



ΕΘΝΙΚΟΝ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟΝ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΝ ΑΘΗΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***IN VIVO* ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΠΟΥ ΕΠΑΓΟΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗ
ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΒΑΛΒΙΔΩΝ**

ΜΟΥΡΑΤΙΔΗ ΜΑΡΙΑ

ΑΜ: 41718

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Επιβλέπων καθηγητής : Δημήτριος Στραβοπόδης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Δημήτριος Μπέης, Ερευνητής Β', Εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών

Ισιδώρα Παπασιδέρη, Καθηγήτρια, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου και Βιοφυσικής, Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αθήνα, 2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος ευθύνονται για το θάνατο εκατομμυρίων ανθρώπων κάθε χρόνο και περιλαμβάνουν ένα μεγάλο εύρος νόσων, που οφείλονται συνήθως σε δυσπλασίες της δομής της καρδιάς. Το γεγονός αυτό έχει ωθήσει τους επιστήμονες στη διερεύνηση των μοριακών και γενετικών μηχανισμών που επιδρούν στο σχηματισμό, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη της καρδιάς προκειμένου να διαλευκάνουν τα αίτια των καρδιοπαθειών. Οι έρευνες αυτές έχουν ως απώτερο στόχο την ανακάλυψη εξειδικευμένων θεραπευτικών στρατηγικών. Το ζωικό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος είναι το *Danio rerio* (zebrafish). Ο οργανισμός αυτός εμφανίζει πολλά προτερήματα, ένα από τα οποία είναι η ικανότητα αναγέννησης της καρδιάς του. Η αναγνώριση των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν στη διαδικασία αυτή θα μπορούσε να βοηθήσει στην αξιοποίηση τους σε περίπτωση βλάβης της καρδιάς των θηλαστικών, με αποτέλεσμα την αναγέννηση της περιοχής του τραυματισμού. Διεξήχθησαν πειράματα, όπου προκλήθηκε βλάβη στις καρδιακές βαλβίδες συγκεκριμένων σειρών zebrafish, των οποίων οι καρδιές στη συνέχεια απομονώθηκαν σε διάφορες φάσεις της αναγεννητικής διαδικασίας και αναλύθηκε το μεταγράφομα τους. Ανιχνεύτηκαν κάποια γονίδια, τα οποία θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο μηχανισμό της αναγέννησης και είναι τα εξής: *snai1a*, *nr4a3*, *hhatlb*, *sfrp2* και *zgc:92518*. Κατά την παρούσα εργασία, μελετήθηκε ο φαινότυπος εμβρύων zebrafish τις πέντε πρώτες μέρες μετά τη γονιμοποίηση τους, μετά την καταστολή της μετάφρασης των γονιδίων αυτών, που πραγματοποιήθηκε με την ένεση αντισημινόντων **μορφολινοφωσφοροδιαμιδικών** ολιγομερών (ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνο). Οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν με την καταστολή και των 5 γονιδίων χαρακτηρίζονταν κυρίως από καρδιακά οιδήματα, απουσία κυκλοφορίας αίματος και μη φυσιολογική ανάπτυξη των αγγείων των εμβρύων κατά μήκος του άξονα του σώματος τους. Συνεπώς, τα γονίδια αυτά φαίνεται να συμμετέχουν στην ανάπτυξη και σχηματισμό του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish και πιθανά στη διαδικασία αναγέννησης των καρδιακών βαλβίδων του ψαριού αυτού. Συμπερασματικά, η κατανόηση του ρυθμιστικού ρόλου των γονιδίων και τα μονοπάτια τα οποία συμμετέχουν, θα μπορούσε να καταστήσει πιθανό τη διέγερση κατάλληλων μονοπατιών με σκοπό την αναγέννηση των καρδιακών βαλβίδων των θηλαστικών σε περίπτωση βλάβης.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are responsible for the deaths of millions of people each year and include a wide variety of diseases which are usually caused due to heart disorders. Thus, the scientists were triggered to investigate the molecular and genetic mechanisms which influence the differentiation, development and heart shaping in order to elucidate the causes of heart diseases. The aim of these studies is to discover specialized therapeutic strategies. The animal model *Danio rerio* (zebrafish) is widely used for the study of cardiovascular system. This organism has many advantages, one of which is the ability to regenerate its heart. Identifying the signaling pathways involved in the regeneration process would help to exploit them in a case of mammalian heart damage, to induce regeneration. Experiments were carried out, where cardiac valve injury has been induced in transgenic zebrafish lines. Following the regenerating process, the hearts were isolated at specific time points post injury and then the transcriptional signature of regenerating valves was characterized. Some genes have been identified to be induced during regeneration and we decided to further investigate their role: *snai1a*, *nr4a3*, *hhatlb*, *sfrp2* και *zgc:92518*. In the present study, we have studied the phenotypes of zebrafish embryos for five days post fertilization, which were caused by the inhibition of translation of these genes using antisense morpholino oligonucleotides. The phenotypes included cardiac edema, absence of blood circulation and abnormal development of the embryonic vessels along their body axis. Therefore, these genes appear to be involved in the development and formation of zebrafish cardiovascular system as well as probably in the regeneration process of heart valves. In conclusion, identifying the regulatory role of these genes and the pathways they participate, we might be able to stimulate the endogenous regenerating potential in mammals.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία με τίτλο «*In vivo* μελέτη γονιδίων που επάγονται κατά τη διάρκεια αναγέννησης καρδιακών βαλβίδων», εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Εφαρμογές της Βιολογίας στην Ιατρική», του τμήματος Βιολογίας του Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Το πειραματικό μέρος υλοποιήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας και Κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Δημήτρη Στραβοπόδη για την καθοδήγηση και τις ουσιώδεις συμβουλές που μου προσέφερε καθώς με βοήθησε να ασχοληθώ με ένα πολύ ενδιαφέρον τομέα της βιολογίας.

