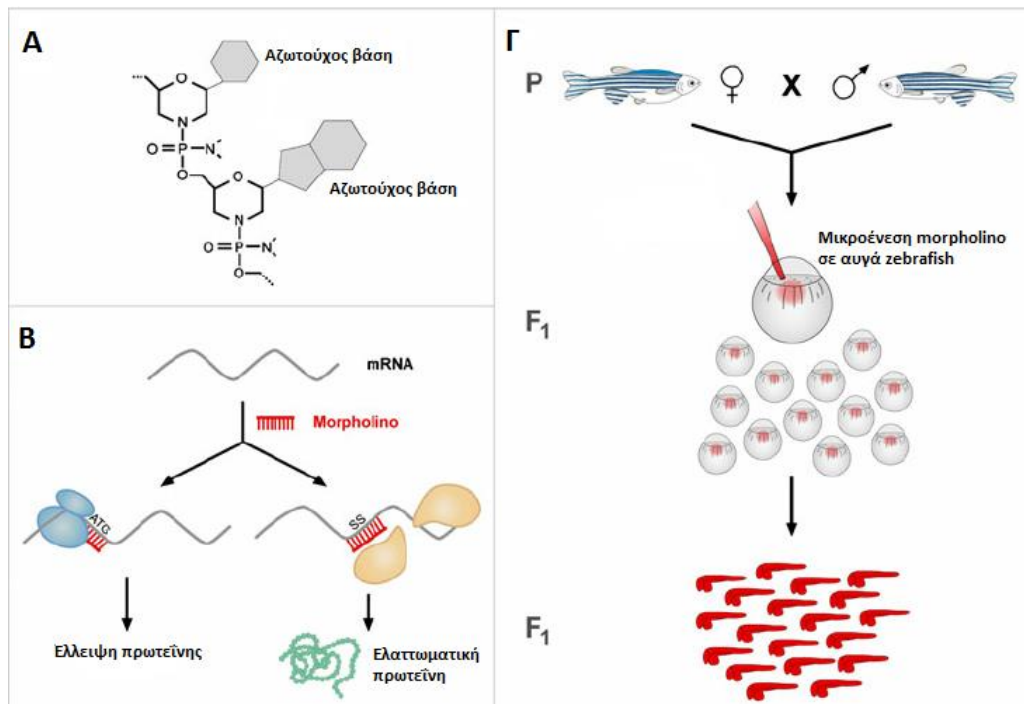
Για τον προσδιορισμό των υπεύθυνων γονιδίων, που αποτελεί και τον ζητούμενο στόχο, έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι με πιο συνήθη αυτή της δημιουργίας γενετικών και φυσικών χαρτών με την ταυτόχρονη χρήση γενετικών δεικτών (Gates et al., 1999; Geisler et al., 1999; Kelly et al., 2000; Woods et al. 2005). Πολύ πρόσφατα εφευρέθηκε μια νέα, απλή, οικονομική και αρκετά αυτοματοποιημένη ανάλυση χαρτογράφησης μεταλλαγών στο συνολικό RNA των οργανισμών (Mutation Mapping Analysis Pipeline for Pooled RNA-seq, MMAPPR). Η μέθοδος αυτή δεν απαιτεί ήδη υπάρχοντα γενετικό χάρτη των ατόμων που υφίστανται τη μετάλλαξη αλλά λειτουργεί υπολογίζοντας τις διαφορετικές

συχνότητες εμφάνισης του υπολειπόμενου γονιδίου κάθε πολυμορφισμού (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) στο συνολικό RNA δύο πληθυσμών: αυτόν των εμβρύων που φέρουν τον μεταλλαγμένο φαινότυπο και αυτόν των φυσιολογικών αδερφών τους. Πρόκειται για μία τεχνική που θα χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ορθόδρομη γενετική ανάλυση σε πειραματικά μοντέλα όπως το zebrafish, η *D. melanogaster* και ο *C.elegans* (Hill et al., 2013).

### **1.5.2 Ανάδρομη Γενετική Ανάλυση (Reverse Genetic Screening)**

Κατά την ανάδρομη γενετική ανάλυση ακολουθείται η αντίστροφη πορεία από αυτήν που περιγράψαμε παραπάνω, δηλαδή με στοχευμένη αποσιώπηση ενός γονιδίου που μας ενδιαφέρει οδηγούμαστε στη μελέτη του φαινοτύπου που προκαλείται. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η διερεύνηση της λειτουργίας ενός συγκεκριμένου γονιδίου.

Η πιο γνωστή και δημοφιλής μέθοδος ανάδρομης γενετικής ανάλυσης για πολλά χρόνια είναι η χορήγηση Morpholinos (Mos), συνθετικών ολιγομερών με δομή όμοια μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Περιέχουν τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις του DNA, ο σκελετός όμως δεν συγκροτείται από πεντόζη και φωσφοδιεστερικούς δεσμούς αλλά από μεθυλενομορφολινικούς δακτυλίους και φωσφοδιαμιδικούς δεσμούς. Έχουν την ικανότητα λόγω συμπληρωματικότητας των αζωτούχων βάσεων να προσδένονται στο mRNA του γονιδίου-στόχου. Η δέσμευση αυτή εμποδίζει τη μετάφραση του mRNA του γονιδίου και επομένως και τη σύνθεση της αντίστοιχης λειτουργικής πρωτεΐνης. Για να είναι αποτελεσματική η μέθοδος αυτή, τα MOs κατασκευάζονται έτσι ώστε να είναι ανθεκτικά στην υδρόλυση, αποφεύγοντας τον κίνδυνο της αποικοδόμησης (Bill et al., 2009).

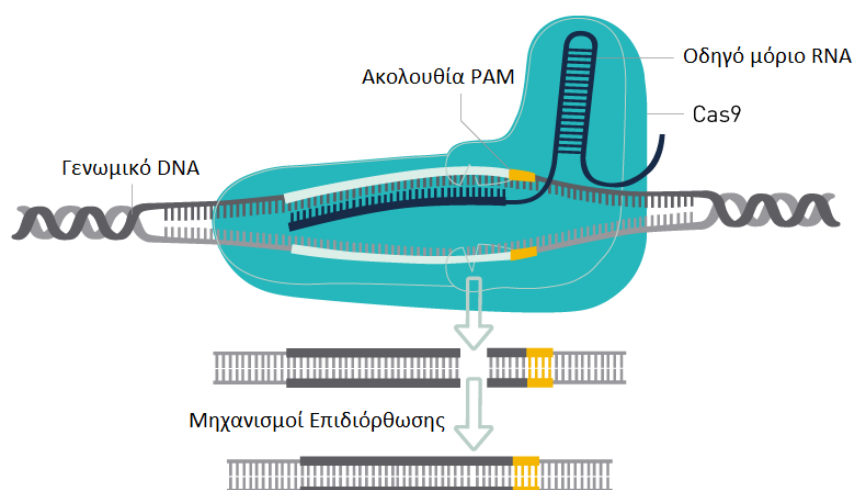


**Εικόνα 1.12: Χρήση morpholinos στην ανάδρομη γενετική ανάλυση** Α) Χημική δομή morpholino Β) Δράση του MO εντός του οργανισμού Γ) Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας χρήσης morpholino (Renninger et al., 2011)

Τα τελευταία χρόνια ένα άλλο σύστημα στόχευσης αλληλουχιών-στόχων, γνωστό ως CRISPR/cas9, γίνεται όλο και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο στην ανάδρομη γενετική ανάλυση. Το σύστημα CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) και οι CRISPR-συσχετιζόμενες (CRISPR-associated, cas) πρωτεΐνες αποτελούν τον αμυντικό μηχανισμό βακτηρίων και αρχαίων έναντι ξενικού DNA (ικού ή πλασμιδιακού). Συγκεκριμένα, στο βακτήριο *S. Pyogenes* το σύστημα αυτό χαρακτηρίζεται από την πρωτεΐνη cas9, η οποία έχει δράση ενδονουκλεάσης.

Το σύστημα CRISPR/cas9 στοχοποιεί το ξενικό DNA δημιουργώντας ένα μικρό, συμπληρωματικό ως προς την αλληλουχία-στόχο, μονόκλωνο RNA (CRISPR RNA, crRNA), το οποίο λειτουργεί σαν οδηγός, μέσω του οποίου η νουκλεάση cas9 εντοπίζει τη DNA ακολουθία-στόχο. Η ακολουθία-στόχος μπορεί να βρίσκεται εντός πλασμιδίου ή συγχωνευμένη στο βακτηριακό γονιδίωμα. Ακόμη, η ακολουθία μπορεί να εντοπίζεται σε μία ή πολλαπλές θέσεις, το σύνολο των οποίων θα

αποτελέσουν στόχο της Cas9. Ανεξάρτητα από το μόριο του DNA στην οποία θα προσδεθεί το crRNA, η Cas9 θα κόψει το δίκλωνο DNA (Double Strand Break, DSB), αποσιωπώντας τη συγκεκριμένη ακολουθία (Blackburn et al. 2013)



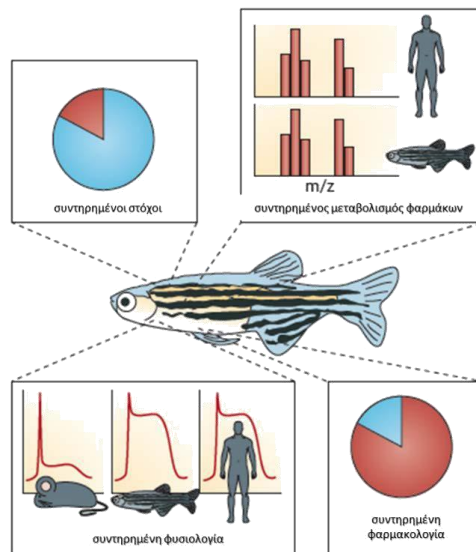
**Εικόνα 1.13: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος CRISPR/Cas9**  
(<https://www.diagenode.com/en/categories/crispr-cas9-genome-editing>)

### 1.5.3 Χρήση του zebrafish στον χημικό γενετικό έλεγχο (Chemical Genetic Screening)

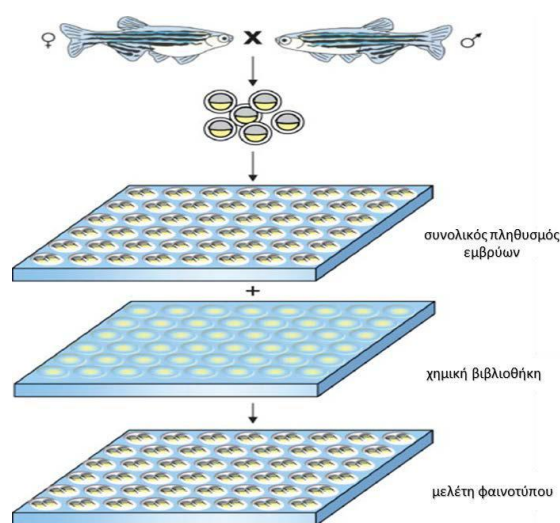
Ο χημικός γενετικός έλεγχος είναι η διαδικασία κατά την οποία μικρά χημικά μόρια ελέγχονται για την ικανότητά τους να αλλάξουν μία βιολογική διαδικασία σε ένα γνωστό βιολογικό σύστημα. Από τη στιγμή που το μόριο θα δώσει ένα αποτέλεσμα, στην περίπτωση που αυτό είναι θετικό, μπορεί να δοθεί το έναυσμα για την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου (Zon and Peterson, 2005; Tsang, 2010).

Το zebrafish έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια σε χημικούς γενετικούς ελέγχους λόγω των πλεονεκτημάτων που έχουμε ήδη αναφέρει αλλά και λόγω της ομολογίας του σε πολλά επίπεδα με τον άνθρωπο. Οι έλεγχοι στους οποίους χρησιμοποιείται αφορούν είτε στην τοξικολογική μελέτη χημικών μορίων (οικοτοξικολογικά τεστ), είτε στην ανίχνευση πιθανών αναστολέων μιας γενετικής μεταλλαγής, είτε στην εύρεση πιθανών αναστολέων ή επαγωγών βιολογικών διαδικασιών (π.χ. αναγέννηση), καθώς και των μοριακών μηχανισμών δράσης τους.

Στους ελέγχους αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυάριθμα έμβρυα σε μικροπλάκες καλλιέργειας (well plates) και να προστεθούν τα χημικά μόρια σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Paz and Zhu, 2005; Taylor et al., 2010; Tsang, 2010). Τέλος, εκτός του αναπτυξιακού σταδίου λαμβάνονται υπόψη και άλλες παράμετροι, όπως η συγκέντρωση της ουσίας και η αφαίρεση του χορίου ή μη από το έμβρυο (κάτι που επηρεάζει την απορρόφηση της από αυτό).



**Εικόνα 1.14:** Η καταλληλότητα του ζωικού μοντέλου zebrafish για την ανακάλυψη ανθρώπινων φαρμάκων (MacRae and Peterson, 2015)



**Εικόνα 1.15:** Σχηματική απεικόνιση μιας χημικής γενετικής ανάλυσης (Peterson and Fishman, 2011)



## **1.6 Η μεταλλαγμένη σειρά s274**

### **1.6.1 Γενικά**

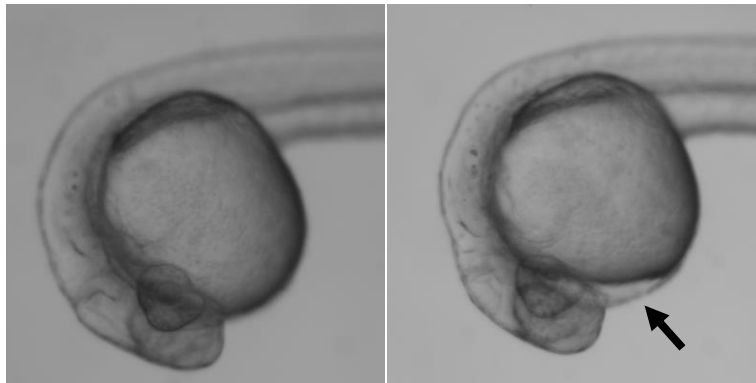
Η μεταλλαγμένη σειρά s274 προέκυψε από τυχαία μεταλλαξιγένεση σε ενήλικα άτομα zebrafish και έλεγχο διασταυρώσεων στην F2 γενιά, στο εργαστήριο του Prof. Didier Stainier στο University of California San Francisco.

### **1.6.2 Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου s274**

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο φαινότυπος της σειράς s274, πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ ενήλικων, ετερόζυγων για τον συγκεκριμένο φαινότυπο ατόμων και μελετήθηκαν τόσο σε στερεοσκόπιο και χαμηλή μεγέθυνση όσο και σε μεγαλύτερη μεγέθυνση με μικροσκόπια τα μεταλλαγμένα έμβρυα (mutants) που προέκυψαν σε σύγκριση με τα φυσιολογικά έμβρυα της ίδιας διασταύρωσης (siblings).

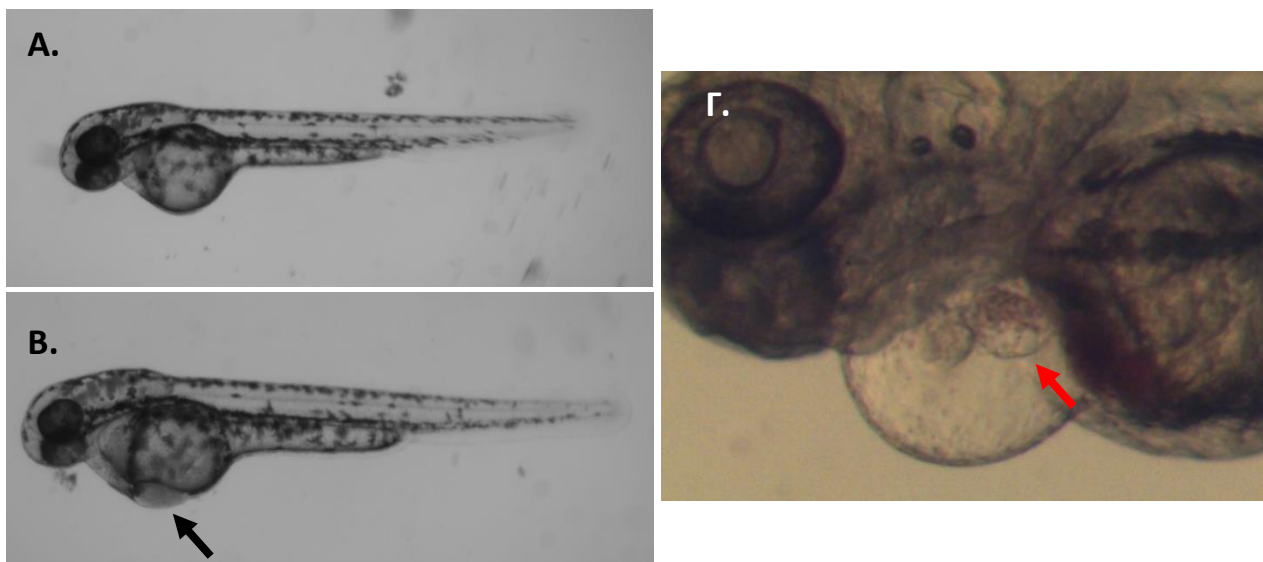
Ως προς τον τύπο κληρονομικότητας, ο φαινότυπος είναι υπολειπόμενος. Το βασικό χαρακτηριστικό του φαινοτύπου είναι η αποκόλληση του μυοκαρδίου από το ενδοκάρδιο. Κατά τα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης του zebrafish το μυοκάρδιο αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα καρδιομυοκυττάρων (συνήθως δύο στοιβάδων) ενώ το ενδοκάρδιο αποτελείται αποκλειστικά από ενδοθηλιακά κύτταρα. Στα μεταλλαγμένα έμβρυα της σειράς s274, το μυοκάρδιο αποκολλάται από το ενδοκάρδιο σχηματίζοντας πτυχώσεις οι οποίες σταδιακά εμποδίζουν τη φυσιολογική συστολή της καρδιάς, οδηγώντας σε μείωση του ρυθμού της αιματικής ροής, μη φυσιολογική ανάπτυξη της καρδιάς και εμφάνιση διαφόρων παθολογικών εξωτερικών χαρακτηριστικών που περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

Η εμφάνιση του φαινοτύπου s274 γίνεται αντιληπτή ήδη από την ηλικία των 24 ωρών, οπότε παρατηρείται μικρό οίδημα στην περιοχή μεταξύ λεκίθου και κεφαλής το οποίο προκαλεί τοπική συμπίεση της πρώτης προς το εσωτερικό.



**Εικόνα 1.16:** Χαρακτηρισμός φαινοτύπου *s274* σε έμβρυα ηλικίας 24 hpf (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 3x). Το μεταλλαγμένο έμβρυο (δεξιά) εμφανίζει μικρό περικαρδιακό οίδημα το οποίο συμπιέζει τη λέκιθο προς το εσωτερικό (μαύρο βέλος)

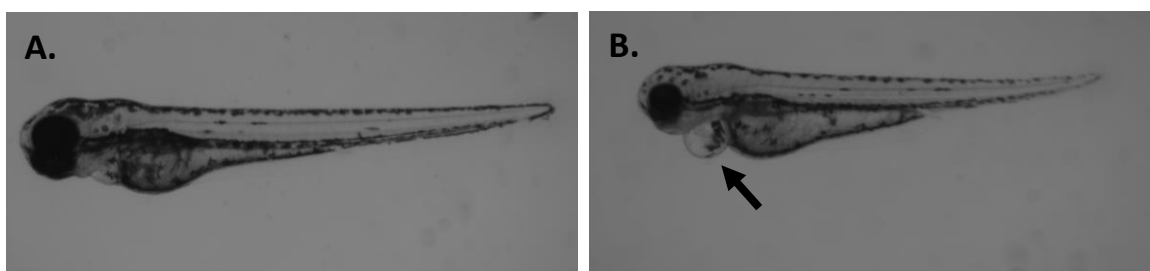
Στο στάδιο των 48 ωρών τα μεταλλαγμένα έμβρυα παρουσιάζουν περικαρδιακό οίδημα, τοπικό αιμάτωμα είτε στην περιοχή της καρδιάς είτε στο κέντρο αιμοποίησης στη ράχη, αρρυθμίες και επιβράδυνση της αιματικής τους κυκλοφορίας. Επίσης, με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου παρατηρήθηκε ότι η κοιλία στα μεταλλαγμένα έμβρυα φαίνεται να συρρικνώνεται στο στάδιο αυτό, γεγονός που υποδηλώνει μη φυσιολογική καρδιακή ανάπτυξη και λειτουργία.



**Εικόνα 1.17:** Χαρακτηρισμός φαινοτύπου *s274* σε έμβρυα ηλικίας 48 ωρών Α) (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 2x) Φυσιολογικό έμβρυο και Β) Μεταλλαγμένο έμβρυο το οποίο παρουσιάζει περικαρδιακό οίδημα και αιμάτωμα (μαύρο βέλος στην κάτω φωτογραφία) Γ) (στερεοσκόπιο,

μεγέθυνση 4x) Μεταλλαγμένο έμβρυο. Είναι εύκολα διακρίσιμος ο διαχωρισμός της εξωτερικής «στοιβάδας» που αποτελεί το μυοκάρδιο (κόκκινο βέλος) από την εσωτερική, η οποία είναι το ενδοκάρδιο. Επίσης διακρίνεται μια ποσότητα αίματος η οποία έχει λιμνάσει στον κόλπο. (blood pooling)

Κατά την τρίτη ημέρα της ζωής των μεταλλαγμένων εμβρύων, τα συμπτώματα του φαινοτύπου επιδεινώνονται με αποτέλεσμα το περικαρδιακό οίδημα να μεγεθύνεται και η αιματική κυκλοφορία να επιβραδύνεται σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό. Σε ορισμένες περιπτώσεις στο στάδιο αυτό παρατηρείται συσσώρευση και εγκλωβισμός μιας ποσότητας αίματος στο εσωτερικό της κοιλίας (blood pooling) με αποτέλεσμα η ροή του αίματος να σταματά παρά το γεγονός ότι η καρδιά εξακολουθεί να συσπάται. Η αποκόλληση του μυοκαρδίου από το ενδοκάρδιο είναι πολύ έντονη σε αυτό το στάδιο ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αυξημένη παλινδρόμηση του αίματος κατά τη μετακίνηση από τον κόλπο στην κοιλία μέσω του κολποκοιλιακού καναλιού (AV canal) και κατά τη μετάβαση του από την κοιλία στα βράγχια μέσω της κοιλιακής αρτηρίας. Σύγκριση του καρδιακού ρυθμού μεταξύ μεταλλαγμένων και φυσιολογικών εμβρύων της ίδιας γενιάς δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά με τον μέσο όρο και των δύο πληθυσμών να προσεγγίζει τους 150 παλμούς ανά λεπτό (beats per minute/bpm).

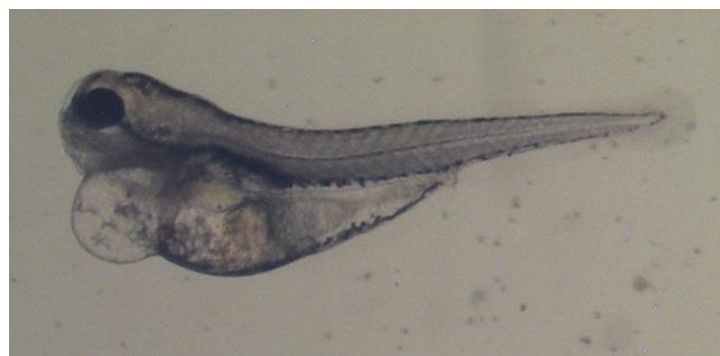


**Εικόνα 1.18: Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου *s274* σε έμβρυα ηλικίας 72 ωρών** A) (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 2x) Φυσιολογικό και B) Μεταλλαγμένο έμβρυο. Είναι εμφανές ότι το περικαρδιακό οίδημα των μεταλλαγμένων ατόμων αυξάνει σε μέγεθος σε σχέση με τις 48 ώρες



**Εικόνα 1.19: Καρδιακός φαινότυπος *s274* στις 72 ώρες** Α) (στερεοσκόπιο φθορισμού, μεγέθυνση 4x) εικόνα brightfield και Β) φθορισμού του διαγονιδίου *kdrl:gfp* (το οποίο σημαίνει το ενδοθήλιο) του ίδιου εμβρύου. Γ) Με τεχνητή αλληλοεπικάλυψη των δύο προηγούμενων εικόνων είναι δυνατόν να διακρίνουμε το χάσμα (κόκκινο βέλος) μεταξύ του μυοκαρδίου, το οποίο είναι ορατό στο brightfield, και του ενδοκαρδίου, το οποίο εκπέμπει σήμα φθορισμού.