Επιπρόσθετα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και ευγνωμοσύνη μου στον Ερευνητή Β' κ. Δημήτρη Μπέη για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της εργαστηριακής του ομάδας, αλλά και για την αμέριστη υποστήριξη του όλο το διάστημα της συνεργασίας μας.

Επίσης, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην Καθηγήτρια κ. Ισιδώρα Παπασιδέρη για τη στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος και για την άριστη συνεργασία της.

Επιπλέον, ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στη μεταδιδάκτορα Μαντώ Αγάλου και τις υποψήφιες διδάκτορες Παναγιώτα Γιαρδόγλου και Ματίνα Κατράκη-Παύλου για τη βοήθεια τους, τις γνώσεις που μου προσέφεραν, την συμπαράσταση τους και το φιλικό και συνεργατικό κλίμα όλο αυτό τον καιρό.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ θέλω να το εκφράσω στην οικογένεια μου που με στηρίζει σε όλες τις αποφάσεις μου καθώς χωρίς εκείνους δεν θα μπορούσα να πραγματοποιήσω τους στόχους μου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

Anterior lateral plate mesoderm (ALPM): Μεσόδεσμα πρόσθιας πλευρικής πλάκας

Arteriosus bulbus (BA): Αρτηριακός βολβός

Atrial precursors: Πρόδρομα κύτταρα του κόλπου της καρδιάς

Atrio-ventricular (AV): Κολποκοιλιακός

Bleaching buffer: Διάλυμα απολύμανσης

Bulbus ventricular valve (BV): Αορτική βαλβίδα

Cardiomyocytes (CMs): Καρδιομυοκύτταρα

Chemical screening: Χημικός έλεγχος

CRISPR RNA (crRNA) : RNA CRISPR αλληλουχίας

Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR): Μικρές ομαδοποιημένες παλίνδρομες επαναλήψεις

Cryoinjury: Κρυοπληξία

Days post fertilization (dpf): Μέρες μετά τη γονιμοποίηση

Double deionized water (ddH₂O): Δις-απιονισμένο νερό

Dorsal enveloping layer (dEVL): Ραχιαίο περιβάλλον στρώμα

Dorso-ventral axis: Κοιλιακός άξονας

Egg Water (EW): Νερό που χρησιμοποιείται για την επώαση των αυγών zebrafish

Embryonic shield: Εμβρυϊκή ασπίδα

First heart field (FHF): Κύτταρα πρώτου καρδιακού πεδίου

Forward genetic: Ορθόδρομη γενετική

Frizzled proteins: Υποδοχείς G-πρωτεϊνών

Germ ring: Βλαστικός δακτύλιος

GuideRNA (gRNA): RNA-οδηγός

Heart Valve Tissue Engineering (HVTE): Μηχανική των ιστών των βαλβίδων της καρδιάς