Τέλος, στις 96 ώρες μετά τη γονιμοποίηση η αιματική κυκλοφορία σταματά, το περικαρδιακό οίδημα μεγεθύνεται ακόμα περισσότερο, η καρδιά είτε παύει να πάλλεται είτε συσπάται ασθενώς και υπολειτουργεί για μερικές ώρες ή για λίγα 24ωρα.



**Εικόνα 1.20: Χαρακτηρισμός του φαινοτύπου *s274* σε έμβρυα ηλικίας 5 ημερών** (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 2x) Το περικαρδιακό οίδημα των μεταλλαγμένων εμβρύων έχει εξαπλωθεί και η καρδιά υπολειτουργεί οδηγώντας στον θάνατο

Συνοψίζοντας όλα τα δεδομένα που παρατέθηκαν παραπάνω:

- Η μετάλλαξη *s274* προκαλεί ένα υπολειπόμενο καρδιακό φαινότυπο που χαρακτηρίζεται από την αποκόλληση του μυοκαρδίου από το ενδοκάριο των μεταλλαγμένων εμβρύων
- Η αποκόλληση έχει ως συνέπεια τη διαταραχή της συσταλτικότητας της καρδιάς, την επιβράδυνση της αιματικής ροής και την εμφάνιση περικαρδιακού οιδήματος
- Τα έμβρυα που φέρουν το φαινότυπο πεθαίνουν συνήθως στην ηλικία των 5 ημερών

### **1.6.3 Αναζήτηση του υπεύθυνου γονιδίου για τον φαινότυπο *s274***

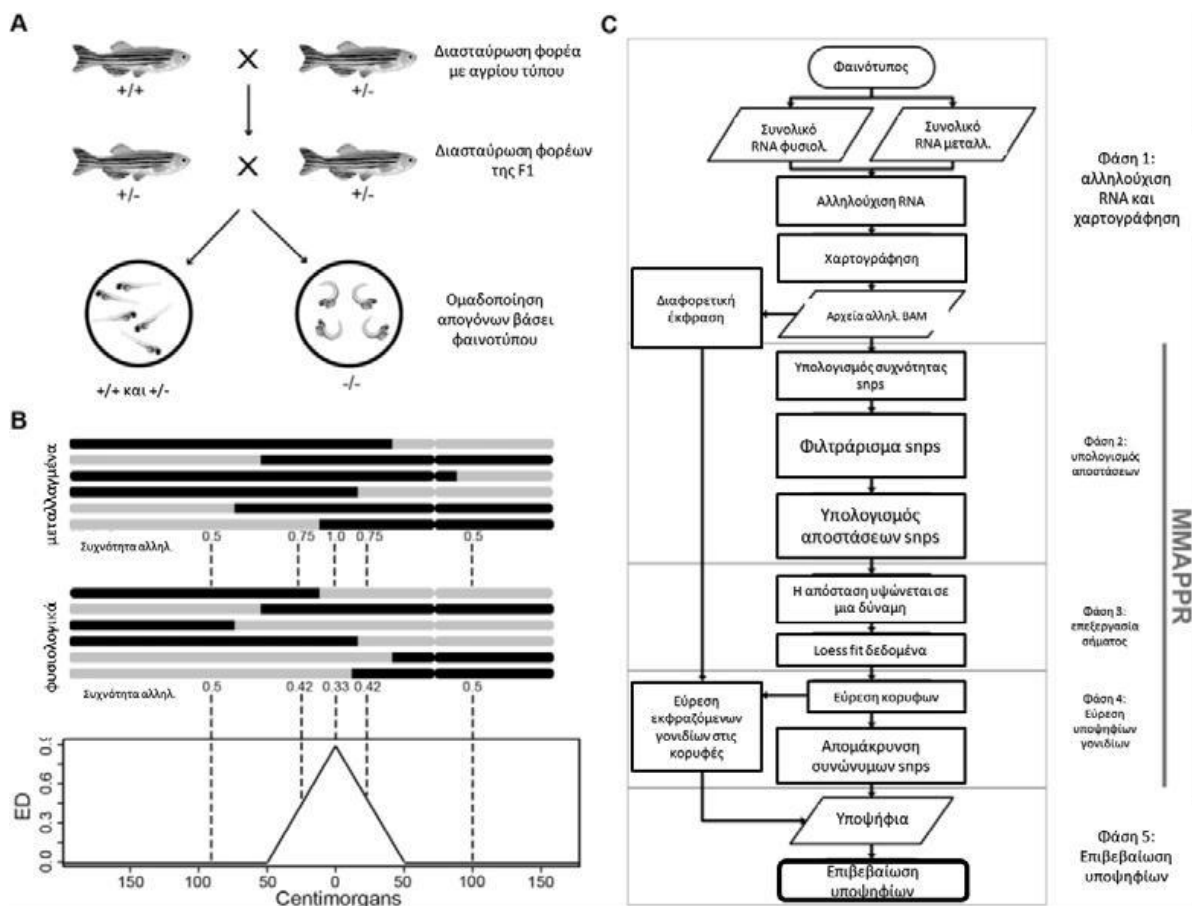
Για τον εντοπισμό της σημειακής μεταλλαγής που σχετίζεται με τον παθολογικό φαινότυπο *s274* ακολουθήθηκε μια διαδικασία ορισμένα στάδια της οποίας πραγματοποιήθηκαν με τη συνεργασία του Πανεπιστημίου της Γιούτα των Η.Π.Α.

Εντός του εργαστηρίου έγινε διασταύρωση δύο ετερόζυγων για τον φαινότυπο *s274* ενηλίκων ατόμων. Στη συνέχεια, τα έμβρυα που προέκυψαν από την διασταύρωση αυτή διαχωρίστηκαν βάσει του φαινοτύπου τους σε δύο πληθυσμούς: ο πρώτος περιλάμβανε όλα τα μεταλλαγμένα έμβρυα ενώ ο δεύτερος ίδιο αριθμό φυσιολογικών. Για καθέναν από τους δύο πληθυσμούς εμβρύων που προέκυψαν έγινε απομόνωση RNA και τα αντίστοιχα δείγματα στάλθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Γιούτα για αλληλούχιση και χαρτογράφηση της μεταλλαγής.

Η ανάλυση που ακολουθήθηκε εκεί είναι μια μέθοδος χαρτογράφησης μεταλλαγών (Mutation Mapping Analysis Pipeline for Pooled RNAseq – MMAPPR) και παρέχει τη δυνατότητα εντοπισμού του χρωμοσώματος στο οποίο βρίσκεται η σημειακή μεταλλαγή που προκαλεί έναν υπολειπόμενο φαινότυπο. Βασίζεται στην αρχή ότι η συχνότητα του μεταλλαγμένου αλληλομόρφου θα είναι υψηλότερη στο συνολικό RNA της ομάδας των μεταλλαγμένων εμβρύων και χαμηλότερη στην ομάδα των φυσιολογικών εμβρύων. Έτσι, υπολογίστηκαν οι αποστάσεις των

διαφόρων θέσεων πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms - SNPs) μεταξύ των δύο πληθυσμών με τη βοήθεια ανασυνδυασμών και προσδιορίστηκε και η περιοχή στην οποία περιλαμβάνεται η σημειακή μεταλλαγή που προκαλεί τον φαινότυπο s274.

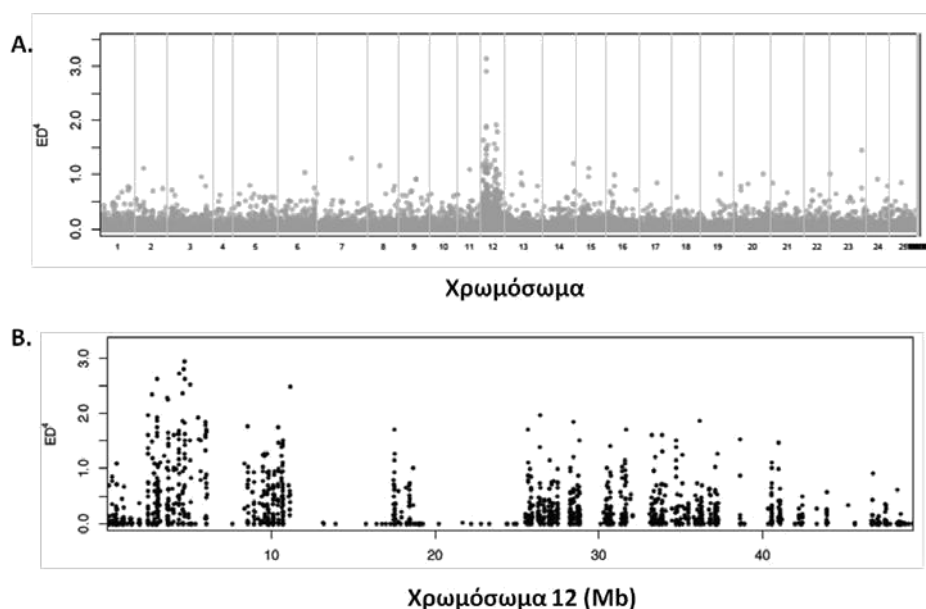
Εκτός από αυτή τη δυνατότητα, η μέθοδος MMAPPR ταυτόχρονα περιλαμβάνει τη χρήση μιας σειράς λογισμικών προγραμμάτων βιοπληροφορικής με τη βοήθεια των οποίων δημιουργήθηκε ένας κατάλογος πολλών σημειακών μεταλλαγών σε διαφορετικές θέσεις του συγκεκριμένου χρωμοσώματος που πιθανώς ευθύνονται για τον εν λόγω φαινότυπο (Hill et al. 2013)



Εικόνα 1.21: Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου MAAPPR (Hill et al., 2013)

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν από την ανάλυση MMAPPR υποδεικνύουν ότι η σημειακή μεταλλαγή που προκαλεί τον φαινότυπο s274 βρίσκεται στο 12<sup>ο</sup> χρωμόσωμα του γονιδιώματος του zebrafish. Επιπρόσθετα, λήφθηκε ένα

διάγραμμα το οποίο απεικονίζει τις περιοχές του 12<sup>ου</sup> χρωμοσώματος στις οποίες είναι περισσότερο αυξημένη η πιθανότητα εντοπισμού της μεταλλαγής που μας ενδιαφέρει, όπως επίσης και μια λίστα σημειακών μεταλλαγών σε κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, μία από τις οποίες θα μπορούσε να είναι η ζητούμενη.

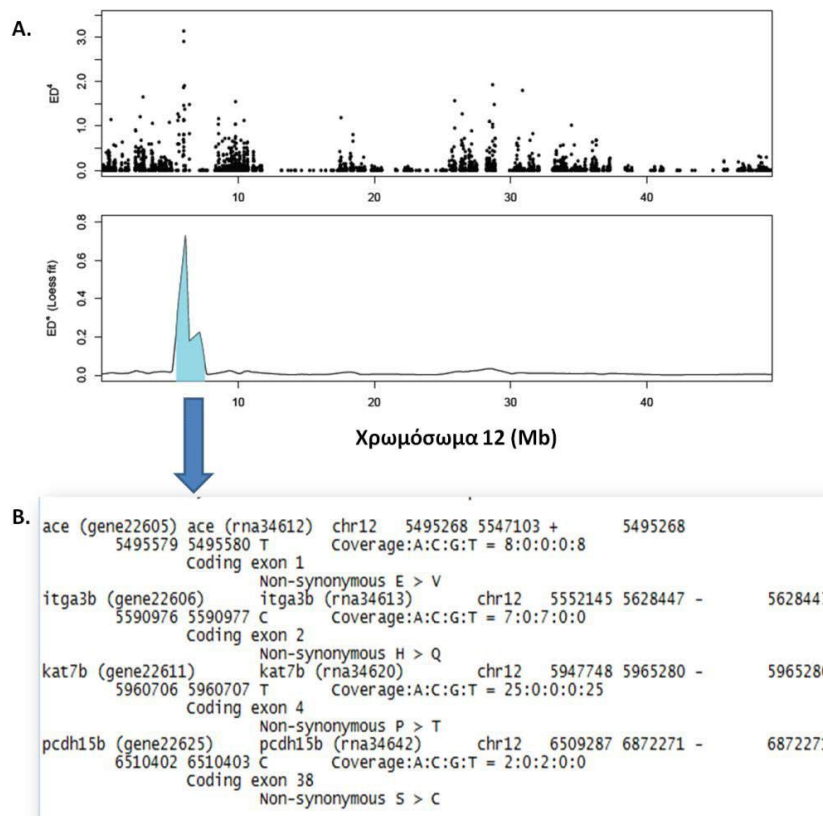


**Εικόνα 1.22: Αποτελέσματα της ανάλυσης MMAPPR** Α) Το χρωμόσωμα που περιλαμβάνει το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για τον φαινότυπο *s274* είναι το 12<sup>ο</sup>. Στον οριζόντιο άξονα του διαγράμματος φαίνεται ο αριθμός των χρωμοσωμάτων των zebrafish ενώ το εύρος των σημείων σε κάθε χρωμόσωμα δείχνει τον σχετικό πληθυσμό των θέσεων πολυμορφισμών σε αυτό. Β) Εντός του 12<sup>ου</sup> χρωμοσώματος οι περιοχές που διακρίνονται από υψηλό αριθμό πολυμορφισμών είναι οι εξής: 3-6Mb, 8-12Mb, 16-18Mb, 26-28Mb, 31-37Mb και 41-42Mb

Η περιοχή μεταξύ 5 και 6 Mb του 12<sup>ου</sup> χρωμοσώματος, όπως φαίνεται στο διάγραμμα, συγκεντρώνει τον μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών επομένως η πιθανότητα εντοπισμού του γονιδίου που ευθύνεται για τον φαινότυπο *s274* εντός αυτής είναι μεγαλύτερη. Στην περιοχή αυτή, με τη βοήθεια της ανάλυσης MMAPPR έχουν εντοπιστεί 4 διαφορετικές σημειακές μεταλλαγές οι οποίες βρίσκονται σε κωδικές περιοχές 4 διαφορετικών γονιδίων. Τα γονίδια αυτά είναι:

1. Το γονίδιο *ace* το οποίο κωδικοποιεί για το ένζυμο που μετατρέπει την Αγγειοτενσίνη I σε Αγγειοτενσίνη II (Angiotensin I converting enzyme).

2. Το γονίδιο *itga3b* το οποίο κωδικοποιεί για την υπομονάδα άλφα 3b της ιντεγκρίνης (integrin alpha 3b)
3. Το γονίδιο *kat7b* το οποίο κωδικοποιεί για την ακετυλοτρανσφεράση της λυσίνης (Lysine acetyltransferase 7b)
4. Το γονίδιο *pcdh15b* το οποίο κωδικοποιεί για ένα μόριο κυτταρικής προσκόλλησης της οικογένειας των καδερινών (protokadherin-related 15b)



**Εικόνα 1.23: Αποτελέσματα της MMAPPR** A) Με περισσότερο εξειδικευμένη ανάλυση προκύπτει από το διάγραμμα ότι η περιοχή του 12<sup>ου</sup> χρωμοσώματος με τον μεγαλύτερο αριθμό πολυμορφισμών είναι αυτή μεταξύ 5 και 6 Mb. Στο πρώτο διάγραμμα η απεικόνιση γίνεται με σημεία ενώ στο δεύτερο χρησιμοποιούνται καμπύλες. B) Η λίστα των γονιδίων και των σημειακών μεταλλαγών που αυτά υφίστανται περιλαμβάνει 4 διαφορετικά γονίδια εντός της συγκεκριμένης περιοχής του χρωμοσώματος. Για κάθε γονίδιο παρέχονται οι εξής πληροφορίες: το όνομα σε συντομογραφία, το χρωμόσωμα στο οποίο βρίσκεται, η θέση έναρξής του και η θέση λήξης του, η αλυσίδα του DNA στην οποία βρίσκεται (+/-), η θέση και η φύση της μεταλλαγμένης βάσης μέσα στο γονίδιο και η αμινοξική αλλαγή που προκαλείται.



## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία αφορά την ορθόδρομη γενετική ανάλυση της μεταλλαγμένης σειράς zebrafish s274. Στόχος μας ήταν να εντοπίσουμε το γονίδιο που προκαλεί τον μεταλλαγμένο φαινότυπο της σειράς, όπως αυτός έχει ήδη χαρακτηριστεί. Για να επιτεύξουμε τον στόχο μας, βασιστήκαμε σε διαθέσιμα δεδομένα που έχουν προκύψει μέσω μιας νέας μεθόδου χαρτογράφησης από το Πανεπιστήμιο της Γιούτα.

Αρχικά, αναλύσαμε τα διαθέσιμα δεδομένα για να εντοπίσουμε τις υποψήφιες μεταλλαγές που φαίνεται να έχουν την μεγαλύτερη πιθανότητα να είναι υπεύθυνες για τον φαινότυπο. Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε διασταυρώσεις μεταξύ φορέων της μεταλλαγής και παρατηρήσαμε τα έμβρυα σε στερεοσκόπιο, ούτως ώστε να διακρίνουμε αυτά που εμφανίζουν τον φαινότυπο και, κατά συνέπεια, είναι ομόζυγα για την μεταλλαγή. Προχωρήσαμε σε απομόνωση DNA από τα μεταλλαγμένα έμβρυα και τους ετερόζυγους γονείς και στη διαδικασία εντοπισμού του υπεύθυνου γονιδίου με αλληλούχιση του DNA στις περιοχές των υποψήφιων μεταλλάξεων.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 Βιολογικό υλικό

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

- Τα αγρίου τύπου ενήλικα zebrafish (*Danio rerio*) που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από την σειρά **AB**.
- **Μεταλλαγμένη σειρά s274 Tg *kdrl*:(EGFP)<sup>s843</sup>** : Πρόκειται για ενήλικα άτομα zebrafish τα οποία είναι ετερόζυγα για τον παθολογικό υπολειπόμενο φαινότυπο s274 και ταυτόχρονα φέρουν το διαγονίδιο *kdrl:gfr* (οικογένεια Flk). Τα άτομα αυτά προέκυψαν από διασταύρωση ενός ετερόζυγου για τον φαινότυπο s274 με ένα διαγονιδιακό άτομο αγρίου τύπου. Η μεταλλαγμένη σειρά s274 προέκυψε με τυχαία μεταλλαξιγένεση στο εργαστήριο του Prof. Didier Stainier στο University of California στο San Francisco. Τα διαγονιδιακά zebrafish *kdrl:gfr* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε ενδοθηλιακά κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *kdrl* (ή *flk*), το οποίο αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα του ενδοθηλίου (Beis et al. 2005). Τα άτομα αυτά παρουσιάζουν φυσιολογική ανάπτυξη.
- **Μεταλλαγμένη σειρά s274 Tg *tcf*:dsRed**: Πρόκειται για ενήλικα άτομα zebrafish τα οποία είναι ετερόζυγα για τον φαινότυπο s274 και ταυτόχρονα φέρουν το διαγονίδιο *tcf:dsRed* (οικογένεια TCF). Προέκυψαν με ανάλογο τρόπο με αυτόν που περιγράφεται παραπάνω. Τα διαγονιδιακά zebrafish *tcf:dsRed* εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *tcf*, το οποίο κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό παράγοντα των ενδοθηλιακών κυττάρων (Moro et al. 2012). Τα άτομα αυτά δεν εμφανίζουν φαινοτυπικές ή ιστολογικές ανωμαλίες.

- **Μεταλλαγμένη σειρά s274 Tg *tie2*:(EGFP)<sup>s849</sup>**: Ομοίως με τις παραπάνω σειρές, πρόκειται για ενήλικα άτομα zebrafish ετερόζυγα για τον φαινότυπο s274 που ταυτόχρονα φέρουν το διαγονίδιο *tie2:gfr* (οικογένεια Tie2). Τα διαγονιδιακά zebrafish *tie2:gfr* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα της κολποκοιλιακής βαλβίδας και της αορτικής βαλβίδας. Το γονίδιο της *gfr* είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *tie2*, που κωδικοποιεί τον ομώνυμο μεταγραφικό ενδοθηλιακό παράγοντα. Τα άτομα αυτά αναπτύσσονται φυσιολογικά.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι ο φθορισμός των διαγονιδίων κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο ενώ ο φαινότυπος της μετάλλαξης με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο.

## 3.2 Υλικά

### 3.2.1 Διαβίωση του ζωικού μοντέλου zebrafish

- Άλατα Instant Ocean
- Ξηρή τροφή σε μεγέθη Z000, Z300, Z400 (ZM Fish Food)
- Αφυδατωμένες κύστες *Artemia salina* (ZM Fish Food)
- Egg water (EW) η σύσταση του οποίου είναι: 0.3g/L Instant Ocean salts, 0.08g/L CaSO<sub>4</sub>, δις-απιονισμένο νερό (Double deionized water, ddH<sub>2</sub>O)
- 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): 180μL 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 ddH<sub>2</sub>O). Λαμβάνεται από την εταιρεία Calbiochem (κωδικός 53702).
- Διάλυμα 1-φαινυλο-2-θειουρίας (Phenylthiourea, 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 4g σκόνης Tricaine (Sigma-Aldrich, κωδικός A-5040) και αναμειγνύονται με 1L H<sub>2</sub>O. 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%
- Πρωτεϊνάση 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:

- Ταq DNA πολυμεράση της εταιρείας NEB
- PCR mix: 10mM dNTPs (της εταιρείας NEB), 1M MgCl<sub>2</sub>, 4M KCl, 1M Tris-HCl pH 8.4, 1% Gelatin της εταιρείας Sigma-Aldrich
- Εκκινητές: κατασκευάστηκαν από την εταιρεία Macrogen
- Ένζυμα Exol (20u/μL), SAP (1u/μL) της εταιρείας Sigma-Aldrich

**Πίνακας 3.1:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	GC%*	T <sub>m</sub> (°C)*
<b><i>ace</i> forward (a)</b>	GAA ACT TTT AAG CCA GCA CTC G	45	60,1
<b><i>ace</i> reverse (a)</b>	GCA GTG TTT TTG AAT GTG TAA AGC	38	60,3
<b><i>ace</i> forward (b)</b>	GAA CCT TGG ACT CAG GTG CTA C	55	64,2
<b><i>ace</i> reverse (b)</b>	CCG TTA AGC ATA ATT TGG GAG A	41	58,4
<b><i>itga3b</i> forward (a)</b>	AAC AAC AAG GCT TAC CAG AGT TTC	42	62,0
<b><i>itga3b</i> reverse (a)</b>	AAC TTA CTT CAC TGC ACA AAC AGC	42	62,0
<b><i>itga3b</i> forward (b)</b>	TTC TTC GCC TTT TCG GTC TG	50	58,4
<b><i>itga3b</i> reverse (b)</b>	AAT TCG CCG TGA GGT GTG G	58	59,5
<b><i>pcdh15b</i> forward (a)</b>	CTC TTC GTG TGT AAC AGC AAG TTT	42	62,0
<b><i>pcdh15b</i> reverse (a)</b>	CAC TCT TGT GTG CTG TGT TCA ATA	42	62,0
<b><i>pcdh15b</i> forward (b)</b>	TTT GAA ATC CAG ACA CCA TCC T	41	58,4
<b><i>pcdh15b</i> reverse (b)</b>	CGA AGT TAA GAT ACA AAT GTG GTT G	36	60,9
<b><i>kat7b</i> forward</b>	GCC AGA GTC TTT CTG GTC TTT AGT	46	63,6
<b><i>kat7b</i> reverse</b>	GAG ACT GAA TTC TTC AAG GGT GAC	46	63,6

\*Για τους υπολογισμούς χρησιμοποιήθηκε το εργαλείο (η T<sub>m</sub> είναι προσαρμοσμένη για την συγκέντρωση του διαλύματος σε άλατα): <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

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 (Ethidium Bromide, EtBr) της εταιρείας Invitrogen
- Αγαρόζη της εταιρείας Sigma-Aldrich
- 2-Log DNA Ladder της εταιρείας NEB
- 1 kb DNA GeneRuler Ladder της εταιρείας Thermo Scientific
- 6x Loading Dye (10mM Tris HCl pH 7.6, 0,15% orange G της εταιρείας Sigma-Aldrich, 60% glycerol, 60mM EDTA)

### 3.3 Προγράμματα λογισμικού

- Image J
- NCBI BLAST
- Uniprot
- Ensembl
- Zfin
- Dolphin-DC
- IC Capture 2.2
- HImage live
- LAS AF
- Chromas
- SnapGene

### 3.4 Εργαστηριακός εξοπλισμός – Αναλώσιμα

- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ1000
- Στερεοσκόπιο Nikon SMZ800
- Κάμερα DFK22BUC03
- Στερεοσκόπιο Nikon C-DSS230 και τροφοδοτικό λάμπας φθορισμού C-SHG1
- Συσκευή PCR (*DYAD DNA ENGINE –Peltier Thermal Cyclor*)
- 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 ddH<sub>2</sub>O (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
- Multiwell plates 96 φρεατίων
- Πλαστικά σωληνάρια 0.5, 1.5 και 2.0 mL (eppendorf)
- Πλαστικές πιπέτες μίας χρήσης των 5 και 10mL
- Υδροβολείς
- Υδατόλουτρο (Model WB 3015) της εταιρείας Bioline Scientific

### 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 (ΙΙΒΕΑΑ) σε συστήματα ανακύκλωσης και αποστείρωσης γλυκού νερού, σε δοχεία 1, 3 και 10 λίτρων. 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 νιτρικών <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 5<sup>η</sup> ημέρα ζωής 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 3.1:** Συστήματα ανακύκλωσης νερού του ενυδρείου στο ΙΙΒΕΑΑ. 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 σίτιση των ενήλικων zebrafish επιτελείται 2 φορές την ημέρα και κύρια παράμετρος για τον τρόπο διεξαγωγής της είναι η ηλικία των ψαριών. Μέχρι την 5<sup>η</sup> 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<sup>η</sup> ημέρα ζωής ξεκινά η χορήγηση ξηράς τροφής (τύπου Z000) δύο φορές την ημέρα, μέχρι την 30<sup>η</sup> ημέρα ζωής. Μετά το πέρας των 30 ημερών από τη γονιμοποίηση στα ψάρια χορηγείται το πρωί ζωντανή τροφή (*Artemia salina*) και το μεσημέρι ξηρά τροφή τύπου Z100. Σε ηλικία 2 μηνών η ξηρά τροφή αντικαθίσταται με τροφή τύπου Z300 ή Z400.