Heat Shock Protein: Πρωτεΐνες θερμικού σοκ

Hours post fertilization (hpf): Ώρες μετά τη γονιμοποίηση

Hypochlorin solution: Υποχλωριώδες νάτριο 10%

Metronidazole (Mtz): Μετρονιδαζόλη

Midblastula transition (MBT): Μετάβαση του μεσοβλαστιδίου

Morpholino oligomer molecules (MO): Αντισημείοντα μορφολινοφωσφοροδιαμιδικά ολιγομερή (ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνο)

N-ethyl-N nitrosourea (ENU): N-αιθυλ-N-νιτροζουρία

Nitroreductase (NTR): Νιτρορεδουκτάση

Phenol red: Κόκκινο της φαινόλης

Pronase: Προνάση

Propylthiouracil (PTU): 1-φαινυλο 2-θιουρία

Reverse genetic: Αντίστροφη γενετική

Second heart field (SHF): Κύτταρα δεύτερου καρδιακού πεδίου

Trans-activating crRNA (TracrRNA): Trans-ενεργοποιό crRNA

Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN): Δραστικές νουκλεάσες τύπου ενεργοποίησης μεταγραφής

Ventricular precursors: Πρόδρομα κύτταρα της κοιλίας της καρδιάς

World Health Organization (WHO): Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας

Yolk Syncytial Layer (YSL): Λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα

Zinc Finger Nucleases (ZFN): Νουκλεάσες με δομή δακτύλου ψευδαργύρου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
A.1 Το ζωικό μοντέλο <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	10
A.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση και βιολογία.....	10
A.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά.....	11
A.1.3 Κύκλος ζωής.....	12
A.1.4 Στάδια ανάπτυξης.....	14
A.1.5 Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish ως πειραματικό μοντέλο.....	17
A.2 Στρατηγικές μελέτης του zebrafish (Ορθόδρομη γενετική, αντίστροφη γενετική, χημικός έλεγχος)	18
A.3 Η τεχνολογία του CRISPR-Cas9 συστήματος	21
A.4 Το zebrafish ως μοντέλο μελέτης του καρδιαγγειακού συστήματος ..	23
A.4.1 Η ανάπτυξη της καρδιάς.....	23
A.4.2 Αναγέννηση της καρδιάς του zebrafish.....	26
A.4.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί αναγέννησης της καρδιάς.....	28
A.5 Καρδιακές βαλβίδες	29
A.5.1 Αναγέννηση των καρδιακών βαλβίδων του zebrafish.....	31
A.5.1.1 <i>Snai1a</i>	32
A.5.1.2 <i>Nr4a3</i>	34
A.5.1.3 <i>Hhatlb</i>	35
A.5.1.4 <i>Sfrp2</i>	36
A.5.1.5 <i>Zgc:92518</i>	39
B.ΣΚΟΠΟΣ	40

Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
Γ.1 Πειραματόζωα.....	42
Γ.1.1 Συνθήκες διαβίωσης.....	42
Γ.1.2 Διατροφή.....	43
Γ.1.3 Διαγονιδιακές σειρές zebrafish.....	44
Γ.2 Υλικά.....	45
Γ.3.Μέθοδοι.....	46
Γ.3.1 Διασταυρώσεις ενήλικων ατόμων zebrafish.....	46
Γ.3.2 Μικροενέσεις με Αντισημαίνοντα Μορφολινοφωσφοροδιαμιδικά Ολιγομερή (MO) σε έμβρυα zebrafish.....	47
Γ.3.3 Χειρισμοί των εμβρύων zebrafish.....	49
Γ.3.4 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων-στόχων για τη σύνθεση του gRNA για το πρωτόκολλο CRISPR.....	50
Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
Δ.1 MO <i>Snai1a</i>.....	53
Δ.2 MO <i>Nr4a3</i>.....	57
Δ.3 MO <i>Hhatlb</i>.....	59
Δ.4 MO <i>Sfrp2</i>.....	60
Δ.5 MO <i>Zgc:92518</i>.....	61
Ε.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	64
ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 Το ζωικό μοντέλο *Danio rerio* (zebrafish)