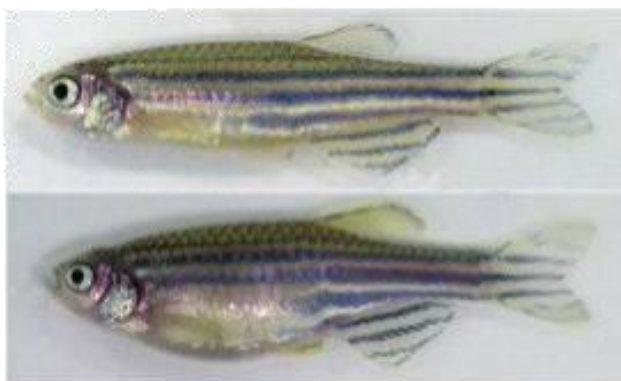
Η διαδικασία καλλιέργειας *Artemia salina* περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- Προσθήκη 1L απιονισμένου νερού ddH<sub>2</sub>O και 34 gr αλάτων Instant Ocean σε ανάστροφο κωνικό δοχείο
- Ανάδευση διαλύματος έως ότου γίνει διαυγές (διάλυση των αλάτων)
- Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από κύστες *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:

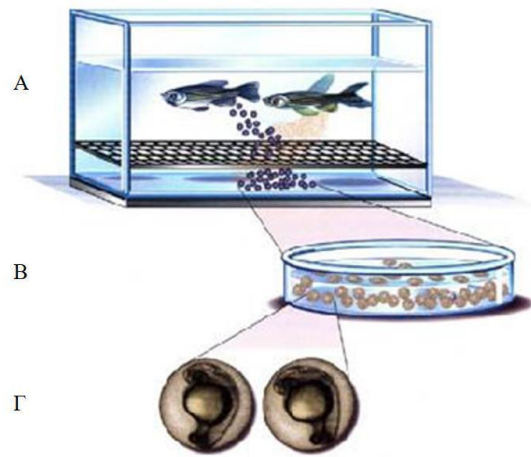


**Εικόνα 3.2:** Αρσενικό (πάνω) και θηλυκό (κάτω) άτομο zebrafish.

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

- Λήψη με απόχη ενός θηλυκού και ενός αρσενικού ατόμου από καθορισμένη οικογένεια
- Τοποθέτηση αυτών σε δοχείο ενός λίτρου, γεμισμένο στα 3/5 της χωρητικότητας του με νερό από το σύστημα του ενυδρείου, με την εξής διάταξη: το δοχείο χωρίζεται σε δύο μέρη, χρησιμοποιώντας ένα μεταλλικό πλέγμα. 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. 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:** 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. (<http://zebrafishing.blogspot.gr/>)

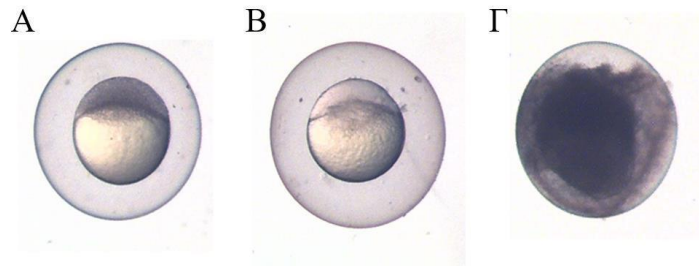
Μετά τη λήψη των απογόνων, πραγματοποιείται ένα σύντομο πρωτόκολλο (bleaching) με σκοπό την απολύμανση των αυγών και την αποφυγή προσβολής τους από διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς που διαβιούν στο νερό. Αυτό ακολουθεί τα εξής βήματα:

- 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
- 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 3.4:** 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 διαυγής (B). Τα νεκρά αυγά διακρίνονται εύκολα καθώς είναι μαυρισμένα στο εσωτερικό τους (Γ). Τα μη γονιμοποιημένα και τα νεκρά αυγά απομακρύνονται με πιπέτα Pasteur.

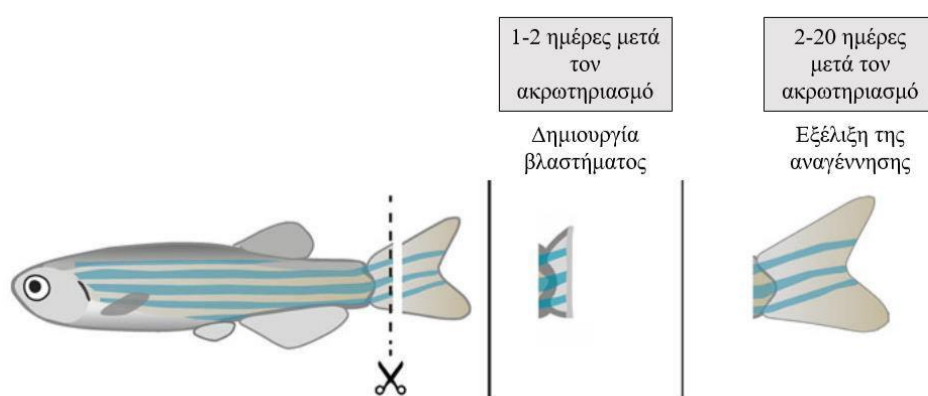
Τα έμβρυα μέχρι την ηλικία των 3 ημερών βρίσκονται φυσιολογικά εντός του χορίου, το οποίο τους παρέχει προστασία από διάφορους παράγοντες, πχ. παρασιτικούς οργανισμούς. Από τις 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και ύστερα, τα έμβρυα είναι ικανά να διαρρήξουν το χοριακό τοίχωμα και να απελευθερωθούν στο νερό. 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 προνάση, μια πρωτεάση η οποία υδρολύει τις πρωτεΐνες του χορίου, το μαλακώνει και διευκολύνει την έξοδο των εμβρύων από το εσωτερικό του. Συγκεκριμένα, προστίθενται 120μL 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 (500μL 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

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, με την εξής διαδικασία: το ενήλικο ψάρι τοποθετείται σε νερό συστήματος με κατάλληλη ποσότητα διαλύματος αναισθητικού Tricaine methanesulfonate 0.4% (το οποίο έχει αναλγητική και μυοχαλαρωτική δράση) ούτως ώστε να ακινητοποιηθεί ενώ παράλληλα αναπνέει φυσιολογικά. Στη συνέχεια, το αναισθητοποιημένο ψάρι ανασηκώνεται με τη χρήση λαβίδας και ακολουθεί τομή του ουραίου πτερυγίου με ψαλίδι. Το ψάρι διατηρείται σε γλυκό νερό σε μεμονωμένο δοχείο ενός λίτρου ενώ ο απομονωμένος ιστός τοποθετείται σε erpendorf χωρητικότητας 0,5mL με 100μl διαλύματος απομόνωσης DNA και 2μL πρωτεΐνάσης K.



**Εικόνα 3.5:** Ακρωτηριασμός ουραίου πτερυγίου στο zebrafish και αναγέννηση (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 ενεργότητας του ενζύμου 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)

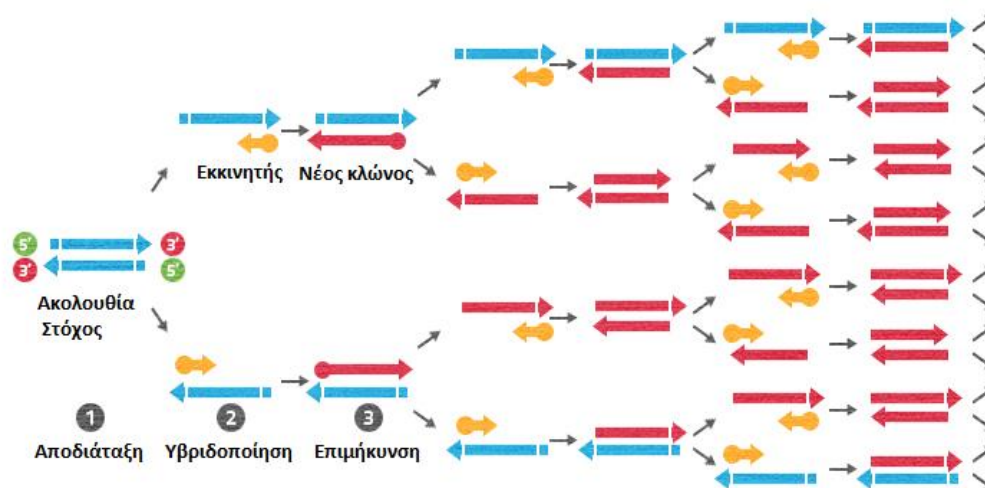
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) αποτελεί μια βιοχημική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την ενίσχυση μίας αλληλουχίας DNA, χωρίς τη χρήση ζωντανών κυττάρων. Η αρχή της PCR συνοψίζεται στην *in vitro* ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA που περιλαμβάνεται μεταξύ δύο περιοχών που στοχεύονται από συμπληρωματικά μονόκλινα συνθετικά DNA ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές). Οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις περιοχές-άκρα της ακολουθίας-στόχου και επιμηκύνονται από την δράση της DNA πολυμεράσης, κατόπιν διαδοχικών μεταβολών θερμοκρασίας.

Η γνώση της αλληλουχίας του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί είναι απαραίτητη για το σχεδιασμό των εκκινητών. Ο εκκινητής που υβριδίζεται στον κλώνο 3'→5' ονομάζεται πρόσθιος (forward), ενώ ο εκκινητής που υβριδίζεται στον κλώνο 5'→3' ονομάζεται ανάστροφος (reverse). Απαραίτητα αντιδρώντα για τη πραγματοποίηση της αντίδρασης, εκτός από το αρχικό δείγμα DNA, 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 πραγματοποιήθηκε 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:

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. Υβριδοποίηση (annealing): Μείωση θερμοκρασίας μεταξύ 50 και 71°C για 30-60 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει η πρόσδεση των εκκινητών
3. Επιμήκυνση (elongation): Αύξηση θερμοκρασίας στους 68-72°C για 1-3 λεπτά, που είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση. Εκτελείται η σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας του DNA μέσω πολυμερισμού 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)
5. 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 3.6: Τα βασικά στάδια της μεθόδου PCR**

(<https://theory.labster.com/PCR Polymerase Chain Reaction AG/>)

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 πιθανές μεταλλάξεις που ευθύνονται για τον φαινότυπο της σειράς *s274* (ομοζυγωτία ή ετεροζυγωτία). Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινήτες που αναγράφονται στον Πίνακα 3.1. Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε σε σωληνάκια errendorf του 0.5mL ήταν η παρακάτω:

1. 5μl δείγματος DNA
2. 2μl primer mix
3. 0.2μl Taq πολυμεράσης
4. 42.8μl PCR mix

Το primer mix κατασκευάστηκε με τη προσθήκη: 10μL πρόσθιου εκκινήτη, 10μL ανάστροφου εκκινήτη και 80μL ddH<sub>2</sub>O.

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. 68°C για 1 λεπτό
5. Επανάληψη σταδίων 2-4 για 39 φορές
6. 68°C για 5 λεπτά
7. Διατήρηση εντός του κυκλοποιητή 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. 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. 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 ανοσοστυπώματος κατά Western, Southern 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 του δείγματος σε πήκτωμα αγαρόζης, 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 αρνητικό πόλο προς τον θετικό πόλο με ταχύτητα εξαρτώμενη από το μέγεθος του.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η χρώση του πηκτώματος με βρωμιούχο αιθίδιο δίνει σήμα φθορισμού στα σημεία όπου υπάρχει DNA, όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε επιτυγχάνεται ποιοτικός προσδιορισμός του προϊόντος.

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 δείγμα DNA έχει αντικατασταθεί με ddH<sub>2</sub>O, 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 ddH<sub>2</sub>O σε 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/μL) (για διάσπαση εκκινητών)
- 0.25μl rSAP (1u/μL) (για αποφωσφορυλίωση νουκλεοτιδίων)
- 4.725μL ddH<sub>2</sub>O

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

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

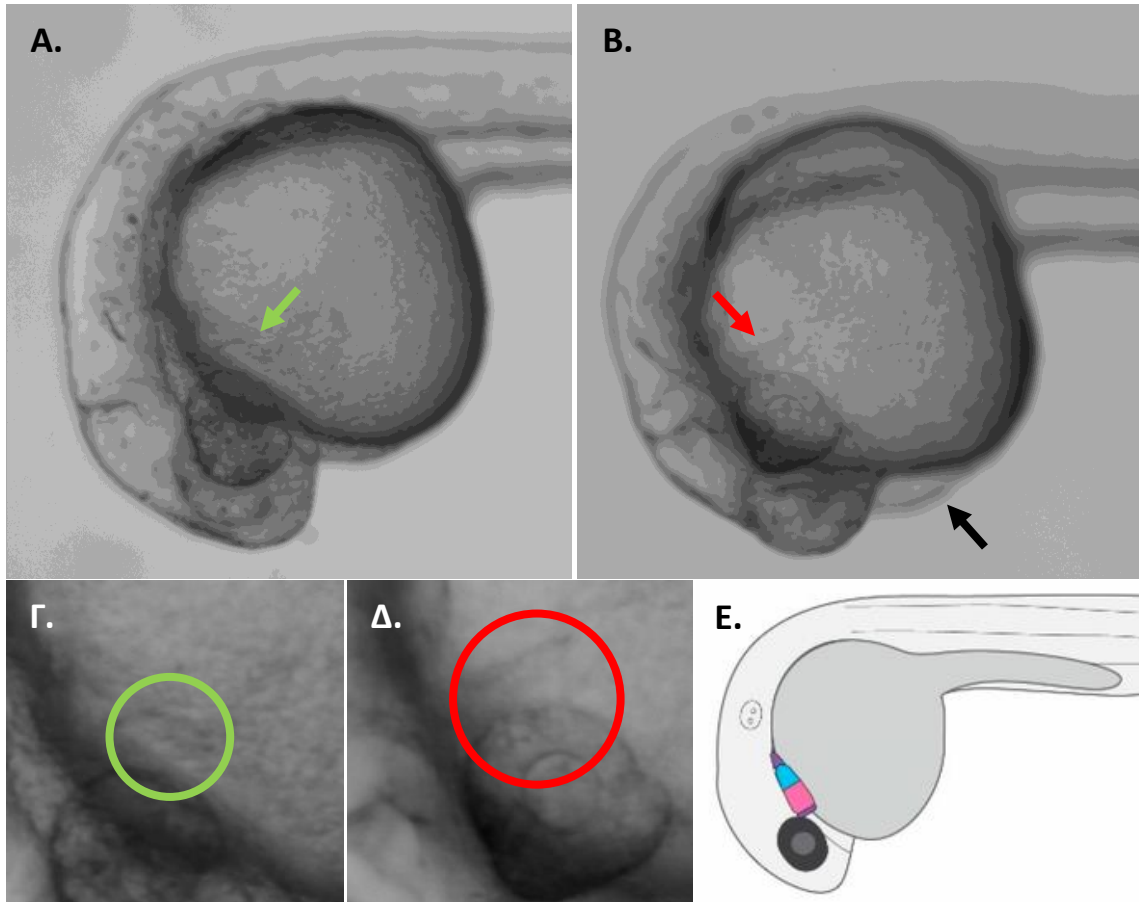
Κάθε δείγμα στέλνεται για αλληλούχηση στην εταιρεία MacroGen Europe (The Netherlands) με 10μL καθαρό DNA και 5pmol/μL από τον κατάλληλο εκκινητή.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Καρδιακός φαινότυπος της σειράς s274 στις 24 hpf

Στην εισαγωγή περιγράφηκαν τα κύρια χαρακτηριστικά του φαινοτύπου της μεταλλαγμένη σειράς s274. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα ομόζυγα έμβρυα για την μετάλλαξη s274 έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν ένα ήπιο περικαρδιακό οίδημα από τις 24 hpf, το οποίο οδηγεί σε παραμόρφωση της λεκίθου τοπικά. Παρόλα αυτά, το συγκεκριμένο φαινόμενο δεν είναι αυτό που χαρακτηρίζει την σειρά s274, καθώς εμφανίζεται και σε άλλες μεταλλαγμένες σειρές zebrafish. Αντιθέτως, την σειρά s274 χαρακτηρίζει η αποκόλληση του μυοκαρδίου από το ενδοκάρδιο, η οποία είναι παρατηρήσιμη από τις 48 hpf και πιο εμφανής από τις 72 hpf.

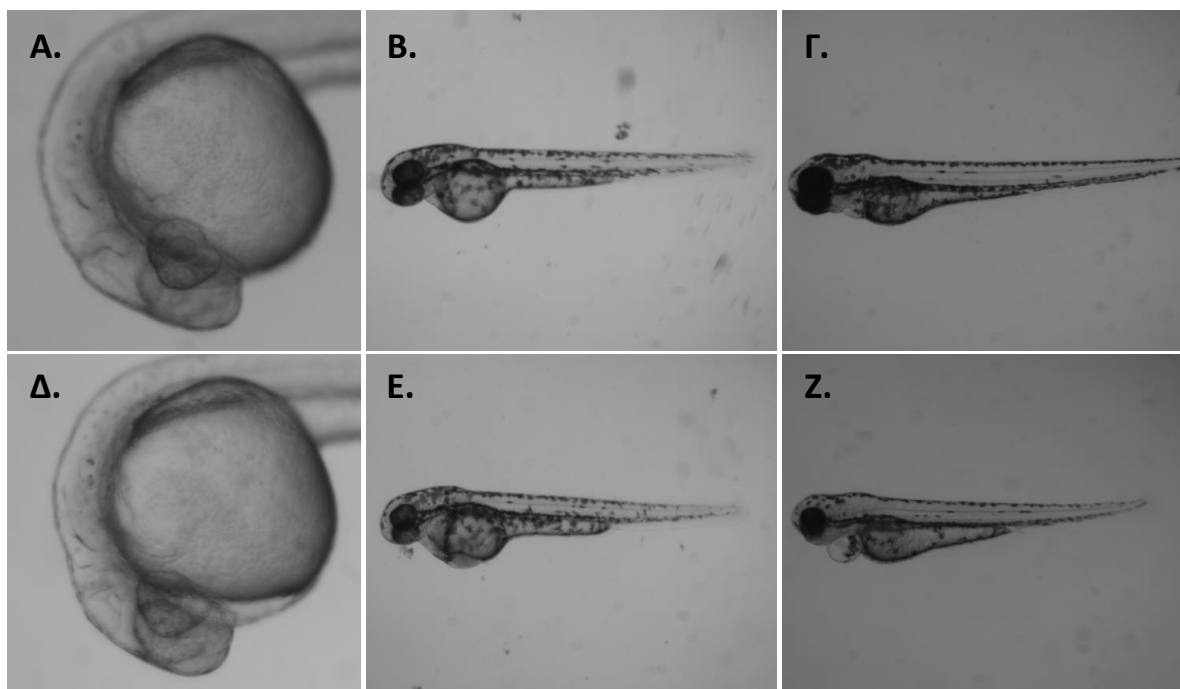
Κατόπιν παρατήρησης εμβρύων 24 hpf από διασταύρωση γνωστών ετεροζυγωτών s274, διαπιστώθηκε ότι περίπου 25% των εμβρύων δεν είχαν φυσιολογικό καρδιακό φαινότυπο: υπήρχε παρατηρήσιμη κίνηση των τοιχωμάτων του κόλπου, ο οποίος φαίνεται εξαιρετικά διευρυμένος. Δεν υπήρχε παρατηρήσιμη κίνηση των τοιχωμάτων της κοιλίας, η οποία φαινόταν να βρίσκεται σε μόνιμη συστολή. Η καρδιά αυτών των εμβρύων είχε σχήμα που θυμίζει δέλτα ποταμού ή το γράμμα Υ, με την ευρεία πλευρά του σχήματος στην θέση του κόλπου και την στενή στην θέση της κοιλίας. Αντιθέτως, στο υπόλοιπο 75% των εμβρύων, υπήρχε παρατηρήσιμος καρδιακός παλμός και ορατή αιματική ροή, ενώ κατά στιγμιότυπα η παλλόμενη καρδιά λάμβανε σχήμα που θυμίζει κλειψύδρα ή τον αριθμό 8. Φαίνεται λοιπόν πως το τοπικό περικαρδιακό οίδημα μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη λειτουργικότητας του καρδιακού σωλήνα με αποτέλεσμα την μη προώθηση αίματος σε αυτό το αναπτυξιακό στάδιο.



**Εικόνα 4.1: Καρδιακός φαινότυπος *s274* σε έμβρυα ηλικίας 24 hpf** (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 4x). Α) Φυσιολογικό έμβρυο Β) Μεταλλαγμένο έμβρυο, εμφανίζει μικρό περικαρδιακό οίδημα το οποίο συμπιέζει τη λέκιθο προς το εσωτερικό (μαύρο βέλος Γ) Τμήμα της εικόνας (Α). Εντός του πράσινου κύκλου διακρίνεται στιγμιότυπο φυσιολογικής καρδιάς Δ) Τμήμα της εικόνας (Β). Εντός του κόκκινου κύκλου διακρίνεται η μη φυσιολογική καρδιά με σχήμα Υ Ε) Σχεδιάγραμμα εμβρύου 24 hpf, με ροζ χρώμα είναι σχεδιασμένος ο κόλπος της καρδιάς ενώ με γαλάζιο η κοιλία. (Brown et al., 2016)

Στην συνέχεια, για επιβεβαιώσουμε ότι ο φαινότυπος που παρατηρήσαμε οφείλεται στην μετάλλαξη *s274*, απομονώσαμε τα έμβρυα σε multi-well plates, τοποθετώντας κάθε ένα έμβρυο σε ένα φρεάτιο. Φωτογραφήσαμε και περιγράψαμε τον καρδιακό φαινότυπο του κάθε εμβρύου στις 24 hpf, 48 hpf και 72 hpf. Διαπιστώσαμε πως το 100% των εμβρύων που στις 24 hpf είχε λειτουργικό καρδιακό σωλήνα στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια είχε φυσιολογικό φαινότυπο. Επιπλέον, το 100% των εμβρύων που στις 24 hpf παρουσίαζε τον μη φυσιολογικό

φαινότυπο που περιγράφηκε Αυτό το εύρημα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, καθώς αλλάζει τον τρόπο που αντιλαμβανόμαστε τον συγκεκριμένο φαινότυπο.



**Εικόνα 4.2:** Εξέλιξη του καρδιακού φαινότυπος *s274* που παρατηρείται στις 24 hpf A) (στερεοσκόπιο, μεγέθυνση 4x) Έμβρυο το οποίο παρουσιάζει φυσιολογική καρδιακή εικόνα και λειτουργία στις 24 hpf, έχει φυσιολογικό φαινότυπο στις 48 hpf (B) και στις 72 hpf (Γ). Αντιθέτως, έμβρυο το οποίο εμφανίζει μικρό περικαρδιακό οίδημα και καρδιά σε σχήμα Y η οποία δεν πάλλεται στις 24 hpf (Δ), αναπτύσσει τελικά τον χαρακτηριστικό φαινότυπο της σειράς *s274* στις 48 hpf (E) και 72 hpf (Z)

Το γεγονός ότι η σειρά *s274* παρουσιάζει παθολογικό φαινότυπο ήδη στις 24 hpf μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο στο οποίο βρίσκεται η μετάλλαξη *s274* πρέπει να εκφράζεται πριν τις 24 hpf, κατά συνέπεια μπορούμε να αποκλείσουμε όσα γονίδια δεν πληρούν αυτήν την προϋπόθεση από την λίστα υποψήφιων μεταλλάξεων. Αυτή η πληροφορία μπορεί να εξαχθεί από βάσεις δεδομένων όπως το *zfin*.

## 4.2 Βιβλιογραφική μελέτη και αξιολόγηση μεταλλάξεων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σύμφωνα με την ανάλυση MMAPPR που πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστήμιο της Γιούτα, είναι σχεδόν βέβαιο πως η μετάλλαξη υπεύθυνη για τον φαινότυπο της σειράς s274 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 του γονιδιώματος του zebrafish, με σημαντικά αυξημένη πιθανότητα αυτή να εντοπίζεται στην περιοχή 5 έως 6 Mb. Από την εν λόγω μελέτη προέκυψαν 206 υποψήφιες μεταλλάξεις στο χρωμόσωμα 12, εκ των οποίων οι 8 βρίσκονται στην περιοχή των 5-6 Mb.

Πίνακας 4.1: Οι πιθανές μεταλλάξεις της περιοχής 5-6 Mb του χρωμοσώματος 12

GeneModels:		GRCz10.genes				
Results are printed for each intersecting gene and include:						
1) The UCSC gene model (Name(s),Chrom,GeneStart,GeneStop,Strand,TSS)						
2) The intersecting Alleles (Start,End,Allele,Notes)						
3) Their relative location and potential effects.						
<b>ace (gene22605)</b>	ace (rna34612)	chr12	5495268	5547103	+	5495268
	5495579	5495580	T	Coverage:A:C:G:T = 8:0:0:0:8		
Coding exon 1						
Non-synonymous E > V						
	5523136	5523137	G	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:3:0		
Coding exon 12						
Non-synonymous I > V						
<b>itga3b (gene22606)</b>	itga3b (rna34613)	chr12	5552145	5628447	-	5628447
	5590976	5590977	C	Coverage:A:C:G:T = 11:0:11:0:0		
Coding exon 2						
Non-synonymous H > Q						
	5628200	5628201	A	Coverage:A:C:G:T = 9:8:0:0:1		
Coding exon 1						
Non-synonymous H > L						



<b>kat7b (gene22611)</b>	kat7b (rna34620)	chr12	5947748	5965280	-	5965280
	5960706	5960707	T	Coverage:A:C:G:T = 34:0:0:34		
Coding exon 4						
Non-synonymous P > T						
<b>aarsd1 (gene22615)</b>	aarsd1 (rna34627)	chr12	6015773	6029727	-	6029727
	6029156	6029157	A	Coverage:A:C:G:T = 2:2:0:0:0		
Coding exon 2						
Non-synonymous T > S						
<b>pcdh15b (gene22625)</b>	pcdh15b (rna34643)	chr12	6509287	6872271	-	6872271
	6691166	6691167	T	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:0:3		
Coding exon 14						
Non-synonymous S > N						
	6510402	6510403	C	Coverage:A:C:G:T = 2:0:2:0:0		
Coding exon 38						
Non-synonymous S > C						

Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, η γονοτυπική ανάλυση ετεροζυγωτών και ομοζυγωτών ατόμων για κάθε μια από τις συνολικά 206 μεταλλάξεις με σκοπό την αναγνώριση της υπεύθυνης, θα ήταν μια διαδικασία εξωφρενικά χρονοβόρα και κοστοβόρα. Για την διευκόλυνση λοιπόν του έργου μας, προβήκαμε σε αναζήτηση πληροφοριών από βάσεις δεδομένων για κάθε μια μετάλλαξη, με στόχο να αξιολογήσουμε ποιές από τις παραπάνω μεταλλάξεις είναι πιο πιθανό να είναι οι υπεύθυνες. Οι βάσεις δεδομένων και τα εργαλεία που χρησιμοποιήσαμε είναι τα εξής:

- ZFIN
- Ensembl
- NCBI BLAST
- UniProt
- InterPro

Παρακάτω παρουσιάζεται η βασική διαδικασία χαρακτηρισμού των μεταλλάξεων που χρησιμοποιήσαμε. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε για κάθε μια από τις 206 μεταλλάξεις. Σαν παράδειγμα χρησιμοποιούμε την πιθανή μετάλλαξη που εντοπίστηκε στο γονίδιο *col1a1b* (collagen, type I, alpha 1b):

Πίνακας 4.2: Μετάλλαξη στο γονίδιο *col1a1b*

GeneModels: GRCz10.genes					
Results are printed for each intersecting gene and include:					
1) The UCSC gene model (Name(s),Chrom,GeneStart,GeneStop,Strand,TSS)					
2) The intersecting Alleles (Start,End,Allele,Notes)					
3) Their relative location and potential effects.					
<b>col1a1b (gene22526)</b>	col1a1b (rna34484)	chr12	3060883	3098773	- 3098773
	3071951	3071952	A	Coverage:A:C:G:T = 320:303:0:17:0	
	Coding exon 42				
	Non-synonymous A > V				

Έχουμε διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την θέση (αρχή και τέλος) του γονιδίου στο χρωμόσωμα (πράσινο πλαίσιο) και την θέση της μετάλλαξης (κόκκινο πλαίσιο). Αυτές οι πληροφορίες αφορούν την GRCz10 εκδοχή (assembly) του γονιδιώματος του zebrafish. Επιπλέον, μας δίνεται η φύση της αμινοξικής αλλαγής (μαύρο πλαίσιο).

Αρχικά, θέλαμε να ξεχωρίσουμε τα γονίδια για τα οποία υπάρχουν διαθέσιμα δεδομένα σχετικά με το αναπτυξιακό στάδιο στο οποίο ξεκινάει η έκφρασή τους, αλλά και σε ποιούς ιστούς αυτή λαμβάνει χώρα. Γι' αυτό τον σκοπό χρησιμοποιήσαμε την βάση βιολογικών δεδομένων ZFIN (<https://zfin.org/>). Το ZFIN (The Zebrafish Information Network) είναι μία δευτερογενής βάση δεδομένων που διαθέτει «ελεγμένα» (curated) δεδομένα σχετικά με την βιολογική έρευνα στο zebrafish. Στο ZFIN υπάρχουν πληροφορίες διαθέσιμες για γνωστά γονίδια του zebrafish, όπως η θέση στο γονιδίωμα, η γονιδιακή έκφραση, γνωστές μεταλλάξεις, βιολογικός ρόλος, αλληλουχία κ.λπ., οι οποίες συνοδεύονται από εξωτερικές

παραπομπές σε άλλες βάσεις δεδομένων, π.χ. στην GenBank. Χρησιμοποιώντας την μηχανή αναζήτησης του ZFIN, μεταφερθήκαμε στην αντίστοιχη σελίδα του κάθε γονιδίου, στο παράδειγμά μας του *col1a1b*, για να βρούμε πληροφορίες σχετικά με το στάδιο έναρξης της γονιδιακής έκφρασης, τους ιστούς στους οποίους εκφράζεται καθώς και τις τεχνικές με τις οποίες εξάχθηκαν τα δεδομένα.

**Gene Name:** *collagen, type I, alpha 1b*  
**Gene Symbol:** *col1a1b*  
**Sequence Ontology ID :** SO:0000704  
**Previous Names:** *col1a3, alpha3(I) (1), fj59a10, hm:zeh0348, wu:fa95h05, wu:fd02a10, wu:fj59a10*  
**Location:** Chr: 12 [Mapping Details/Browsers](#)  
[Nomenclature History](#)

**GENE EXPRESSION** ➔

**All Expression Data:** 16 figures from 7 publications  
**Directly Submitted Expression Data:** 7 figures (11 images) from *Thisse et al., 2004* [MGC:77441]  
**Wild-type Stages, Structures:** Zygote:1-cell (0.0h-0.75h) to Adult (90d-730d, breeding adult)  
[dermis](#) [epidermis](#) [ligament fibroblast](#) [liver](#) [mvosentum](#) [osteoblast](#) [nectoral fin](#) [somite](#)

Curated Microarray	Publication	Data	Fish	Stage Range	Anatomy
	<a href="#">Wehner et al., 2017</a>	Fig. 4	WIK <input type="checkbox"/>	Day 4	trunk regenerating tissue <input type="checkbox"/>
<b>MUTATIONS AND ALLELES</b>	<a href="#">Yan et al., 2017</a>	Fig. 1	gz32Tg <input type="checkbox"/>	Adult	female organism hepatocyte <input type="checkbox"/>
	<a href="#">Gistelinc et al., 2016</a>	Fig. 4	AB <input type="checkbox"/>	Prim-5 to Day 4	epidermis <input type="checkbox"/> , ligament fibroblas
		Fig. S1	AB <input type="checkbox"/>	1-cell to Day 5	whole organism <input type="checkbox"/>
	<a href="#">Zhang et al., 2016</a>	Fig. 5	WT <input type="checkbox"/> kdr <sup>μm19/um19</sup> <input type="checkbox"/>	Day 5 to Day 6	liver <input type="checkbox"/>
		Fig. 2	WT <input type="checkbox"/>	Day 5 to Day 6	liver <input type="checkbox"/>
	<a href="#">Duran et al., 2015</a>	Fig. 3	AB <input type="checkbox"/>	64-cell to Days 7-13	whole organism <input type="checkbox"/>
		Fig. 5	AB <input type="checkbox"/>	Adult	caudal fin lepidotrichium <input type="checkbox"/>
	<a href="#">Li et al., 2011</a>	Fig. T2	WT <input type="checkbox"/>	Prim-5 to Adult	dermis <input type="checkbox"/>
	<a href="#">Thisse et al., 2004</a>	Fig. 1 Fig. 2 Fig. 3	AB/TU <input type="checkbox"/>	14-19 somites	somite <input type="checkbox"/>
		Fig. 4	AB/TU <input type="checkbox"/>	20-25 somites to Prim-5	epidermis <input type="checkbox"/>
		Fig. 5	AB/TU <input type="checkbox"/>	Prim-15 to Prim-25	epidermis <input type="checkbox"/>

**Εικόνα 4.3: Η βάση βιολογικών δεδομένων ZFIN.** Αφού μεταβούμε στην σελίδα που αφορά το γονίδιο *col1a1b*, έχουμε πρόσβαση σε πληροφορίες σχετικά με την γονιδιακή έκφραση (κόκκινο βέλος, πάνω εικόνα). Υπάρχει η δυνατότητα να επιλέξουμε την εμφάνιση των καταχωρημένων εικόνων από πειράματα ISH (κάτω εικόνα), οι οποίες συνοδεύονται από σχολιασμό σχετικά με το αναπτυξιακό στάδιο (πράσινα βέλη) και τον ιστό στον οποίο βρέθηκε γονιδιακή έκφραση (μαύρα βέλη) (<https://zfin.org/>)

Υπάρχει πληθώρα ISH (in situ hybridization) δεδομένων που δείχνουν πως η έκφραση του *col1a1b* ξεκινάει πολύ πριν τις 24 hpf (στάδιο Prim-5). Ενώ σε ωρύτερα στάδια το *col1a1b* εκφράζεται στους σωμαίτες, φαίνεται η έκφραση να περιορίζεται στα κύτταρα της επιδερμίδας από τις 19 hpf (στάδιο 20-25 somites) μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης. Με βάση αυτές τις πληροφορίες μπορούμε να συμπεράνουμε πως οι πιθανότητες η πρωτεΐνη *col1a1b* να παίζει δομικό ρόλο στην καρδιά του zebrafish και να σχετίζεται με τον παρατηρούμενο φαινότυπο, είναι μειωμένες.

Στην συνέχεια, χρησιμοποιήσαμε τον περιηγητή γονιδιωμάτων Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Επιλέξαμε την εκδοχή (assembly) GRCz10 του γονιδιώματος του zebrafish, καθώς με βάση αυτήν την εκδοχή έχει γίνει η ανάλυση των μεταλλάξεων. Στην συνέχεια, εντοπίζουμε την περιοχή της εκάστοτε μετάλλαξης, π.χ. για το γονίδιο *col1a1b* αυτή βρίσκεται γύρω από την θέση 3071952 του χρωμοσώματος 12. Το Ensembl μας δίνει άμεσα πληροφορίες για την θέση των εξονίων, καθώς και την κατεύθυνση προς την οποία το γονίδιο μεταγράφεται. Επιπλέον, μπορούμε να επιλέξουμε την εμφάνιση των πλαισίων ανάγνωσης και για τους δύο προσανατολισμούς μεταγραφής. Συνήθως είναι εύκολο να προσδιοριστεί ποιο είναι το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης, απορρίπτοντας όσα εμφανίζουν κωδικόνια λήξης μέσα σε εξόνια ή εντοπίζοντας το αμινοξύ που έχει υποστεί αλλαγή, π.χ. στην περίπτωση του *col1a1b*, η μετάλλαξη οδηγεί σε αλλαγή του αμινοξέως αλανίνη σε βαλίνη, και μόνο σε ένα πλαίσιο ανάγνωσης που περιλαμβάνει την συγκεκριμένη βάση εμφανίζεται το αμινοξύ αλανίνη.

The image shows the Ensembl genome browser interface for Zebrafish. The top panel displays 'Chromosome 12: 3,071,912-3,071,995'. The middle panel shows 'Region in detail' with a genomic track and gene models. The bottom panel shows a zoomed-in view of the DNA sequence and translated protein sequence. A red box highlights a mutation from AGC to AAC in the DNA sequence, and a red arrow points to the corresponding amino acid change in the protein sequence.

**Εικόνα 4.4: Ο περιηγητής γονιδιωμάτων Ensembl.** Αφού επιλέξουμε την περιοχή που μας ενδιαφέρει, εντοπίζουμε την θέση της μετάλλαξης (AGC>AAC, κόκκινο πλαίσιο) και το πλαίσιο ανάγνωσης της μετάφρασης (κόκκινο βέλος) (<https://www.ensembl.org/index.html>)

Χρησιμοποιώντας το εργαλείο αναζήτησης BLAST του NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) για πρωτεϊνικές αλληλουχίες (blastp suite), μπορούμε να επιβεβαιώσουμε ότι έχουμε βρει το σωστό πλαίσιο ανάγνωσης αλλά και να εντοπίσουμε την θέση της αμινοξικής αλλαγής στο τελικό πρωτεϊνικό προϊόν, καθώς, εφόσον το πλαίσιο ανάγνωσης είναι σωστό, αναζητώντας (κάνοντας “blast”) ένα αρκετά μεγάλο τμήμα αμινοξικής αλληλουχίας (περίπου 20 αμινοξέα)

NIH U.S. National Library of Medicine NCBI National Center for Biotechnology Information

**BLAST** » blastp suite

Standard Protein BLAST

blastn blastp **blastx** tblastn tblastx

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#) Query subrange  From  To

Or, upload file  Browse...

Job Title unname protein product  
Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

Choose Search Set

Database Non-redundant protein sequences

Organism Optional Danio rerio (taxid: 7896) Enter organism code

Exclude Optional  Models (XM/XL)

Entrez Query Optional  Enter an Entrez query

Program Selection

Algorithm

Quick BLAST

blastp (protein)

PSI-BLAST (F)

PHI-BLAST (F)

DELTA-BLAST

Choose a BLAST program

Search databases  Show results in

**Alignments**

[Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#) Sort by: E value

collagen, type I, alpha 1b precursor [Danio rerio]  
Sequence ID: [NP\\_958886.1](#) Length: 1449 Number of Matches: 80  
[▶ See 1 more title\(s\)](#)

Range 1: 1057 to 1074 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
53.7 bits(119)	3e-10	18/18(100%)	18/18(100%)	0/18(0%)

Query 1 GPAGPAGPSGPGAGARGAL 18  
GPAGPAGPSGPGAGARGAL

Sbjct 1057 GPAGPAGPSGPGAGARGAL 1074

Range 2: 838 to 853 [GenPept](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#) [▲ First Match](#)

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
31.6 bits(67)	0.017	12/16(75%)	12/16(75%)	0/16(0%)

Query 1 GPAGPAGPSGPGAGARG 16  
GP GPAG GP GARG

Sbjct 838 GPQGPAGATGPKGARG 853

**Εικόνα 4.5: Εργαλείο αναζήτησης BLAST για πρωτεϊνικές αλληλουχίες.** Εισάγοντας στο πλαίσιο αναζήτησης μια αλληλουχία μήκους περίπου 20 αμινοξέων, γίνεται εντοπισμός των πρωτεϊνών με αλληλουχίες που εμφανίζουν σημαντική ομοιότητα, καθώς και συγκεκριμένα ποιές περιοχές τους παρουσιάζουν ταύτιση (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Όπως βλέπουμε στην παραπάνω εικόνα, Η αλληλουχία της πρωτεΐνης “collagen, type I, alpha 1b precursor”, η οποία είναι το προϊόν έκφρασης του γονιδίου *col1a1b*, εμφανίζει 100% ταύτιση στην περιοχή 1057-1074, με το αμινοξικό κατάλοιπο αλανίνης που μας ενδιαφέρει να αντιστοιχεί στην θέση 1070 της πρωτεϊνικής αλληλουχίας. Επίσης, υπάρχει ένας διαθέσιμος υπερσύνδεσμος για κάθε πρωτεΐνη, που οδηγεί στην αντίστοιχη καταχώρηση της βάση δεδομένων του

NCBI για πρωτεϊνικές αλληλουχίες (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>). Σε αυτήν την σελίδα είναι διαθέσιμη ολόκληρη η αλληλουχία της πρωτεΐνης αλλά και κάποιοι εξωτερικοί σύνδεσμοι σχετικά με το γονίδιο.