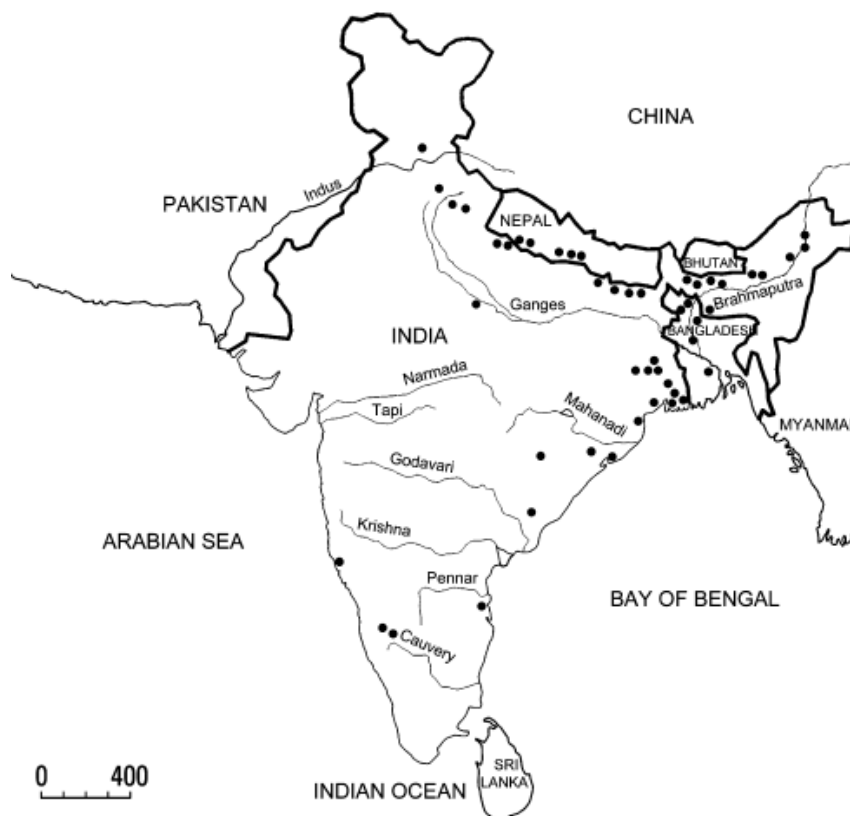
A.1.1 Γεωγραφική εξάπλωση και βιολογία

Το ψάρι zebrafish, ή αλλιώς *Danio rerio*, αποτελεί ένα από τα πιο ενδιαφέροντα μοντέλα οργανισμών που χρησιμοποιούνται στον τομέα της γενετικής, της μοριακής και αναπτυξιακής βιολογίας, της νευροφυσιολογίας και της βιοϊατρικής έρευνας. Το zebrafish ανήκει στην οικογένεια Cyprinidae, μία ομάδα σπονδυλωτών ψαριών των γλυκών νερών, τα οποία κατανέμονται στη Νότια και Νοτιοδυτική Ασία με τη μεγαλύτερη ποικιλία ειδών να εντοπίζεται στη βορειοδυτική Ινδία, στο Μπανγκλαντές και στη Μιανμάρ (Εικόνα 1). Το *Danio rerio*, περιγράφηκε πρώτα από το χειρουργό Francis Hamilton στις αρχές του 19^{ου} αιώνα (Rowena Spence et al. 2008).