### collagen, type I, alpha 1b precursor [Danio rerio]

NCBI Reference Sequence: NP\_958886.1

[Identical Proteins](#) [FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS      NP_958886                1449 aa                linear       VRT 10-JUN-2018
DEFINITION collagen, type I, alpha 1b precursor [Danio rerio].
ACCESSION  NP_958886
VERSION    NP_958886.1
DBSOURCE   REFSEQ: accession NM 201478.  ORIGIN
KEYWORDS   RefSeq.
SOURCE     Danio rerio (zebrafish)
ORGANISM   Danio rerio
            Eukaryota; Metazoa; Chordata
            Actinopterygii; Neopterygii;
            Cypriniformes; Cyprinidae; D
REFERENCE  1 (residues 1 to 1449)
AUTHORS    Henke K, Daane JM, Hawkins M
            Stemple DL and Harris MP.
TITLE      Genetic Screen for Postembry
            (Danio rerio): Dominant Muta
            Genetics 207 (2), 609-623 (2
            PUBMED 28835471
REFERENCE  2 (residues 1 to 1449)
AUTHORS    Wehner D, Tsarouchas TM, Mic
            MM, Becker T and Becker CG.
TITLE      Wnt signaling controls pro-r
            spinal cord regeneration in
            Nat Commun 8 (1), 126 (2017)
            PUBMED 28743881
REMARK     Publication Status: Online-0
REFERENCE  3 (residues 1 to 1449)
AUTHORS    Yan C, Yang Q and Gong Z.
TITLE      Tumor-Associated Neutrophils
            Disparity in Hepatocellular
            Cancer Res. 77 (6), 1395-140
            PUBMED 28202512
REFERENCE  4 (residues 1 to 1449)
AUTHORS    Chen WC, Wang Z, Missinato M
            Yates NA, Kim K and Wang Y.
TITLE      Decellularized zebrafish car
            mammalian heart regeneration
1 mfsfvdirlg 1llaavnlav rgqgeddisf gactlegqny ndkdvkpep cqicvcdsqt
61 vmcdevised tsdcanpeip dgecpcicpd eevtaapepp yvdtvppagp rgdpprvppp
121 grdgtppeng lpgpppppgt sglgggsfls qmaygseksa gpprprrppp mgprglpppa
181 gspgppqgftg pppgppgppa pppmgsrppp gppgkngedg eagkagrpge rgaagppgar
241 gfpgrtpplg ikghrgfppl dgakgdagia gpkgeagspp eagtrpamga rglpgergrp
301 gppgppsgarg ndgntgaapp pgrtppagpp gfpggagakg etgaaggrgs egrqgpprgep
361 gnpppagaag pagppgsdgt pggkgsppaa giagapgfpp argppppagp ngapppkgnn
421 gdpplqppkg dagpkgeppp vppqglagna geegkrparg epgaagrvpp pgaragppnr
481 glpgsdgapp plgappperga nppmgaqgas gesgrppgpp lpgskmtga pgspppdgka
541 spsgappqdg rppppppags rgapgvmgfp gpkgtdegss kppgerglagp tgpilgppkd
601 gdiagsppagp pagppagekge qgsagppsfq glpqaqgatg etgkppgeqlp pgeagppgs
661 gprgrdrgfpp ergapppppp tpprppgppp gndgakppgp aaganggvpp agmqqpppger
721 gaggpppgarg drgdgppkpp dgapgkdvvr gmtgpppppp psgapgdkge pgevpppplt
781 gprgpppgerg evgapppagf appppppppp gakgetgdsg pkgdagappp agppvasppp
841 gpagatppkg arggappppa tgfppgaagr ppppppsagp pppppppagk egrgarggek
901 gpagrppgeag aagpppppge rpsppppdpl glagappppp vigsrgivgl ppprgergfg
961 glapppppppp kppppppvge rppppppppp glspapgeag regnppghdv sgrdpppppk
1021 gdrgeagngg pppgppppga pppppppgkt gdrgeagppg pagpppppaga rgalpppppr
1081 gdrgeageag ergmkghrgl sgppppppppp gtsgeqppag atppppppppp agsngppkd
1141 gmmgvppppv ppppppprsgp mppppppppp pppppppppp pppppppppp pppppppppp
1201 gyrraddasvr drdsevdtsl kslsqkieni rppppppppp armordlrnc hpewksgsyw
1261 vdrnggspld aikvfncmet getcvspyhs diprknwys knirekknwv fgesppppffq
1321 fqygsdgsdp edvniqltfm rlmnnggspn ityhcknsia ymdetsgnlk kalllqgsnd
1381 ieiraegnsr ftyrvsedgc tshtgtwgtk vidyktkts rlpdiidiamp digapdqefg
1441 vevgppvcfl
//

```

**Εικόνα 4.6:** Καταχώρηση της πρωτεΐνης “collagen, type I, alpha 1b precursor” στην βάση δεδομένων του NCBI για πρωτεϊνικές αλληλουχίες ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_958886.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_958886.1)).

Στην συνέχεια χρησιμοποιήσαμε την βάση βιολογικών δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>) με την οποία μπορέσαμε να συλλέξουμε πληροφορίες για την κάθε πρωτεΐνη. Συγκεκριμένα, για κάθε πρωτεΐνη που έχει καταχωρηθεί στην UniProt, υπάρχουν πληροφορίες για τον βιολογικό ρόλο, την θέση της πρωτεΐνης στο κύτταρο ή τον εξωκυττάριο χώρο, τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, τις αλληλεπιδράσεις με άλλα μόρια κ.λπ. Οι πληροφορίες αυτές συνοδεύονται από πληθώρα εξωτερικών συνδέσμων σε άλλες βάσεις δεδομένων.

UniProtKB

From June 20, 2018 all traffic will be automatically redirected to HTTPS. [More information or vi](#)

## UniProtKB - F1QDL1 (F1QDL1\_DANRE)

Display

Entry

Publications

Feature viewer

Feature table

Function

Names & Taxonomy

Subcellular location

Pathology & Biotech

PTM / Processing

Expression

Interaction

Structure

BLAST | Align | Format | Add to basket | History

Protein Submitted name: **Collagen, type I, alpha 1b**

Gene **col1a1b**

Organism *Danio rerio (Zebrafish) (Brachydanio rerio)*

Status Unreviewed - Annotation score: ●○○○○ - Experimental evidence at protein level<sup>1</sup>

### Function<sup>1</sup>

**GO - Molecular function<sup>1</sup>**

- extracellular matrix structural constituent [Source: InterPro](#)

[View the complete GO annotation on QuickGO ...](#)

**Enzyme and pathway databases**

Reactome<sup>1</sup>

- R-DRE-114604 GPVI-mediated activation cascade
- R-DRE-1442490 Collagen degradation
- R-DRE-1474244 Extracellular matrix organization
- R-DRE-1650814 Collagen biosynthesis and modifying enzymes
- R-DRE-2022000 Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures

Εικόνα 4.7: Η βάση βιολογικών δεδομένων UniProt (<https://www.uniprot.org/>)

Μία πληροφορία που εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την μελέτη μας, είναι κατά πόσον υπάρχουν γνωστές λειτουργικές περιοχές (domains) της πρωτεΐνης στο σημείο της αμινοξικής αλλαγής. Για την παρουσία domains στην περιοχή της μετάλλαξης συμβουλευτήκαμε επιπλέον την βάση βιολογικών δεδομένων InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)



**InterPro**  
Protein sequence analysis & classification

Search InterPro...  
Examples: IPR020405, kinase, P51587, PF02932, GO:0007165

Home Search Release notes Download About InterPro Help Contact

**Collagen, type I, alpha 1b (F1QDL1)** [Export TSV] [Export FASTA]

**Accession** F1QDL1 (F1QDL1\_DANRE)  
**Species** Danio rerio (Zebrafish)  
**Length** 1,449 amino acids (complete)

Source: UniProtKB

**Overview**  
Similar proteins (609)  
Structures

**Filter view on**

**Entry type**

- Homologous superfamily
- Family
- Domains
- Repeats
- Site

**Status**

- Unintegrated

**Per-residue features**

- Residue annotation

**Protein family membership**  
None predicted.

**Homologous superfamilies**  
None predicted.

**Domains and repeats**

1 200 400 600 800 1000 1200 1449

► Domain  
► Repeat

**Detailed signature matches**

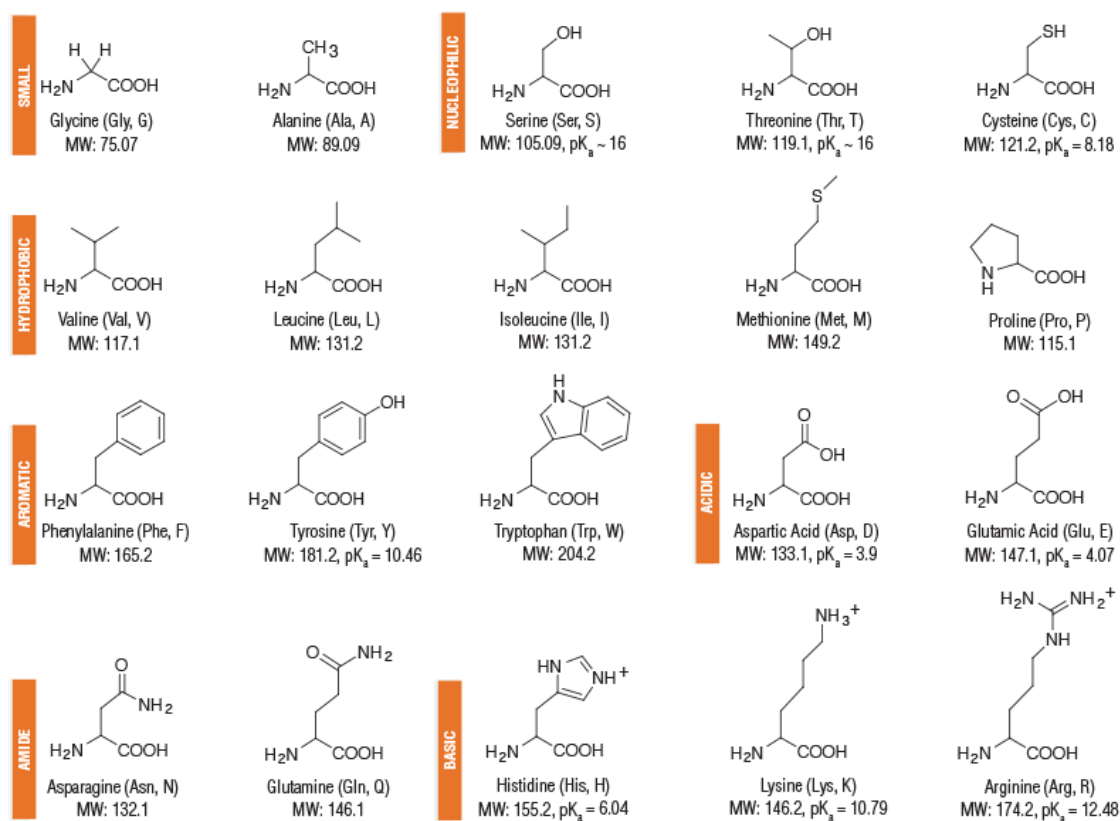
- IPR001007 VWFC domain
- PF00093 (vwc)

**Εικόνα 4.8:** Η βάση βιολογικών δεδομένων InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

Επίσης, μια πληροφορία που ήδη είχαμε διαθέσιμη και μας βοηθά να αξιολογήσουμε τις πιθανές μεταλλάξεις, είναι ο τύπος αμινοξικής αλλαγής που προκύπτει. Όπως είναι γνωστό, κάποια από τα πρωτεϊνοσυνθετικά αμινοξέα έχουν παραπλήσια δομή και χημικές ιδιότητες, π.χ. η λευκίνη και η ισολευκίνη είναι δύο υδρόφοβα αμινοξέα που διαφέρουν μόνο ως προς την θέση μιας μεθυλομάδας. Είναι λογικό λοιπόν να υποθέσουμε πως η υποκατάσταση ενός αμινοξικού καταλοίπου λευκίνης από ένα κατάλοιπο ισολευκίνης θα είχε πολύ περιορισμένη επίδραση στην δομή και τις λειτουργίες μια πρωτεΐνης. Αντιθέτως, άλλα αμινοξέα έχουν πολύ διαφορετικές ιδιότητες, π.χ. η υποκατάσταση ενός καταλοίπου σερίνης, η οποία έχει μια μικρή υδρόφιλη πλευρική αλυσίδα, από ένα ογκώδες και υδρόφοβο κατάλοιπο φαινυλαλάνινης θα ήταν πιο πιθανό να οδηγήσει σε δομική αλλοίωση της πρωτεΐνης και να επηρεάσει την λειτουργικότητά της.

Στο παράδειγμα του *col1a1b*, προκύπτει πως η θέση της μετάλλαξης λαμβάνει χώρα σε ένα μια περιοχή της πρωτεΐνης που αποτελείται από επαναλήψεις γνωστές ως “collagen triple helix repeats”. Οι περιοχές αυτές αποτελούνται κυρίως από το αμινοξικό μοτίβο G-X-Y, όπου το G είναι γλυκίνη και τα

Χ και Υ μπορούν να είναι οποιαδήποτε αμινοξέα, με πιό συνηθισμένα την προλίνη και την υδροξυπρολίνη. Η αμινοξική αλλαγή από αλανίνη σε βαλίνη, τα οποία είναι δύο μικρά υδρόφοβα αμινοξέα, λαμβάνει χώρα στην μη-συντηρημένη θέση «Χ». Φαίνεται λοιπόν πως είναι πολύ μειωμένες οι πιθανότητες αυτή η αλλαγή να αποτελεί την μεταλλαγή που οδηγεί στην εμφάνιση του παθολογικού φαινοτύπου.



**Εικόνα 4.9: Δομές των πρωτεϊνοσυνθετικών αμινοξέων** (<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/amino-acid-structures>)

Συνοψίζοντας, με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω εξάχθηκαν πληροφορίες σχετικά με το αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο ξεκινά η γονιδιακή έκφραση του κάθε γονιδίου, καθώς και σε ποιούς ιστούς αυτή λαμβάνει χώρα, την θέση του αμινοξέως που υφίσταται την αλλαγή και το κατά πόσο σε αυτή βρίσκεται σε περιοχή της πρωτεΐνης με γνωστή λειτουργία.

Πραγματοποιήθηκε επιπλέον βιβλιογραφική μελέτη σχετικά με την λειτουργία των πρωτεϊνών που εκφράζονται από τα γονίδια καθώς και με την

εμπλοκή τους σε άλλες γνωστές ασθένειες, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση του τρόπου με τον οποίο θα μπορούσε δυνητικά μια από τις μεταλλάξεις να οδηγεί στον παρατηρούμενο φαινότυπο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην εισαγωγή, το κύριο χαρακτηριστικό του s274 φαινοτύπου είναι η αποκόλληση του μυοκαρδίου από το ενδοκάρδιο. Κατά συνέπεια, πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε διεργασίες που αφορούν είτε α) το καρδιαγγειακό σύστημα και την ρύθμιση της αιμοδυναμικής, είτε β) την διακυτταρική επικοινωνία και προσκόλληση, είναι εξαιρετικά ενδιαφέρουσες ως υποψήφιοι φορείς της μετάλλαξης, καθώς μπορούμε εύκολα να ερμηνεύσουμε τον παρατηρούμενο φαινότυπο ως αποτέλεσμα των εν λόγω μεταλλάξεων.

Τέλος, μία ακόμη πληροφορία που μας παρέχεται προς αξιολόγηση είναι ο βαθμός στον οποίο οι μεταλλαγμένες και φυσιολογικές αλληλουχίες φαίνεται να είναι καλά διαχωρισμένες μεταξύ των ομάδων μεταλλαγμένων και φυσιολογικών εμβρύων που στάλθηκαν για ανάλυση αντίστοιχα (phenotype-genotype cosegregation). Όπως είναι εύκολα αντιληπτό, εάν εκτός από την «μεταλλαγμένη» εντοπίστηκε και η φυσιολογική αλληλουχία στην ομάδα των μεταλλαγμένων εμβρύων, αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως είναι πολύ πιθανό είναι εν λόγω αλλαγή να αποτελεί απλό πολυμορφισμό.

Με βάση όλες τις παραπάνω πληροφορίες, σχηματίσαμε μια ανανεωμένη λίστα με τις πιο πιθανές μεταλλάξεις. Τα κριτήρια με τα οποία μια μετάλλαξη θεωρήθηκε ότι έχει αυξημένες πιθανότητες, κατά φθίνουσα σειρά της βαρύτητάς τους, είναι τα εξής:

1. Να είναι γνωστό ότι το γονίδιο στο οποίο βρίσκεται η μετάλλαξη εκφράζεται πριν τις 24 hpf
2. Η μετάλλαξη να βρίσκεται μέσα ή κοντά στην περιοχή που κορυφώνεται η πιθανότητα εύρεσής της σύμφωνα με την MMAPPR ανάλυση (5-6Mb του χρωμοσώματος 12)
3. Η πρωτεΐνη που εκφράζει το γονίδιο να σχετίζεται με το καρδιαγγειακό σύστημα ή να παίζει ρόλο στην διακυτταρική σύνδεση και σηματοδότηση

4. Η μετάλλαξη να βρίσκεται σε γνωστή υπομονάδα (ειδικά εάν αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλά συντηρημένη αλληλουχία)
5. Η αμινοξική αλλαγή που λαμβάνει χώρα να μην οδηγεί σε υποκατάσταση καταλοίπων με μικρές διαφορές στις πλευρικές αλυσίδες

Πίνακας 4.3: Μεταλλάξεις με αυξημένη πιθανότητα να σχετίζονται με τον φαινότυπο *s274*

<b>GeneModels:</b>	<b>GRCz10.genes</b>					
<b>Alleles:</b>	putativesnps.txt					
<b>Results are printed for each intersecting gene and include:</b>						
<b>1) The UCSC gene model</b>						
<b>(Name(s),Chrom,GeneStart,GeneStop,Strand,TSS)</b>						
<b>2) The intersecting Alleles (Start,End,Allele,Notes)</b>						
<b>3) Their relative location and potential effects.</b>						
<b>itga3b (gene22606)</b>	itga3b (rna34613)	chr12	5552145	5628447	-	5628447
		5590976	5590977	C	Coverage:A:C:G:T = 11:0:11:0:0	
		Coding exon 2				
		Non-synonymous H > Q				
		5628200	5628201	A	Coverage:A:C:G:T = 9:8:0:0:1	
		Coding exon 1				
		Non-synonymous H > L				
<b>ace (gene22605)</b>	ace (rna34612)	chr12	5495268	5547103	+	5495268
		5495579	5495580	T	Coverage:A:C:G:T = 8:0:0:0:8	
		Coding exon 1				
		Non-synonymous E > V				
		5523136	5523137	G	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:3:0	
		Coding exon 12				
		Non-synonymous I > V				
<b>kat7b (gene22611)</b>	kat7b (rna34620)	chr12	5947748	5965280	-	5965280
		5960706	5960707	T	Coverage:A:C:G:T = 34:0:0:0:34	
		Coding exon 4				
		Non-synonymous P > T				

<b>pcdh15b (gene22625)</b>	pcdh15b (rna34643)	chr12	6509287	6872271	-	6872271
	6691166	6691167	T	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:0:3		
	Coding exon 14					
	Non-synonymous S > N					
<b>pcdh15b (gene22625)</b>	pcdh15b (rna34642)	chr12	6509287	6872271	-	6872271
	6510402	6510403	C	Coverage:A:C:G:T = 2:0:2:0:0		
	Coding exon 38					
	Non-synonymous S > C					
<b>prdm9 (gene22667)</b>	prdm9 (rna34736)	chr12	9743680	9752621	-	9752621
	9744722	9744723	C	Coverage:A:C:G:T = 9:0:7:2:0		
	Coding exon 6					
	Non-synonymous D > E					
	9744912	9744913	A	Coverage:A:C:G:T = 12:10:0:2:0		
	Coding exon 6					
	Non-synonymous S > F					
	9744940	9744941	C	Coverage:A:C:G:T = 9:0:9:0:0		
	Coding exon 6					
	Non-synonymous I > V					
	9745012	9745013	A	Coverage:A:C:G:T = 14:12:2:0:0		
	Coding exon 6					
	Non-synonymous A > S					
	9748705	9748706	T	Coverage:A:C:G:T = 4:0:0:0:4		
	Coding exon 5					
	Non-synonymous L > I					
	9751447	9751448	G	Coverage:A:C:G:T = 11:1:0:10:0		
	Coding exon 3					
	Non-synonymous I > T					
	9751507	9751508	T	Coverage:A:C:G:T = 2:0:0:0:2		
	Coding exon 3					
	Non-synonymous G > D					
	9752073	9752074	A	Coverage:A:C:G:T = 4:4:0:0:0		
	Coding exon 2					
	Non-synonymous E > V					
	9752499	9752500	A	Coverage:A:C:G:T = 10:10:0:0:0		
	Coding exon 1					
	Non-synonymous S > C					
<b>mmp25b (gene22565)</b>	LOC100333601 (rna34541)	chr12	4223926	4241852	+	4223926
	4230485	4230486	A	Coverage:A:C:G:T = 8:8:0:0:0		

Coding exon 4						
Non-synonymous V > I						
<b>hrc (gene22571)</b>	LOC553296 (rna34552)	chr12	4340639	4352059	-	4352059
	4351069	4351070	A	Coverage:A:C:G:T = 44:42:0:2:0		
Coding exon 1						
Non-synonymous A > V						
	4351120	4351121	T	Coverage:A:C:G:T = 55:0:1:0:54		
Coding exon 1						
Non-synonymous G > E						
	4351205	4351206	T	Coverage:A:C:G:T = 33:0:0:0:33		
Coding exon 1						
Non-synonymous E > K						
	4351399	4351400	G	Coverage:A:C:G:T = 32:0:0:30:2		
Coding exon 1						
Non-synonymous E > A						
	4351579	4351580	T	Coverage:A:C:G:T = 59:0:0:0:59		
Coding exon 1						
Non-synonymous G > D						
	4351744	4351745	C	Coverage:A:C:G:T = 62:0:60:0:2		
Coding exon 1						
Non-synonymous Q > R						
	4351794	4351795	A	Coverage:A:C:G:T = 20:16:4:0:0		
Coding exon 1						
Non-synonymous L > F						
<b>heatr1 (gene22665)</b>	heatr1 (rna34734)	chr12	9582065	9662762	-	9662762
	9620324	9620325	T	Coverage:A:C:G:T = 5:0:0:0:5		
Coding exon 23						
Non-synonymous S > N						
	9644321	9644322	T	Coverage:A:C:G:T = 5:1:0:0:4		
Coding exon 10						
Non-synonymous N > K						
<b>aldoab (gene22555)</b>	aldoab (rna34527)	chr12	4015414	4033068	-	4033068
	4020283	4020284	G	Coverage:A:C:G:T = 1446:0:0:1358:88		
Coding exon 6						
Non-synonymous K > Q						
<b>mapk7 (gene22562)</b>	mapk7 (rna34537)	chr12	4185991	4202082	+	4185991
	4190232	4190233	A	Coverage:A:C:G:T = 8:8:0:0:0		
Coding exon 4						

				Non-synonymous T > K			
	4190640	4190641	C	Coverage:A:C:G:T = 11:1:10:0:0			
				Coding exon 4			
				Non-synonymous N > T			
	4190649	4190650	T	Coverage:A:C:G:T = 14:0:1:0:13			
				Coding exon 4			
				Non-synonymous A > V			
	4190711	4190712	A	Coverage:A:C:G:T = 17:17:0:0:0			
				Coding exon 4			
				Non-synonymous S > T			
	4190729	4190730	A	Coverage:A:C:G:T = 16:16:0:0:0			
				Coding exon 4			
				Non-synonymous V > M			