Το zebrafish επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, από 6°C το χειμώνα μέχρι τους 38°C το καλοκαίρι. Είναι παμφάγα ψάρια καθώς τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτόν και έντομα αλλά και με φυτοπλαγκτόν, φύκια, αυγά ασπόνδυλων, αραχνοειδή και λέπια ψαριών. Προτιμούν περιοχές με ελαφρώς κινούμενα ή στάσιμα νερά, τις άκρες των ρευμάτων και των τάφρων αλλά και περιοχές κοντά σε καλλιέργειες ρυζιού, πιθανόν λόγω των λιπασμάτων τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη του ζωοπλαγκτού. Εντοπίζονται σε βάθος μέχρι 30 cm κάτω από την επιφάνεια του νερού, δηλαδή τμήματα όπου φτάνουν οι ακτίνες του ήλιου και υπάρχει υδρόβια βλάστηση. Επίσης, σε αυτές τις περιοχές και στα ρηχά νερά, τα ψάρια zebrafish ευδοκιμούν επειδή απουσιάζουν τα μεγάλα αρπακτικά ψάρια.

Τους πρώτους τρεις μήνες μετά την εκκόλαψη το zebrafish αναπτύσσεται με πολύ γρήγορους ρυθμούς έως τους 18 μήνες όπου σταματάει η ανάπτυξη τους. Τα ψάρια τα οποία ζουν στο εργαστήριο αυξάνονται ταχύτερα, 183 mm ανά χρόνο, σε σχέση με αυτά που ζουν στην άγρια φύση, όπου σύμφωνα με καταγραφές αυξάνονται κατά 72 mm ανά έτος. Σε αντίθεση με άλλα σπονδυλωτά μοντέλα, τα έμβρυα αυτού του είδους σχηματίζουν τις πρώτες 48 ώρες μετά την γονιμοποίηση τα περισσότερα βασικά όργανα όπως η καρδιά, κύρια αγγεία του σώματος με φυσιολογική ροή αίματος και το στομάχι. Επιπρόσθετα, σε πολύ αρχικά στάδια δημιουργούνται τα νευρωνικά, ορμονικά και παρακρινή μονοπάτια επαναλαμβανόμενης ανατροφοδότησης, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ομοίωση του

οργανισμού. Παρόλο που το καρδιακό και το μεταβολικό σύστημα του ψαριού ζέβρα σχηματίζονται νωρίς, το έμβρυο αρχικά βασίζει την επιβίωση του στην παθητική διάχυση του νερού για την πρόσληψη οξυγόνου αλλά και στα θρεπτικά συστατικά που λαμβάνει από το λεκιθικό σάκο (Gut et al. 2017).



Εικόνα 1: Γεωγραφική εξάπλωση του ψαριού zebrafish στη Νοτιοδυτική Ασία. Οι κουκίδες αντιστοιχούν στις περιοχές που ευδοκμεί το είδος αυτό. Πηγή:(Rowena Spence et al. 2008)

A.1.2 Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Το *Danio rerio* έχει ατρακτοειδές συμπιεσμένο σώμα. Το στόμα του έχει κατεύθυνση προς τα επάνω και η κάτω γνάθος προεξέχει της άνω. Το είδος αυτό χαρακτηρίζεται από μία ημιτελής πλευρική γραμμή κατά μήκος του σώματος του,

που φτάνει έως τη βάση του κοιλιακού πτερυγίου και από πέντε ως επτά μπλε σκούρες λωρίδες που εκτείνονται μέχρι το ουραίο πτερύγιο.

Τα αρσενικά και θηλυκά ψάρια zebrafish δεν έχουν εμφανείς διαφορές στα χρωμοσώματα τους γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει χρωμόσωμα που να ορίζει το φύλο. Οι επιστήμονες θεωρούν, λοιπόν, ότι εκτός από γενετικούς παράγοντες συμμετέχουν και κάποιες περιβαλλοντικές επιδράσεις στον καθορισμό του φύλου.

Ο διαχωρισμός ενός αρσενικού και ενός θηλυκού ατόμου βασίζεται στο σχήμα και το χρώμα του σώματος. Τα αρσενικά ψάρια χαρακτηρίζονται από μακρόστενο σώμα στο οποίο οι μπλε λωρίδες εναλλάσσονται με ρίγες χρυσής απόχρωσης. Αντίθετα, τα θηλυκά έχουν μεγαλύτερη κοιλιά με ανοιχτό ασημί χρώμα, η οποία προεξέχει του σώματος από την εμπρόσθια όψη. Επιπλέον, ανάμεσα στις μπλε λωρίδες εμφανίζονται ασημένιες ρίγες, ενώ το ραχιαίο πτερύγιο τους έχει μία πιο έντονη κίτρινη απόχρωση (Nasiadka and Clark 2012).