	4195014	4195015	C	Coverage:A:C:G:T = 9:0:9:0:0			
				Coding exon 5			
				Non-synonymous I > T			
	4195136	4195137	G	Coverage:A:C:G:T = 10:0:0:10:0			
				Coding exon 5			
				Non-synonymous K > E			
	4195289	4195290	C	Coverage:A:C:G:T = 14:0:14:0:0			
				Coding exon 5			
				Non-synonymous V > L			
<b>ca15a (gene22569)</b>	ca15a (rna34550)	chr12		4283518	4294458	-	4294458
	4292599	4292600	A	Coverage:A:C:G:T = 8:7:0:1:0			
				Coding exon 4			
				Non-synonymous T > I			
	4294094	4294095	A	Coverage:A:C:G:T = 16:15:0:1:0			
				Coding exon 3			
				Non-synonymous S > L			
<b>med24 (gene22692)</b>	med24 (rna34783)	chr12		10605385	10636604	-	10636604
	10613373	10613374	A	Coverage:A:C:G:T = 19:16:0:0:3			
				Coding exon 21 splice site			
				Synonymous			
	10632484	10632485	T	Coverage:A:C:G:T = 5:0:0:0:5			
				Coding exon 7			
				Non-synonymous T > N			
	10634027	10634028	G	Coverage:A:C:G:T = 32:0:5:27:0			
				Coding exon 4			

Non-synonymous S > T						
<b>top2a (gene22694)</b>	top2a (rna34790)	chr12	10668468	10701717	+	10668468
	10687555	10687556	T	Coverage:A:C:G:T = 131:0:30:0:101		
	Coding exon 23					
Non-synonymous P > S						
	10694731	10694732	A	Coverage:A:C:G:T = 96:79:0:17:0		
	Coding exon 29					
Non-synonymous D > N						
	10695160	10695161	T	Coverage:A:C:G:T = 72:0:6:0:66		
	Coding exon 30					
Non-synonymous H > Y						
	10695190	10695191	A	Coverage:A:C:G:T = 44:39:5:0:0		
	Coding exon 30					
Non-synonymous L > M						
	10695924	10695925	T	Coverage:A:C:G:T = 84:0:12:0:72		
	Coding exon 31					
Non-synonymous R > C						
	10695994	10695995	C	Coverage:A:C:G:T = 91:14:77:0:0		
	Coding exon 31					
Non-synonymous N > T						
	10696008	10696009	T	Coverage:A:C:G:T = 71:0:0:13:58		
	Coding exon 31					
Non-synonymous D > Y						
	10697444	10697445	C	Coverage:A:C:G:T = 105:0:87:0:18		
	Coding exon 33					
Non-synonymous C > R						
<b>top2a (gene22694)</b>	top2a (rna34791)	chr12	10668672	10701633	+	10668672
	10695994	10695995	C	Coverage:A:C:G:T = 91:14:77:0:0		
	Coding exon 31					
Non-synonymous T > P						
	10696007	10696008	C	Coverage:A:C:G:T = 70:0:58:0:12		
	Coding exon 31					
Non-synonymous V > A						



### 4.3 Γονοτυπική ανάλυση πιθανών μεταλλάξεων

#### 4.3.1 Γενικά

Πραγματοποιήσαμε πειράματα γονοτυπικής ανάλυσης για 7 μεταλλάξεις που βρίσκονται σε 4 διαφορετικά γονίδια. Τα γονίδια αυτά είναι τα:

- *ace* (angiotensin-converting enzyme)
- *itga3b* (integrin alpha-3b)
- *kat7b* (lysine acetyltransferase 7b)
- *pcdh15b* (protocadherin related 15b)

Οι μεταλλάξεις που μελετήσαμε είναι οι εξής:

Πίνακας 4.4: Οι μεταλλάξεις για τις οποίες πραγματοποιήθηκε γονοτυπική ανάλυση

GeneModels:	GRCz10.genes					
Results are printed for each intersecting gene and include:						
1) The UCSC gene model (Name(s),Chrom,GeneStart,GeneStop,Strand,TSS)						
2) The intersecting Alleles (Start,End,Allele,Notes)						
3) Their relative location and potential effects.						
<b>ace (gene22605)</b>	ace (rna34612)	chr12	5495268	5547103	+	5495268
	5495579	5495580	T	Coverage:A:C:G:T = 8:0:0:0:8		
Coding exon 1						
Non-synonymous E > V						
	5523136	5523137	G	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:3:0		
Coding exon 12						
Non-synonymous I > V						
<b>itga3b (gene22606)</b>	itga3b (rna34613)	chr12	5552145	5628447	-	5628447
	5590976	5590977	C	Coverage:A:C:G:T = 11:0:11:0:0		
Coding exon 2						
Non-synonymous H > Q						
	5628200	5628201	A	Coverage:A:C:G:T = 9:8:0:0:1		

Coding exon 1						
Non-synonymous H > L						
<b>kat7b (gene22611)</b>	kat7b (rna34620)	chr12	5947748	5965280	-	5965280
	5960706	5960707	T	Coverage:A:C:G:T = 34:0:0:34		
Coding exon 4						
Non-synonymous P > T						
<b>pcdh15b (gene22625)</b>	pcdh15b (rna34643)	chr12	6509287	6872271	-	6872271
	6691166	6691167	T	Coverage:A:C:G:T = 3:0:0:3		
Coding exon 14						
Non-synonymous S > N						
	6510402	6510403	C	Coverage:A:C:G:T = 2:0:2:0:0		
Coding exon 38						
Non-synonymous S > C						

Επικεντρωθήκαμε σε αυτά τα γονίδια για τους εξής λόγους:

- βρίσκονται στην περιοχή 5-6Mb του χρωμοσώματος 12, δηλαδή την περιοχή που εμφανίζει την υψηλότερη πιθανότητα να βρεθεί η μετάλλαξη (η μετάλλαξη στο γονίδιο *aarsd1* που βρίσκεται στην ίδια περιοχή απορρίφθηκε καθώς βρέθηκε ότι αποτελεί πολυμορφισμό)
- εμφανίζουν καλό cosegregation των μεταλλαγμένων αλληλουχιών με τα μεταλλαγμένα έμβρυα
- εκφράζονται πριν τις 24 hpf
- η δράση των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν μπορεί δυνητικά να ερμηνεύσει τον παρατηρούμενο φαινότυπο, καθώς ο ρόλος τους μπορεί να συσχετιστεί είτε με την ρύθμιση αιμοδυναμικών διεργασιών, είτε την κυτταρική προσκόλληση και επικοινωνία

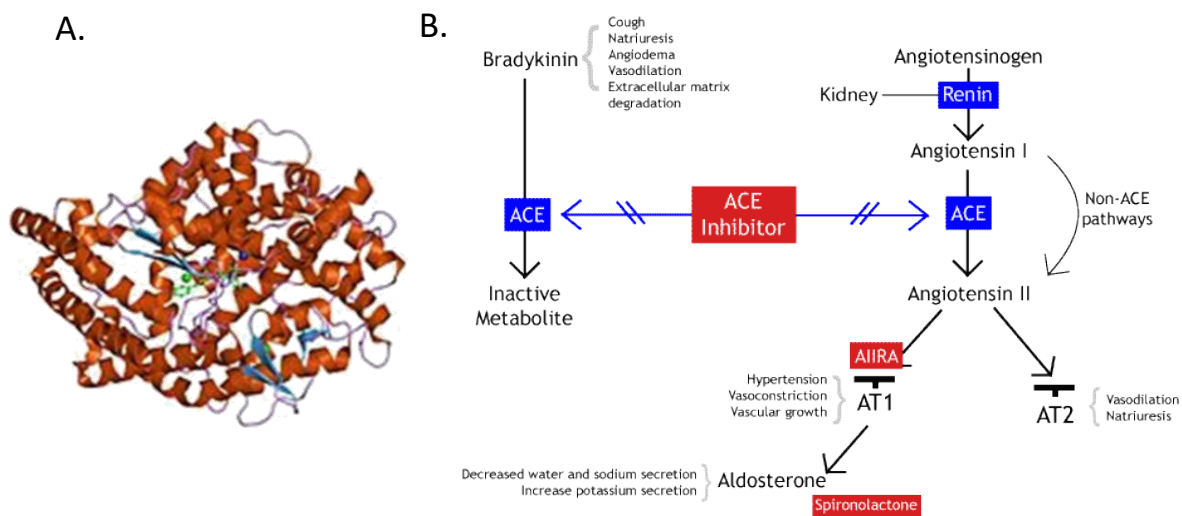
Προχωρήσαμε σε απομόνωση και αλληλούχιση DNA από 7 ενήλικα άτομα της μεταλλαγμένης σειράς *s274*, καθώς επίσης και από 7 έμβρυα με μεταλλαγμένο φαινότυπο που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις τους. Για κάθε μία από τις μεταλλάξεις σχεδιάστηκαν εκκινήτες, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της αλληλουχίας

με αντίδραση PCR, ηλεκτροφόρηση δείγματος του προϊόντος σε πηκτή αγαρόζης, καθαρισμός του προϊόντος από τους εκκινητές και τα νουκλεοτίδια που δεν χρησιμοποιήθηκαν μέσω επώασης με τα ένζυμα ExoI και rSAP, και προσθήκη του πρόσθιου ή του ανάστροφου εκκινητή και αποστολή των δειγμάτων προς αλληλούχιση στην εταιρεία MacroGen Europe (The Netherlands).

Αναμένουμε η μετάλλαξη που είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο να βρεθεί ετερόζυγη σε όλα τα ενήλικα άτομα της μεταλλαγμένης σειράς και ομόζυγη σε όλα τα έμβρυα που παρουσιάζουν τον φαινότυπο. Ένα διαφορετικό μοτίβο, π.χ. ομόζυγα ενήλικα άτομα για την μεταλλαγμένη αλληλουχία ή έμβρυα που φέρουν το φυσιολογικό αλληλόμορφο, υποδηλώνει πως η συγκεκριμένη μετάλλαξη αποτελεί απλό πολυμορφισμό και απορρίπτεται.

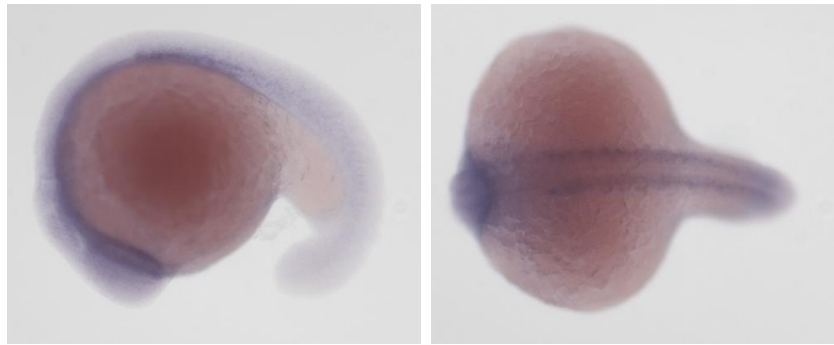
### 4.3.2 Γονίδιο *ace*

Το ένζυμο ACE (angiotensin converting enzyme) είναι ένας από τους βασικότερους συντελεστές του συστήματος Ρενίνης-Αγγειοτενσίνης. Ρόλος του είναι η μετατροπή της αγγειοτενσίνης I στην ενεργό αγγειοτενσίνη II. Η αγγειοτενσίνη II είναι μία πεπτιδική ορμόνη η οποία όταν βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα στον οργανισμό προκαλεί αγγειοσυστολή και αυξημένη πίεση του αίματος. Επιπλέον, η αγγειοτενσίνη II επάγει την έκκριση αλδοστερόνης από τα επινεφρίδια.



Εικόνα 4.10: Ένζυμο ACE A) Στερεοδιάταξη του ανθρώπινου ACE B) ο ρόλος του ενζύμου ACE

Το γονίδιο *ace* εκφράζεται πριν τις 24 hpf. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ανάπτυξη της καρδιάς κατά τα εμβρυϊκά στάδια των zebrafish επηρεάζεται άμεσα από τη δυναμική της αιματικής ροής, φαίνεται πως η μειωμένη λειτουργικότητα ή η παντελής έλλειψη του συγκεκριμένου ενζύμου θα μπορούσε δυνητικά να ερμηνεύσει την ανάπτυξη του καρδιακού φαινοτύπου *s274*.



**Εικόνα 4.11:** Πείραμα ISH που δείχνει την έκφραση του γονιδίου *ace* σε WT έμβρυα zebrafish. Κατά τις 19-22 hpf (αναπτυξιακό στάδιο 20-25 σωματιών), η έκφραση του γονιδίου ανατομικά εντοπίζεται στους σωματίτες. (<https://zfin.org/>)

Το γονίδιο *ace* φέρει δύο πιθανές μεταλλάξεις, όπως φαίνεται στον Πίνακα 4.5. Σχεδιάσαμε ένα ζεύγος εκκινητών PCR για κάθε μετάλλαξη, ούτως ώστε να ενισχύσουμε την κάθε περιοχή που φέρει την μετάλλαξη σε δείγματα DNA ετερόζυγων ατόμων zebrafish και μεταλλαγμένων/ομόζυγων εμβρύων. Στην συνέχεια τα δείγματα στάλθηκαν προς αλληλούχηση και ακολούθως συγκρίναμε τους γονοτύπους των δύο ομάδων.

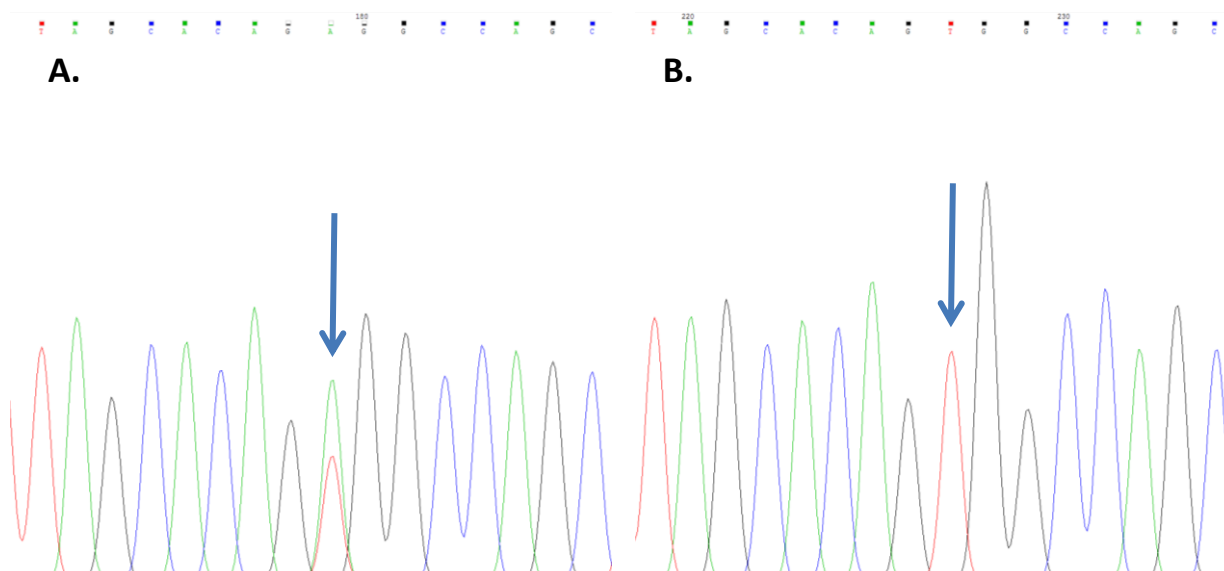
**Πίνακας 4.5:** Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *ace*

Εξόνιο	Θέση μεταλλαγής	Αλλαγή βάσης	Αριθμός αμινοξέως	Αμινοξική αλλαγή	Λειτουργική περιοχή πρωτεΐνης
1	12:5495580	GAG>GTG	95	E>V (Glu>Val)	Πεπτιδάση M2
12	12:5523137	AAT>AGT	660	I>V (Ile>Val)	Καμία γνωστή

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την γονοτυπική ανάλυση της μετάλλαξης στο εξόνιο 1. Δεν θα ακολουθήσει η αντίστοιχη ανάλυση για την μετάλλαξη στο εξόνιο 12, καθώς τα αποτελέσματα από το στάδιο της αλληλούχησης είναι κακής ποιότητας, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον γονότυπο του κάθε ατόμου. Θα ήταν σκόπιμο να επαναληφθούν τα σχετικά πειράματα.

Πίνακας 4.6: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *ace* (εξόνιο 1)

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 4	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 5	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 6	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 7	GTG/GTG	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 1	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 2	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 3	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Αρσενικός φορέας 1	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 2	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 3	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 4	GAG/GTG	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη



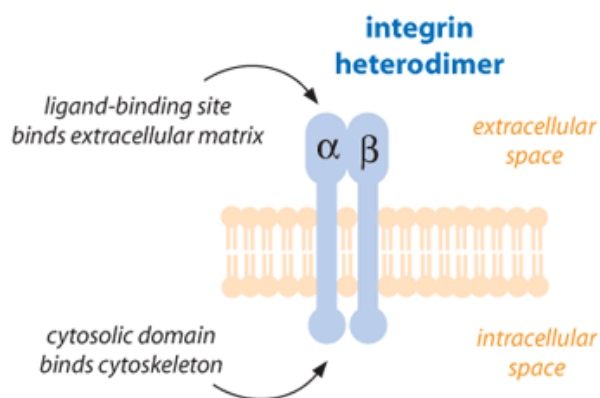
Εικόνα 4.12: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *ace* (εξόνιο 1) Α) Γονότυπος γνωστού φορέα, φέρει και το φυσιολογικό (GAG) και το μεταλλαγμένο (GTG) αλληλόμορφο Β) Γονότυπος εμβρύου που παρουσιάζει τον φαινότυπο *s274*, ομόζυγο για το μεταλλαγμένο

αλληλόμορφο (GTG). (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη T, πράσινο-αδενίνη A, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η μετάλλαξη στο εξόνιο 1 του γονιδίου *ace* φαίνεται να κληρονομείται με το μοτίβο που θα αναμέναμε εάν ήταν η υπεύθυνη για τον φαινότυπο *s274*, καθώς όλοι οι γνωστοί φορείς είναι ετερόζυγοι για την μετάλλαξη αυτή ενώ όλα τα μεταλλαγμένα έμβρυα ομόζυγα για αυτήν την μετάλλαξη. Αυτό αποτελεί μια πολύ ισχυρή ένδειξη πως η μετάλλαξη αυτή είναι η υπεύθυνη για τον φαινότυπο.

### 4.3.3 Γονίδιο *itga3b*

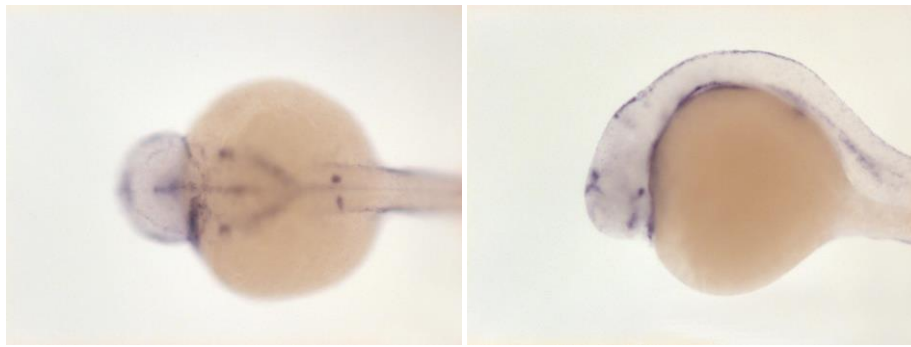
Η πρωτεΐνη ITGA3B (integrin, alpha 3b), ανήκει στην ομόνυμη οικογένεια των ιντεγκρινών. Οι ιντεγκρίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν μόρια κυτταρικής προσκόλλησης και συχνά συμμετέχουν σε διεργασίες ενδοκυττάριας σηματοδότησης. Βρίσκονται στην κυτταρική μεμβράνη ως ετεροδιμερή ενός μορίου ιντεγκρίνης α και ενός μορίου ιντεγκρίνης β, τα οποία συνδέονται μέσω δισουλφιδικών δεσμών. Τα ετεροδιμερή ιντεγκρίνης αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας, μεταξύ των οποίων με φιβρονεκτίνη, κολλαγόνο και λαμινίνες.



Εικόνα 4.13: Βασική δομή ενός ετεροδιμερούς μορίου ιντεγκρίνης

Η έκφραση του γονιδίου *itga3b* ξεκινά πριν τις 24 hrf στα αναπτυσσόμενα έμβρυα zebrafish, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζει το γεγονός ότι εκφράζεται και στον καρδιακό σωλήνα. Λαμβάνοντας υπόψη τον κομβικό ρόλο που παίζουν οι ιντεγκρίνες στην κυτταρική προσκόλληση, είναι εύκολο να φανταστούμε πώς μια μετάλλαξη στο εν λόγω γονίδιο θα μπορούσε να επηρεάσει την μηχανική αντοχή και συνοχή ενός ιστού, οδηγώντας ενδεχομένως στην χαρακτηριστική αποκόλληση του ενδοκαρδίου από το μυοκάρδιο που παρατηρείται στον φαινότυπο *s274*.





**Εικόνα 4.14:** Πείραμα ISH που δείχνει την έκφραση του γονιδίου *itga3b* σε WT έμβρυα zebrafish. Κατά τις 19-30 hpf, η έκφραση του γονιδίου ανατομικά εντοπίζεται, μεταξύ άλλων, στον καρδιακό σωλήνα (<https://zfin.org/>)

Το γονίδιο *itga3b* φέρει δύο πιθανές μεταλλάξεις. Όπως έχει ήδη περιγραφεί στην περίπτωση του γονιδίου *ace*, σχεδιάσαμε ένα ζεύγος εκκινητών PCR για κάθε μετάλλαξη, δείγματα DNA γνωστών ετερόζυγων ατόμων και μεταλλαγμένων εμβρύων στάλθηκαν προς αλληλούχηση και ακολούθησε σύγκριση των γονοτύπων των δύο ομάδων.

**Πίνακας 4.7:** Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *itga3b*

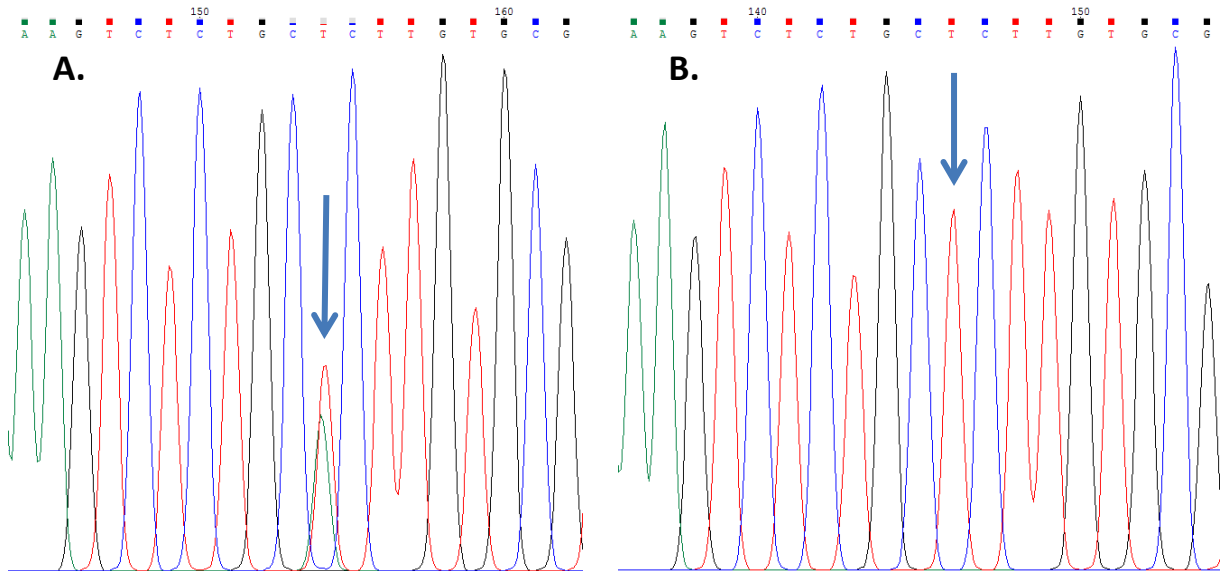
Εξόνιο	Θέση μεταλλαγής	Αλλαγή βάσης	Αριθμός αμινοξέως	Αμινοξική αλλαγή	Λειτουργική περιοχή πρωτεΐνης
1	12:5628201	CAC>CTC	7	H>L (His>Leu)	Καμία γνωστή
2	12:5590977	ACC>AGC	69	H>Q (His>Gln)	integrin alpha beta-propellor

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την γονοτυπική ανάλυση των δύο μεταλλάξεων.

### Μετάλλαξη στο εξόνιο 1 του *itga3b*

Πίνακας 4.8: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *itga3b* (εξόνιο 1)

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 4	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 5	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 6	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 7	CTC/CTC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 1	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 2	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 3	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 1	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 2	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 3	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Αρσενικός φορέας 4	CAC/CTC	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη



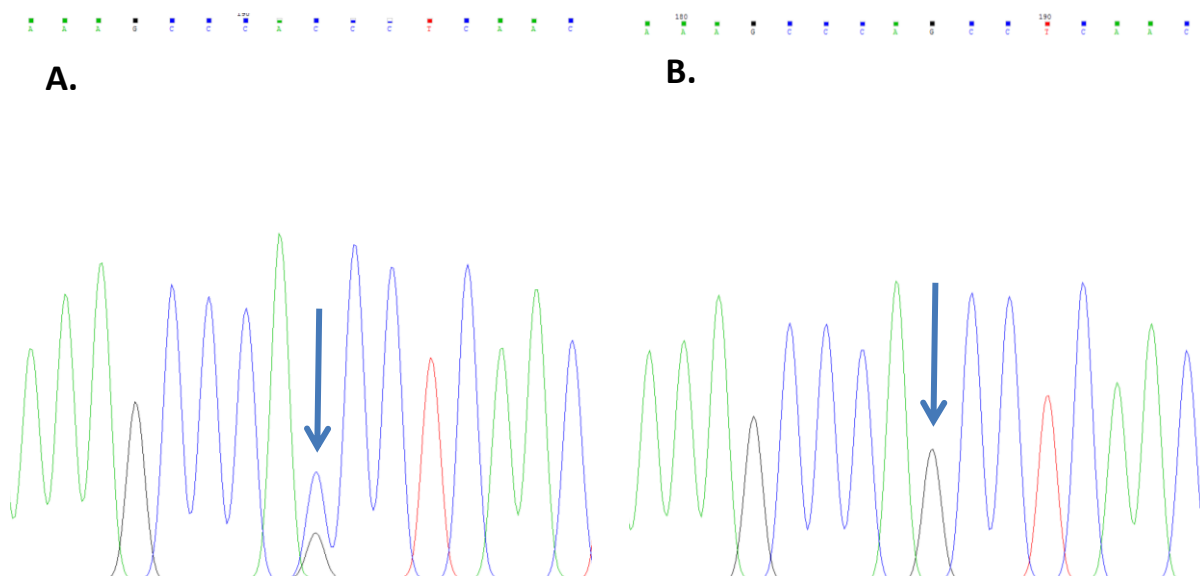
**Εικόνα 4.15: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μεταλλαγή του *itga3b* (εξόνιο 1)** Α) Γονότυπος γνωστού φορέα, φέρει και το φυσιολογικό (CAC) και το μεταλλαγμένο (CTC) αλληλόμορφο Β) Γονότυπος εμβρύου που παρουσιάζει τον φαινότυπο *s274*, ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (CTC). (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη Τ, πράσινο-αδερίνη Α, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

### Μετάλλαξη στο εξόνιο 2 του *itga3b*

**Πίνακας 4.9: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *itga3b* (εξόνιο 2)**

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	AGC/AGC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 4	AGC/AGC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 5	AGC/AGC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 6	AGC/AGC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 7	AGC/AGC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 1	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 2	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 3	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή

Αρσενικός φορέας 1	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 2	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 3	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 4	ACC/AGC	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή

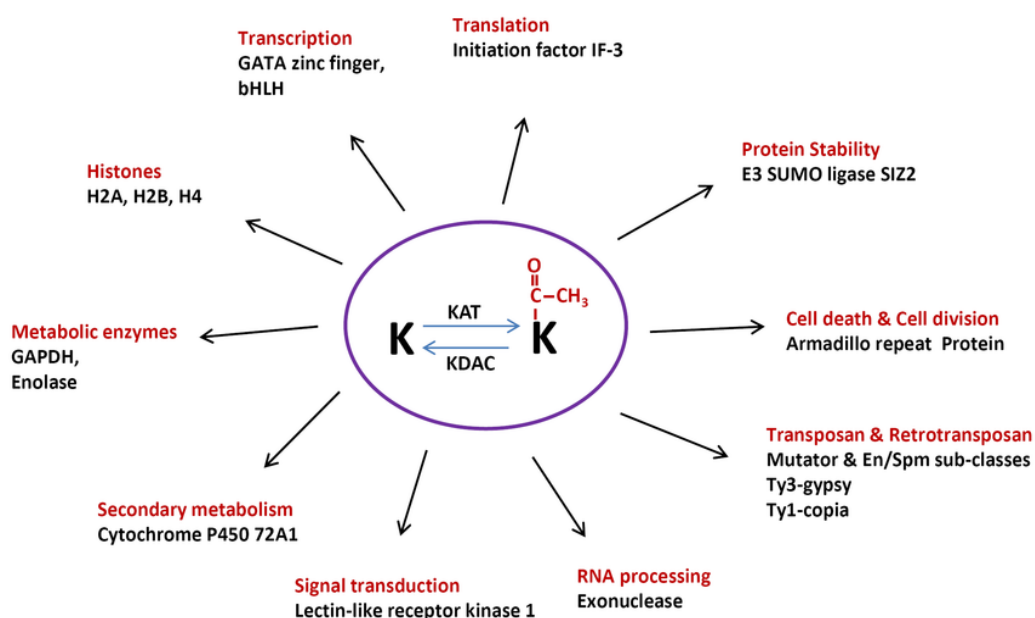


**Εικόνα 4.16: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μεταλλαγή του *itga3b* (εξόνιο 2)** Α) Γονότυπος γνωστού φορέα, φέρει και το φυσιολογικό (ACC) και το μεταλλαγμένο (AGC) αλληλόμορφο Β) Γονότυπος εμβρύου που παρουσιάζει τον φαινότυπο *s274*, ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (AGC). (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη T, πράσινο-αδενίνη A, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η μεταλλαγές και στο εξόνιο 1 και στο εξόνιο 2 του γονιδίου *itga3b* φαίνεται να κληρονομούνται με το ίδιο μοτίβο που παρατηρήσαμε και για την μεταλλαγή στο εξόνιο 1 του γονιδίου *ace*, δηλαδή όλοι οι γνωστοί φορείς της σειράς *s274* είναι ετερόζυγοι και φέρουν και τα φυσιολογικά και τα «μεταλλαγμένα» αλληλόμορφα, ενώ όλα τα έμβρυα που εμφανίζουν τον *s274* φαινότυπο είναι ομόζυγα και για τις τρεις μεταλλάξεις. Θα αναμέναμε το μοτίβο αυτό να το ακολουθεί η μετάλλαξη η οποία είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο. Αυτό το εύρημα συνεπάγεται πως δεν μπορούμε να διακρίνουμε το κατά πόσο η κάθε μετάλλαξη σχετίζεται άμεσα με τον φαινότυπο, ενώ και οι τρεις από τις μεταλλάξεις που έχουμε έως τώρα αναλύσει εξακολουθούν να είναι υποψήφιος.

#### 4.3.4 Γονίδιο *kat7b*

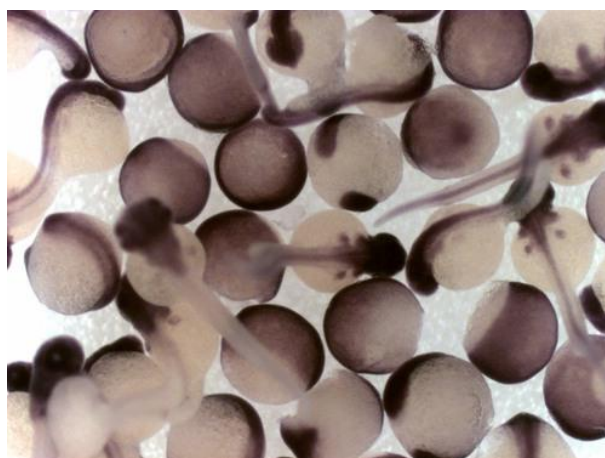