Εικόνα 2: A) Αρσενικό ψάρι zebrafish B) Θηλυκό ψάρι zebrafish. Πηγή:(Avdesh et al. 2012)

A.1.3 Κύκλος ζωής

Αρχικά σε όλα τα ψάρια zebrafish οι γονάδες εξελίσσονται σε ανώριμες ωοθήκες και τις πρώτες 5-7 εβδομάδες μετά την εκκόλαψη ξεκινάει η διαφοροποίηση τους. Στα θηλυκά άτομα αναπτύσσονται ώριμες ωοθήκες, ενώ στα αρσενικά οι

ανώριμες ωοθήκες εκφυλίζονται με τη διαδικασία της απόπτωσης και σχηματίζονται φυσιολογικοί όρχεις. Αυτή η διαδικασία ολοκληρώνεται περίπου τον 3^ο μήνα ζωής. Η διάρκεια του σταδίου διαφοροποίησης των όρχεων εξαρτάται από τις συνθήκες καταπόνησης του ψαριού αλλά και από τη διατροφή του. Μέχρι σήμερα δεν είναι γνωστός ο γενετικός μηχανισμός καθορισμού του φύλου. Ωστόσο, μελέτες δείχνουν ότι η διαθεσιμότητα της τροφής και οι ρυθμοί ανάπτυξης επηρεάζουν την διαφοροποίηση αυτή καθώς τα ψάρια με ταχύτερους ρυθμούς εξελίσσονται σε θηλυκά άτομα, ενώ αυτά με πιο αργούς ρυθμούς ανάπτυξης σε αρσενικά. Δεν θα μπορούσαν να παραλειφθούν κάποιοι ακόμα περιβαλλοντικοί παράγοντες που παίζουν ρόλο στον καθορισμό του φύλου όπως είναι η πυκνότητα του πληθυσμού των ψαριών, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων, οι εξωγενείς στεροειδείς ορμόνες που απελευθερώνονται και η θερμοκρασία του νερού (Lawrence, Ebersole, and Kesseli 2008).

Τα zebrafish που ζουν στο εργαστήριο διατηρούν την αναπαραγωγική ικανότητα τους όλο τον χρόνο σε αντίθεση με αυτά που ζουν στη φύση τα οποία φαίνεται να είναι εποχικά ψάρια. Ωστόσο, μελέτες κατά τις οποίες συλλέχθηκαν θηλυκά ψάρια τον μήνα Ιανουάριο, δηλαδή εκτός της αναπαραγωγικής περιόδου, έδειξαν ότι αυτά είχαν ώριμα ωάρια εκείνη την εποχή. Είναι πολύ πιθανό, λοιπόν, η εποχικότητα που παρατηρείται στην αναπαραγωγή των zebrafish να οφείλεται στην έλλειψη διαθεσιμότητας τροφής κάποιους μήνες τον χρόνο με αποτέλεσμα να καθίστανται μη αναπαραγωγικά (R. Spence et al. 2006).

Τα ψάρια *Danio rerio* αποτελούν φωτόκους οργανισμούς, που απελευθερώνουν αυγά σε ομάδες, τα οποία δεν έχουν συγκολλητικές ιδιότητες. Οι ιχθύες αυτοί χαρακτηρίζονται από υψηλή γονιμότητα καθώς ένα θηλυκό μπορεί να απελευθερώσει εκατοντάδες αυγά όταν ζευγαρώσει με ένα μόνο αρσενικό. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι στην αναπαραγωγή αυτού του είδους τα οσφρητικά σήματα που ανταλλάσει ένα ζεύγος βοηθούν στο συγχρονισμό των ατόμων με σκοπό να επιτευχθεί η γονιμοποίηση. Για να ζευγαρώσουν δύο άτομα απαιτούνται πολλές ώρες, μία ολόκληρη νύχτα συνήθως, όπου οι φερομόνες των αρσενικών γονάδων που απελευθερώνονται πυροδοτούν την έναρξη της ωορρηξίας των θηλυκών. Στη συνέχεια, τα θηλυκά παράγουν στεροειδή γλυκουρονίδια και έτσι προσελκύουν τα αρσενικά (Nasiadka and Clark 2012). Επιπρόσθετα, ένας άλλος ρόλος των οσφρητικών σημάτων είναι η αναγνώριση των συγγενών ψαριών. Τα ενήλικα θηλυκά