Το ένζυμο KAT7b (K/Lysine acetyltransferase 7b) έχει δράση ακετυλο-τρανσφεράσης της λυσίνης και παρουσιάζει εκλεκτικότητα για την ιστόνη H4. Η δράση της είναι πολύ σημαντική για την διατήρηση της λειτουργικότητας των σημείων έναρξης αντιγραφής του DNA (replication origins), ενώ συμμετέχει και στην μεταγραφική ενεργοποίηση κάποιων γονιδίων. Η ακετυλίωση της ιστόνης H4 βοηθάει στην χαλάρωση («ξεπακετάρισμα») της χρωματίνης, ούτως ώστε να είναι δυνατή η πρόσδεση των κατάλληλων παραγόντων που ρυθμίζουν τις διεργασίες αντιγραφής και μεταγραφής.



Εικόνα 4.17: Η απο-/ακετυλίωση αμινοξικών καταλοίπων λυσίνης των ιστονών έχει επίδραση σε πολλές πτυχές της κυτταρικής φυσιολογίας

Η έκφραση του γονιδίου *kat7b* ανιχνεύεται ήδη από το στάδιο του ενός κυττάρου και δεν εμφανίζει περιορισμό σε συγκεκριμένους ιστούς στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Λαμβάνοντας υπόψη τον ρόλο που παίζουν οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση των ιστονών, στην ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, μπορούμε να υποθέσουμε πως η διαταραχή ενός κομβικού βήματος αυτών των μηχανισμών, όπως αυτό που καταλύει η *kat7b*, ενδεχομένως να

επηρεάζει την φυσιολογική καρδιακή ανάπτυξη κατά τα εμβρυϊκά στάδια του zebrafish.



**Εικόνα 4.18:** Πείραμα ISH που δείχνει την έκφραση του γονιδίου *kat7b* σε WT έμβρυα zebrafish. Η έκφραση του γονιδίου ανιχνεύεται από το στάδιο του ενός κυττάρου (0 hpf) σε όλο το έμβρυο (<https://zfin.org/>)

Το γονίδιο *kat7b* φέρει μία πιθανή μετάλλαξη. Για την γονοτυπική ανάλυση ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως για τα προηγούμενα γονίδια

**Πίνακας 4.10:** Η μετάλλαξη του γονιδίου *kat7b*

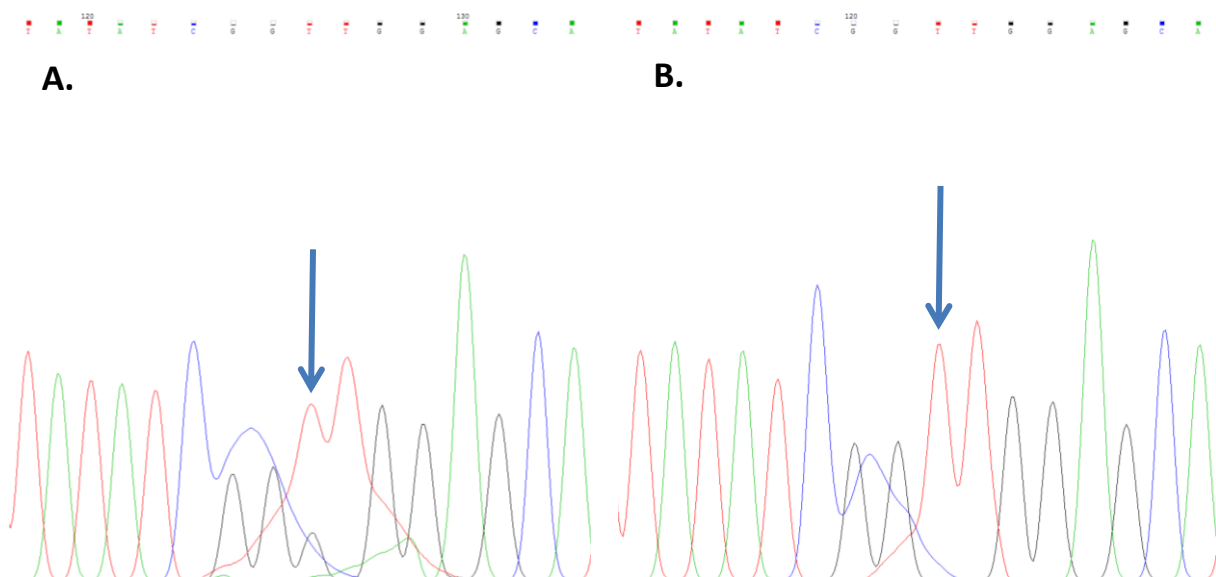
Εξόνιο	Θέση μεταλλαγής	Αλλαγή βάσης	Αριθμός αμινοξέως	Αμινοξική αλλαγή	Λειτουργική περιοχή πρωτεΐνης
4	12:5960707	GGT>GTT	75	P>T (Pro>Thr)	Καμία γνωστή

Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την γονοτυπική ανάλυση.

**Πίνακας 4.11:** Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *kat7b*

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή

Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 4	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 5	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 6	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβρυο 7	GTT/GTT	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 1	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 2	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 3	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 1	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 2	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 3	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 4	GGT/GTT	Ετερόζυγο για την μεταλλαγή



**Εικόνα 4.19: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μεταλλαγή του *kat7b*** A) Γονότυπος γνωστού φορέα, φέρει και το φυσιολογικό (GGT) και το μεταλλαγμένο (GTT) αλληλόμορφο B) Γονότυπος εμβρύου που παρουσιάζει τον φαινότυπο *s274*, ομόζυγο για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (GTT). (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη T, πράσινο-αδενίνη A, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

Είναι φυσικά εμφανές ότι στην περιοχή της μετάλλαξης υπάρχει «θόρυβος»/παραμόρφωση των κορυφών, με αποτέλεσμα τα συμπεράσματά μας σχετικά με την παρουσία και τους λόγους των κορυφών να είναι επισφαλής σε αυτή την περίπτωση. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθούν τα εξής:

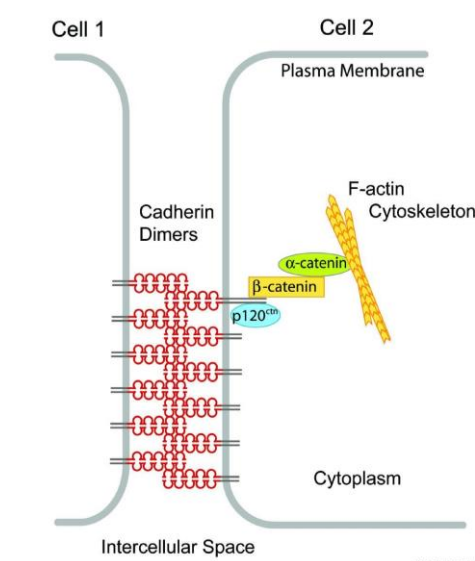
- Σε όλα τα δείγματα των φορέων παρατηρήθηκε η μικρή κορυφή που αντιστοιχεί στην βάση της γουανίνης (φυσιολογικό αλληλόμορφο), ενώ δεν παρατηρήθηκε σε κανένα δείγμα των μεταλλαγμένων εμβρύων
- Η παρατηρούμενη παραμόρφωση των κορυφών υπήρχε στις αλληλουχίες όλων σχεδόν των δειγμάτων, με την εξαίρεση ενός δείγματος
- Είχε σε όλες τις περιπτώσεις εξαιρετικά όμοια εικόνα
- Περιοριζόταν μόνο στο σημείο της μετάλλαξης που μελετούσαμε

Παρόλ' αυτά, θα ήταν σκόπιμο να επαναληφθούν τα σχετικά πειράματα.



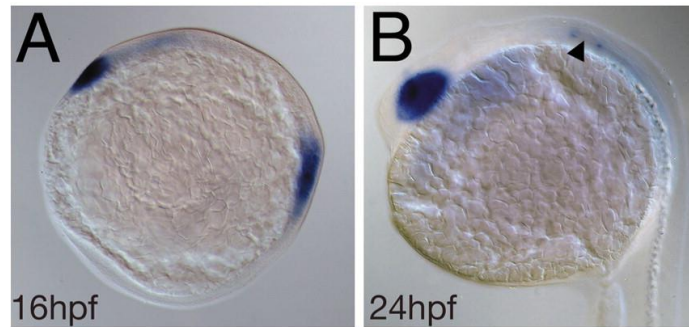
#### 4.3.5 Γονίδιο *pcdh15b*

Η πρωτεΐνη PCDH15b (Protocadherin-related 15b) ανήκει στην οικογένεια των καδερινών. Οι καδερίνες είναι διαμεμβρανικές γλυκοπρωτεΐνες και αποτελούν τους κύριους μεσολαβητές της διακυτταρικής σύνδεσης, μέσω ομοτυπικών συνδέσεων (με άλλα μόρια καδερινών) πλήρως εξαρτημένων από την παρουσία ιόντων ασβεστίου. Έχει βρεθεί πως η PCDH15b είναι απαραίτητη για την σωστή λειτουργία του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και του έσω αυτιού.



Εικόνα 4:20: Ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις μορίων καδερινών στην διακυτταρική σύνδεση

Η έκφραση του γονιδίου *pcdh15b* ξεκινά πριν τις 24 hpf στα αναπτυσσόμενα έμβρυα zebrafish. Επίσης, όπως οι ιντεγκρίνες παίζουν κομβικό ρόλο που στην κυτταρική προσκόλληση, έτσι και οι καδερίνες είναι απαραίτητες για την διακυτταρική σύνδεση και επικοινωνία. Συνεπώς, με την ίδια λογική όπως και στην περίπτωση της *itga3b*, μπορούμε να θεωρήσουμε πιθανό μια μετάλλαξη στο γονίδιο *pcdh15b* να επηρεάσει την μηχανική αντοχή ενός ιστού και να οδηγήσει στην αποκόλληση του ενδοκαρδίου από το μυοκάρδιο και τον φαινότυπο *s274*.



Εικόνα 4.21: Πείραμα ISH που δείχνει την έκφραση του γονιδίου *pcdh15b* σε WT έμβρυα zebrafish. Α) Στις 16 hpf εντοπίζεται έκφραση του *pcdh15b* στο πρόσθιο νευροεκτόδερμα και τους σωματίτες Β) Στις 24 hpf υπάρχει έκφραση στο μάτι και τις πρόδρομες δομές του αυτιού (<https://zfin.org/>)

Το γονίδιο *pcdh15b* φέρει δύο πιθανές μεταλλάξεις. Για την γονοτυπική ανάλυση ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως για τα προηγούμενα γονίδια

Πίνακας 4.12: Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *pcdh15b*

Εξόνιο	Θέση μεταλλαγής	Αλλαγή βάσης	Αριθμός αμινοξέως	Αμινοξική αλλαγή	Λειτουργική περιοχή πρωτεΐνης
14	12: 6691167	AGC>AAC	524	S>N (Ser>Asn)	Domain καδερίνης
38	12: 6510403	AGA>ACA	1571	S>C (Ser>Cys)	Καμία γνωστή

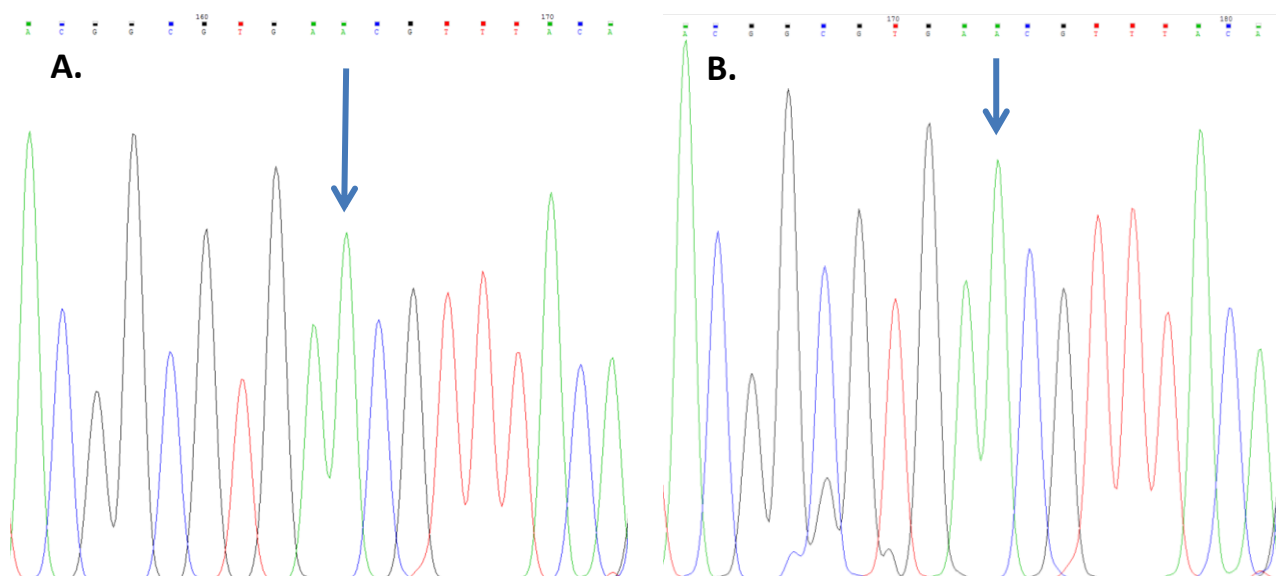
Παρακάτω παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την γονοτυπική ανάλυση των δύο μεταλλάξεων.

#### Μετάλλαξη στο εξόνιο 14 του *pcdh15b*

Πίνακας 4.13: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *pcdh15b* (εξόνιο 14)

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μετάλλαξη

Μεταλλαγμένο έμβryo 4	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβryo 5	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβryo 6	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Μεταλλαγμένο έμβryo 7	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 1	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 2	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Θηλυκός φορέας 3	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 1	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 2	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 3	AAC/AAC	Ομόζυγο για την μεταλλαγή
Αρσενικός φορέας 4	Κακή ανάγνωση	Κανένα

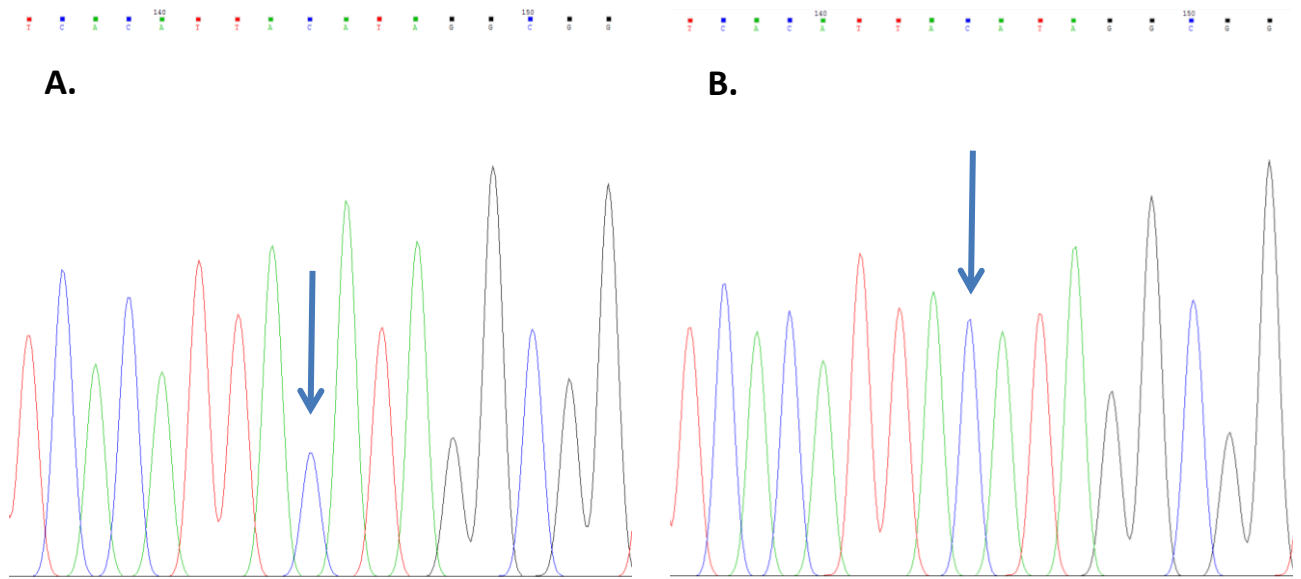


**Εικόνα 4.22:** Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μεταλλαγή του *pcdh15b* (εξόνιο 14) Α) Γονότυπος γνωστού φορέα ο οποίος, όπως και το έμβryo με φαινότυπο *s274* (B), είναι ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (AAC) (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη T, πράσινο-αδενίνη A, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

### Μετάλλαξη στο εξόνιο 38 του *pcdh15b*

Πίνακας 4.14: Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μετάλλαξη του *pcdh15b* (εξόνιο 38)

Δείγμα	Γονότυπος	Αποτέλεσμα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 1	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 2	ACA/ACA	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 3	ACA/ACA	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 4	ACA/ACA	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 5	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Μεταλλαγμένο έμβρυο 6	ACA/ACA	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Μεταλλαγμένο έμβρυο 7	ACA/ACA	Ομόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 1	ACA/ACA	<b>Ομόζυγο για την μετάλλαξη</b>
Θηλυκός φορέας 2	AGA/ACA	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη
Θηλυκός φορέας 3	ACA/ACA	<b>Ομόζυγο για την μετάλλαξη</b>
Αρσενικός φορέας 1	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Αρσενικός φορέας 2	Κακή ανάγνωση	Κανένα
Αρσενικός φορέας 3	ACA/ACA	<b>Ομόζυγο για την μετάλλαξη</b>
Αρσενικός φορέας 4	AGA/ACA	Ετερόζυγο για την μετάλλαξη



**Εικόνα 4.23:** Αποτελέσματα αλληλούχησης για την μεταλλαγή του *pcdh15b* (εξόνιο 38) A) Γονότυπος γνωστού φορέα ο οποίος, όπως και το έμβρυο με φαινότυπο *s274* (B), είναι ομόζυγος για το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο (ACA) (Αντιστοιχία χρωμάτων κορυφών-αζωτούχων βάσεων: κόκκινο-θυμίνη T, πράσινο-αδενίνη A, μπλε-κυτοσίνη C, μαύρο-γουανίνη G)

Και για τις δύο μεταλλάξεις του γονιδίου *pcdh15b*, βρέθηκαν γνωστοί φορείς της μετάλλαξης, να ομόζυγοι για την μεταλλαγμένη αλληλουχία. Φυσικά αυτό συνεπάγεται απόρριψη των δύο αυτών «μεταλλάξεων» ως τις υπεύθυνες για τον *s274* φαινότυπο, καθώς γνωρίζουμε ότι η έκβαση του φαινοτύπου για τα ομόζυγα άτομα είναι θανατηφόρα κατά την εμβρυϊκή φάση της ανάπτυξης. Συμπερασματικά, μπορούμε να καταλήξουμε πως οι δύο αυτές «μεταλλάξεις» που εντοπίστηκαν από την MMAPPR ανάλυση αποτελούν απλούς πολυμορφισμούς.

## 5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταλλαγμένη σειρά *s274* έχει ήδη χαρακτηριστεί φαινοτυπικά, με ιδιαίτερη έμφαση στο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της αποκόλλησης του μυοκαρδίου από το ενδοκάρδιο. Παρόλ' αυτά, δεν ήταν γνωστό ότι τα μεταλλαγμένα έμβρυα εμφάνιζαν καρδιακό φαινότυπο ήδη από τις 24 hpf. Το γεγονός αυτό ενδεχομένως να αποτελέσει ένα στοιχείο στην «λύση» του γρίφου. Θα είχε ενδιαφέρον να πραγματοποιηθεί περαιτέρω χαρακτηρισμός του φαινοτύπου στις 24 hpf με την βοήθεια διαγονιδίων όπως το *kdrl:gfp*.

Σε μία απόπειρα να περιορίσουμε την αχανή λίστα υποψήφίων μεταλλάξεων που ήρθαν στο φως από την MMAPPR ανάλυση, πραγματοποιήσαμε βιβλιογραφική μελέτη και χαρακτηρισμό του κάθε γονιδίου, με σκοπό να ξεχωρίσουμε αυτές που εμφανίζουν, με βάση κάποια κριτήρια που θέσαμε, αυξημένες πιθανότητες. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα κριτήρια με τα οποία μια μετάλλαξη θεωρήθηκε ότι έχει αυξημένες πιθανότητες, κατά φθίνουσα σειρά της βαρύτητάς τους, είναι τα εξής:

1. Να είναι γνωστό ότι το γονίδιο στο οποίο βρίσκεται η μετάλλαξη εκφράζεται πριν τις 24 hpf
2. Η μετάλλαξη να βρίσκεται μέσα ή κοντά στην περιοχή 5-6Mb του χρωμοσώματος 12, όπου κορυφώνεται η πιθανότητα εύρεσής της
3. Η πρωτεΐνη που εκφράζει το γονίδιο να σχετίζεται με το καρδιαγγειακό σύστημα ή να παίζει ρόλο στην διακυτταρική σύνδεση και σηματοδότηση
4. Η μετάλλαξη να βρίσκεται σε κάποια λειτουργική περιοχή της πρωτεΐνης
5. Η αμινοξική αλλαγή που λαμβάνει χώρα να οδηγεί σε υποκατάσταση καταλοίπων με σημαντικές διαφορές στις πλευρικές αλυσίδες

Η αξιολόγηση που πραγματοποιήθηκε οδήγησε σε σημαντικό περιορισμό της λίστας των υποψήφίων μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα 12, από 206 σε 50. Ο αριθμός αυτό είναι πιά εύκολα διαχειρίσιμος συγκριτικά, όμως για να υπάρχει

αντικειμενικά η δυνατότητα να πραγματοποιηθεί πειραματικός έλεγχος μέσω γονοτυπικής ανάλυσης, θα πρέπει η αξιολόγηση και ιεράρχηση των πιο «πολλά υποσχόμενων» μεταλλάξεων να συνεχιστεί, πιθανώς με αναθεώρηση των κριτηρίων που τέθηκαν.

Στην συνέχεια πραγματοποιήσαμε γονοτυπική ανάλυση με δείγματα γνωστών φορέων (θεωρητικά ετερόζυγοι) και εμβρύων που παρουσιάζουν τον φαινότυπο (θεωρητικά ομόζυγα), για τις μεταλλάξεις των γονιδίων *ace*, *itga3b*, *kat7b* και *pcdh15b*. Καταλήξαμε στα εξής συμπεράσματα:

- Και οι δύο μεταλλάξεις του γονιδίου *pcdh15b* απορρίπτονται, ως πολυμορφισμοί, καθώς και για τις δύο βρέθηκαν γνωστοί φορείς της σειράς *s274* να είναι ομόζυγοι για τις εν λόγω μεταλλάξεις, κάτι αδύνατο εφόσον γνωρίζουμε ότι τα ομόζυγα άτομα πεθαίνουν κατά την εμβρυϊκή ηλικία
- Πρέπει να επαναληφθούν τα πειράματα για την μετάλλαξη του γονιδίου *ace* στο εξόνιο 2, καθώς τα δεδομένα αλληλούχισης ήταν κακής ποιότητας και δεν μπόρεσαν να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον γονότυπο
- Όλες από τις παρακάτω μεταλλάξεις βρέθηκαν ομόζυγες στα μεταλλαγμένα έμβρυα και ετερόζυγες στους φορείς, ακολουθούν δηλαδή το μοτίβο που θα αναμέναμε για την μετάλλαξη η οποία είναι υπεύθυνη για τον φαινότυπο. Κατά συνέπεια δεν μπορούμε να διακρίνουμε το κατά πόσο η κάθε μετάλλαξη σχετίζεται άμεσα με τον φαινότυπο, ενώ όλες εξακολουθούν να είναι υποψήφιες.

---

**GeneModels: GRCz10.genes**

Results are printed for each intersecting gene and include:

1) The UCSC gene model (Name(s),Chrom,GeneStart,GeneStop,Strand,TSS)

2) The intersecting Alleles (Start,End,Allele,Notes)

3) Their relative location and potential effects.

<b>ace (gene22605)</b>	ace (rna34612)	chr12	5495268	5547103	+	5495268
------------------------	----------------	-------	---------	---------	---	---------

			5495579	5495580	T		Coverage:A:C:G:T = 8:0:0:0:8
Coding exon 1							
Non-synonymous E > V							
<b>itga3b (gene22606)</b>	itga3b (rna34613)	chr12	5552145	5628447	-	5628447	
			5590976	5590977	C		Coverage:A:C:G:T = 11:0:11:0:0
Coding exon 2							
Non-synonymous H > Q							
			5628200	5628201	A		Coverage:A:C:G:T = 9:8:0:0:1
Coding exon 1							
Non-synonymous H > L							
<b>kat7b (gene22611)</b>	kat7b (rna34620)	chr12	5947748	5965280	-	5965280	
			5960706	5960707	T		Coverage:A:C:G:T = 34:0:0:0:34
Coding exon 4							
Non-synonymous P > T							

Το γεγονός ότι τέσσερις μεταλλάξεις σε τρία διαφορετικά γονίδια κληρονομούνται με το ίδιο μοτίβο μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι τα γονίδια αυτά είναι γειτονικά και η πιθανότητα τα αλληλόμορφα αυτά να διαχωριστούν με επιχιασμούς είναι αρκετά χαμηλή (η πιθανότητα διαχωρισμού αυξάνεται εκθετικά αυξανόμενης της απόστασης στο γονιδίωμα).

Προκειμένου να διακρίνουμε κατά πόσο κάποια από τις μεταλλάξεις αυτές είναι όντως η υπεύθυνη για τον φαινότυπο, το επόμενο βήμα είναι μια προσέγγιση ανάδρομης γενετικής ανάλυσης: πραγματοποιώντας στοχευμένο knock down/knock out κάθε ενός από τα γονίδια που μας ενδιαφέρει, π.χ. με χρήση ενέσεων morpholino, μπορούμε να δούμε εάν η αποσιώπηση κάποιου γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα κάποιον φαινότυπο όμοιο με αυτόν της σειράς *s274*.

Σε αυτό το σημείο είναι σκόπιμο να αναφέρουμε ότι υπάρχει μια γνωστή μεταλλαγμένη σειρά με το όνομα *frayed*, για την οποία έχει βρεθεί πως η υπεύθυνη μετάλλαξη βρίσκεται στο γονίδιο *itga3b*. Η σειρά *frayed* χαρακτηρίζεται από ελαττωματική διάπλαση των πτερυγίων ενώ τα ομόζυγα άτομα για την μετάλλαξη ενηλικιώνονται και είναι γόνιμα (Eeden et al., 1996). Αυτό σαν δεδομένο δεν αρκεί για να αποκλείσει το ενδεχόμενο το γονίδιο *itga3b* να είναι υπεύθυνο και για τον



φαινότυπο της σειράς s274, αλλά ίσως αποτελεί μια ένδειξη ότι οι πιθανότητες δεν είναι τόσο υψηλές σε σύγκριση με τα άλλα γονίδια. Επιπλέον, στην περίπτωση που το ίδιο γονίδιο ευθύνεται για δύο διαφορετικούς φαινοτύπους, το πρόβλημα της ανάδρομης γενετικής ανάλυσης ενδεχομένως να γίνεται πιο περίπλοκο.

Είναι σημαντικό να υπογραμμίσουμε πως δεν είναι βέβαιο πως η μετάλλαξη πράγματι βρίσκεται σε ένα γονίδιο μεταξύ αυτών που αναφέρονται στον Πίνακα 4.3. Κάποιες μεταλλάξεις έχουν παραληφθεί επειδή:

- η θέση τους στο χρωμόσωμα 12 είναι μακριά από την περιοχή 5-6Mb, στην οποία κορυφώνεται η πιθανότητα εύρεσης της μετάλλαξης
- οι πρωτεΐνες δεν είναι επαρκώς μελετημένες: δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με την έκφραση, την δομή ή/και την λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί κάποιο γονίδιο στην περιοχή ενδιαφέροντος

Τέλος, δεν είναι δεδομένο πως η μετάλλαξη της σειράς s274 βρίσκεται στην αρχική λίστα που προέκυψε από την MMAPPR ανάλυση. Υπάρχει η πιθανότητα η μετάλλαξη να βρίσκεται σε θέση εναλλακτικού ματίσματος σε ιντρονική περιοχή κάποιου γονιδίου, σε κάποια ρυθμιστική περιοχή, σε κάποιο μη μεταφραζόμενο RNA ή σε κάποιο μη ακόμα χαρακτηρισμένο microRNA στην περιοχή. Αυτές οι μεταλλάξεις δεν θα μπορούσαν να εντοπιστούν με MMAPPR, καθώς η τελευταία βασίζεται στην αλληλούχιση του μεταγραφώματος, και άρα στα αποτελέσματα υπάρχουν μόνο μεταλλάξεις οι οποίες βρίσκονται σε εξόνια.

Παρόλα αυτά, βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της MMAPPR και σε μια διαδικασία ιεράρχησης και ανάδειξης των πιο «πολλά υποσχόμενων» μεταλλάξεων, η ανάλυση μας καθίστανται πολύ λιγότερο χαώδης και στατιστικά πιο πιθανή να αποφέρει αποτελέσματα, με παράλληλη εξοικονόμηση χρόνου, κόπου και χρήματος. Η παρούσα μελέτη οδήγησε στην εστίαση των περαιτέρω πειραμάτων αντίστροφης γενετικής σε 3 υποψήφια γονίδια για τον τελικό έλεγχο ποιο από αυτά προκαλεί τον καρδιαγγειακό φαινότυπο.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Allen, J.P. and M. N. Neely (2010). "Trolling for the ideal model host: zebrafish take the bait." *Future Microbiol* 5(4): 563-569.

Armstrong, E. J. and J. Bischoff (2004). "Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation." *Circ Res* 95(5): 459-470.

Arunachalam, M., M. Raja, C. Vijayakumar, P. Malaiammal and R. L. Mayden. (2013). "Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India." *Zebrafish* 10(1): 1-14.

Auman, H. J., H. Coleman, H. E. Riley, F. Olale, H. J. Tsai and D. Yelon. (2007). "Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes." *PLoS Biol* 5(3): e53.

Baker, K., K.S. Warren, G. Yellen, and M.C. Fishman. (1997). "Defective "pacemaker" current (I<sub>h</sub>) 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(2): 279-288.

Barbazuk, W.B., I. Korf, C. Kadavi, J. Heyen, S. Tate, E. Wun, J.A. Bedell, J.D. McPherson, and S.L. Johnson, (2000). "The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes". *Genome Res.* 10, 1351–1358.

Beis, D., T. Bartman, S. W. Jin, I. C. Scott, L. A. D'Amico, E. A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H. A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J. N. Chen, D. Y. Beis, D., and Stainier, D.Y.R. (2006). "In vivo cell biology: following the zebrafish trend". *Trends Cell Biol.* 16, 105–112.

Bill, B. R., A. M. Petzold, K. J. Clark, L. A. Schimmenti and S. C. Ekker (2009). "A primer for morpholino use in zebrafish." *Zebrafish* 6(1): 69-77.

Blackburn, P. R., J. M. Campbell, K. J. Clark and S. C. Ekker (2013). "The CRISPR system--keeping zebrafish gene targeting fresh." *Zebrafish* 10(1): 116-118.

Bournele, D., D. and Beis. (2016). "Zebrafish models of cardiovascular disease". *Heart Fail. Rev.* 21, 803–813.

Brown, D., L. Samsa, L. Qian, and J. Liu, (2016). "Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish". *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 3, 13.

Chakrabarti, S., G. Streisinger, F. Singer and C. Walker (1983). "Frequency of  $\gamma$ -Ray Induced Specific Locus and Recessive Lethal Mutations in Mature Germ Cells of the Zebrafish, BRACHYDANIO RERIO." *Genetics* 103(1): 109-123.

Chang, C. P., J. R. Neilson, J. H. Bayle, J. E. Gestwicki, A. Kuo, K. Stankunas, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2004). "A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis." *Cell* 118(5): 649-663.

Chassot, B., D. Pury, and A. Jaźwińska, (2016). "Zebrafish fin regeneration after cryoinjury-induced tissue damage". *Biol. Open* 5, 819–828.

Christoffels, V. M., J. B. Burch and A. F. Moorman (2004). "Architectural plan for the heart: early patterning and delineation of the chambers and the nodes." *Trends Cardiovasc Med* 14(8): 301-307.

Driever, W., L. Solnica-Krezel, A. F. Schier, S. C. Neuhauss, J. Malicki, D. L. Stemple, D. Y. Stainier, F. Zwartkruis, S. Abdelilah, Z. Rangini, J. Belak and C. Boggs (1996). "A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish." *Development* 123: 37-46.

Eaton, R.C., and R.D Farley. (1974). "Spawning Cycle and Egg Production of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, in the Laboratory". *Copeia* 1974, 195–204.

van Eeden Fredericus J. M, M. Granato, U. Schach, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, M. Hammerschmidt, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, D.A. Kane, R.N. Kelsh, M.C. Mullins, J. Odenthal, R.M. Warga and C. Nüsslein-Volhard (1996) "Genetic analysis of fin formation in the zebrafish, *Danio rerio*" *Development* 123, 255-262

Engeszer, R.E., L.B. Patterson, A.A. Rao and D.M. Parichy. (2007) "Zebrafish in the World: A Review of Natural History and New Notes from the Field"; *Zebrafish.*; 4: 1.

Engeszer, R. E., G. Wang, M. J. Ryan and D. M. Parichy (2008). "Sex-specific perceptual spaces for a vertebrate basal social aggregative behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(3): 929-933.

Gates, M. A., L. Kim, E. S. Egan, T. Cardozo, H. I. Sirotkin, S. T. Dougan, D. Lashkari, R. Abagyan, A. F. Schier and W. S. Talbot (1999). "A genetic linkage map for zebrafish: comparative analysis and localization of genes and expressed sequences." *Genome Res* 9(4): 334-347.

Geisler, R., G. J. Rauch, H. Baier, F. van Bebber, L. Bross, M. P. Dekens, K. Finger, C. Fricke, M. A. Gates, H. Geiger, S. Geiger-Rudolph, D. Gilmour, S. Glaser, L. Gnugge, H. Habeck, K. Hingst, S. Holley, J. Keenan, A. Kirn, H. Knaut, D. Lashkari, F. Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M. C. Mullins, M. Hammerschmidt, D. A. Kane, J. Odenthal, F. J. van Eeden, Y. J. Jiang, C. P. Heisenberg, R. N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian and C. Nusslein-Volhard (1996). "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*." *Development* 123: 1-36.

Gellert G. and J. Heinrichsdorff (2001) "Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater". *Water Resources* 35 (15): 3754 – 3757.

Gerlai, R. (2003). "Zebrafish: An Uncharted Behavior Genetic Model". *Behav. Genet.* 33, 461–468.

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., S. Reischauer, D.Y.R. Stainier, and R. Arnaout, (2017). "Little fish, big data: zebrafish as a model for cardiovascular and metabolic disease". *Physiol. Rev.* 97, 889–938.

Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M.C. Mullins, M. Hammerschmidt, D.A. Kane, J. Odenthal, van Eeden, Y.J. Jiang, C.P. Heisenberg, R.N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian and C. Nüsslein-Volhard. (1996) "The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*". *Development.* 123:1-36.

Hill, A.J., H. Teraoka, W. Heideman and R.E. Peterson. (2005) "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity". *Toxicological Sciences* 86 (1): 6t19.

Hill, J.T., B.L. Demarest, B.W. Bisgrove, B. Gorski, Y.C. Su and H.J. Yost (2013). "MMAPPR: mutation mapping analysis pipeline for pooled RNA-seq." *Genome Res* 23(4): 687-697.

Hu, N., H.J. Yost and E.B. Clark (2001). "Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish". *Anat. Rec.* 264, 1–12.

Goldsmith, J.R. and C. Jobin (2012) "Think Small: Zebrafish as a Model System of Human Pathology", *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012

Joshi, M. and J.D. Deshpande (2010). "Polymerase chain reaction: methods, principles and application". *Int. J. Biomed. Res.* 2, 81–97.

Kaufman, C.K., R.M. White and L. Zon (2009). "Chemical genetic screening in the zebrafish embryo". *Nat. Protoc.* 4, 1422–1432.

Kelly, P.D., F. Chu, I.G. Woods, P. Ngo-Hazelett, T. Cardozo, H. Huang, F. Kimm, L. Liao, Y.L. Yan, Y. Zhou, S.L. Johnson, R. Abagyan, A.F. Schier, J.H. Postlethwait and W.S. Talbot (2000). "Genetic linkage mapping of zebrafish genes and ESTs." *Genome Res* 10(4): 558-567.

Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann and T.F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish". *Dev. Dyn.* 203, 253–310.

Kishimoto, Y., K.H. Lee, L. Zon, M. Hammerschmidt and S. Schulte-Merker (1997). "The molecular nature of zebrafish swirl: BMP2 function is essential during early dorsoventral patterning." *Development* 124(22): 4457-4466.

Laale, H.W. (1977). "The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research". *J. Fish Biol.* 10, 121–173.

Lam, S.H., Y.L. Wu, V.B. Vega, L.D. Miller, J. Spitsbergen, Y. Tong, H. Zhan, K.R. Govindarajan, S. Lee, S. Mathavan, K.R.K. Murthy, D.R. Buhler, E.T. Liu and Z. Gong, (2006). "Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression". *Nat. Biotechnol.* 24, 73–75.

Lammer, E., G.J. Carr, K. Wendler, J.M. Rawlings, S.E. Belanger and T. Braunbeck (2009) "Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology*" *Toxicology and Pharmacology* 149 (2): 196t209.

Larson, E.T., D.M. O'Malley, and R.H. Melloni, (2006). "Aggression and vasotocin are associated with dominant-subordinate relationships in zebrafish". *Behav. Brain Res.* 167, 94–102.

Lawson, N.D. and S.A. Wolfe (2011). "Forward and reverse genetic approaches for the analysis of vertebrate development in the zebrafish." *Dev Cell* 21(1): 48-64.

Lee, K.W., S.E. Webb and A.L. Miller (1999). "A wave of free cytosolic calcium traverses zebrafish eggs on activation". *Dev. Biol.* 214, 168–180.

Liu H., Yu H., Giesy J.P., Sun Y., Wang X. (2007) "Toxicity of HC Orange No. 1 to *Daphnia magna*, Zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos, and goldfish (*Carassius auratus*)". *Chemosphere* 66 (11): 2159-2165.

MacRae, C.A. and R.T. Peterson (2015). "Zebrafish as tools for drug discovery." *Nat Rev Drug Discov* 14(10): 721-731.

Maderspacher, F., U. Martyn, S. Neuhauss, C. Neumann, T. Nicolson, F. Pelegri, R. Ray, J.M. Rick, H. Roehl, T. Roeser, H.E. Schauerte, A.F. Schier, U. Schonberger, H.B. Schonthaler, S. Schulte-Merker, C. Seydler, W.S. Talbot, C. Weiler, C. Nusslein-Volhard and P. Haffter (1999). "A radiation hybrid map of the zebrafish genome." *Nat Genet* 23(1): 86-89.

McClure, M.M. (1999), "Development and evolution of melanophore patterns in fishes of the genus *Danio* (Teleostei: Cyprinidae)". *J Morphol.* 241(1):83-105.

McClure, M.M., P.B. McIntyre and A.R. McCune (2006). "Notes on the natural diet and habitat of eight danionin fishes, including the zebrafish *Danio rerio*". *J. Fish Biol.* 69, 553–570.

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.

Moro, E., G. Ozhan-Kizil, A. Mongera, D. Beis, C. Wierzbicki, R.M. Young, D. Bournele, A. Domenichini, L.E. Valdivia, L. Lum, C. Chen, J.F. Amatruda, N. Tiso, G. Weidinger and F. Argenton (2012). "In vivo Wnt signaling tracing through a transgenic biosensor fish reveals novel activity domains." *Dev Biol* 366(2): 327-340.

Moyle P.B., J.J. Jr Cech, (2004) "Fishes: An introduction to ichthyology" Εκδόσεις Prentice Hall, ISBN 0-13-372996-6,pg. 51-52, 255-257.

Mullins, M.C., M. Hammerschmidt, P. Haffter and C. Nusslein-Volhard (1994). "Large-scale mutagenesis in the zebrafish: in search of genes controlling development in a vertebrate." *Curr Biol* 4(3): 189-202.

Nelson, J.S. (2006). "Fishes of the World" (Hoboken, N.J: Wiley).

Parichy D.M., (2006) "Evolution of danio pigment pattern development. *Heredity*" *Edinb* 97(3):200-10.

Parichy, D.M. (2015). "Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution." *Elife* 4.

Paz, K. and Z. Zhu (2005). "Development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor receptor 2. Current status and future perspective." *Front Biosci* 10: 1415-1439.

Peterson, R.T. and M.C. Fishman (2011). "Designing zebrafish chemical screens." *Methods Cell Biol* 105: 525-541.



Poon, K.L., and T. Brand (2013). "The zebrafish model system in cardiovascular research: A tiny fish with mighty prospects". *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* 2013, 4.

Postlethwait, J.H., Y.L. Yan, M.A. Gates, S. Horne, A. Amores, A. Brownlie, A. Donovan, E.S. Egan, A. Force, Z. Gong, C. Goutel, A. Fritz, R. Kelsh, E. Knapik, E. Liao, B. Paw, D. Ransom, A. Singer, M. Thomson, T.S. Abduljabbar, P. Yelick, D. Beier, J.S. Joly, D. Larhammar, F. Rosa, M. Westerfield, L.I. Zon, S.L. Johnson and W.S. Tablot, (1998). "Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map". *Nat. Genet.* 18, 345–349.

Reiter, J. F., H. Verkade and D.Y. Stainier (2001). "Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5." *Dev Biol* 234(2): 330-338.

Reninger, S.L., H.B. Schonhaler, S.C. Neuhauss and R. Dahm (2011). "Investigating the genetics of visual processing, function and behaviour in zebrafish." *Neurogenetics* 12(2):97-116

Scherz, P. J., J. Huisken, P. Sahai-Hernandez and D.Y. Stainier (2008). "High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function." *Development* 135(6): 1179-1187.

Sehnert, A.J., A. Huq, B.M. Weinstein, C. Walker, M. Fishman, and D.Y.R. Stainier (2002). "Cardiac troponin T is essential in sarcomere assembly and cardiac contractility". *Nat. Genet.* 31, 106–110.

Slack, J.M.W. (2012). "Essential Developmental Biology" (Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell).

Solnica-Krezel, L., A.F. Schier and W. Driever (1994). "Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline." *Genetics* 136(4): 1401-1420.

Spence, R., G. Gerlach, C. Lawrence and C. Smith. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*" *Biol Rev Camb Philos Soc* 83(1): 13-34.

Stainier, D.Y., R.K. Lee and M.C. Fishman (1993). "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." *Development* 119(1): 31-40.

Stainier, D.Y., B.M. Weinstein, H.W. Detrich, L.I. Zon, and M.C. Fishman (1995). "Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages". *Dev. Camb. Engl.* 121, 3141–3150.

Stainier, D.Y. (2001). "Zebrafish genetics and vertebrate heart formation." *Nat Rev Genet* 2(1): 39-48.

Stainier, D.Y. and B. Jungblut (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* 132(18): 4193-4204.

Strahle, U. and C. Grabher (2010). "The zebrafish embryo as a model for assessing off-target drug effects." *Dis Model Mech* 3(11-12): 689-692.

Taylor, K.L., N.J. Grant, N.D. Temperley and E.E. Patton (2010). "Small molecule screening in zebrafish: an in vivo approach to identifying new chemical tools and drug leads." *Cell Commun Signal* 8: 11.

Timmerman, L.A., J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertran, J. M. Perez-Pomares, J. Diez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J. C. Izpisua-Belmonte and J. L. de la Pompa (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes Dev* 18(1): 99-115.

Tsang, M. (2010). "Zebrafish: A tool for chemical screens." *Birth Defects Res C Embryo Today* 90(3): 185-192.

Walker, C. and G. Streisinger (1983). "Induction of Mutations by gamma-Rays in Pregonial Germ Cells of Zebrafish Embryos." *Genetics* 103(1): 125-136.

Westerfield, M. (2000). "The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish" (M. Westerfield, Univ. of Oregon Press, Eugene).

Woods, I.G., C. Wilson, B. Friedlander, P. Chang, D.K. Reyes, R. Nix, P.D. Kelly, F. Chu, J.H. Postlethwait and W.S. Talbot (2005). "The zebrafish gene map defines ancestral vertebrate chromosomes." *Genome Research* 15(9): 1307-1314.

Zon, L. I. and R. T. Peterson (2005). "In vivo drug discovery in the zebrafish." *Nat Rev Drug Discov* 4(1): 35-44.

<https://wiki.med.harvard.edu/SysBio/Megason/CollectingEggs>

<https://www.diagenode.com/en/categories/crispr-cas9-genome-editing>

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

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

<https://zfin.org/>

<https://www.ensembl.org/index.html>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>

<https://www.uniprot.org/>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>

<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/amino-acid-structures>