φαίνεται να προτιμούν τα μη συγγενή αρσενικά άτομα με σκοπό την αποφυγή του ζευγαρώματος που μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη γονιμότητα και επιβίωση των απογόνων εξαιτίας μεταλλάξεων (Gerlach and Lysiak 2006; Nasiadka and Clark 2012).

Μελετητές ύστερα από συμπεριφορικά πειράματα έχουν παρατηρήσει ότι η επιλογή του αρσενικού συντρόφου από τα θηλυκά εξαρτάται από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του ατόμου. Με άλλα λόγια, ο χρωματισμός των αρσενικών καροτενοειδών, οι μελανοφόρες λωρίδες και η συμμετρία του ουραίου πτερυγίου επηρεάζουν την απόφαση των θηλυκών ψαριών. Επίσης, το μέγεθος του ατόμου φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο καθώς τα θηλυκά γενούν καλύτερα αυγά όταν ζευγαρώνουν με αρσενικά μεγαλύτερου μεγέθους.

Πριν τη γονιμοποίηση προηγούνται δύο στάδια. Αρχικά, το αρσενικό κολυμπάει κοντά στο θηλυκό κάνοντας απότομες κινήσεις. Έπειτα, αγγίζει τη μία πλευρά του σώματος του θηλυκού ή την ουρά του με τη μύτη ή το κεφάλι του και κάνει κύκλους γύρω του. Τέλος, στο στάδιο της γονιμοποίησης το θηλυκό κολυμπάει διπλά στο αρσενικό προς την ίδια κατεύθυνση προκειμένου να ευθυγραμμιστούν οι γενετικοί πόροι τους. Τότε, η ουρά του αρσενικού ταλαντώνεται με γρήγορες κινήσεις προς το μέρος του θηλυκού, το οποίο βρίσκεται στη φάση της ωορηξίας, απελευθερώνοντας σπερματοζώαρια. Κατόπιν, τα θηλυκά απελευθερώνουν και αυτά τα αυγά τους, τα οποία γονιμοποιούνται από τα σπερματοζώαρια που βρίσκονται στο νερό (Nasiadka and Clark 2012).

A.1.4 Στάδια ανάπτυξης

Με τη γονιμοποίηση του αυγού από ένα σπερματοζώαριο δημιουργείται το ζυγωτό, το οποίο έχει διάμετρο περίπου 0,7 mm τη στιγμή εκείνη (Εικόνα 3A). Η πρώτη κυτταρική διαίρεση θα πραγματοποιηθεί 40 λεπτά αργότερα στο βλαστόδισκο, ο οποίος εντοπίζεται στο ζωικό πόλο. Η περίοδος των αυλακώσεων, η οποία διαρκεί 40 λεπτά μέχρι 2¼ ώρες μετά τη γονιμοποίηση (hours post fertilization, hpf) περιλαμβάνει τους κυτταρικούς κύκλους 2-7. Οι διαιρέσεις αυτές έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό των βλαστομεριδίων (Kimmel et al. 1995). Το πρότυπο αυλάκωσης είναι μεροβλαστικό, καθώς οι κυτταροπλασματικές διαιρέσεις περιορίζονται πάνω από τη λέκιθο συγκρατώντας τα βλαστομερίδια σε μία συμπαγή

μάζα. Με τη βοήθεια κυτταροπλασματικών γεφυρών αυτά διατηρούνται προσδεμένα στην κύρια λεκιθική μάζα. Στο τέλος της περιόδου αυτής το έμβρυο θα βρίσκεται στο στάδιο των 64 κυττάρων (Εικόνα 3B).

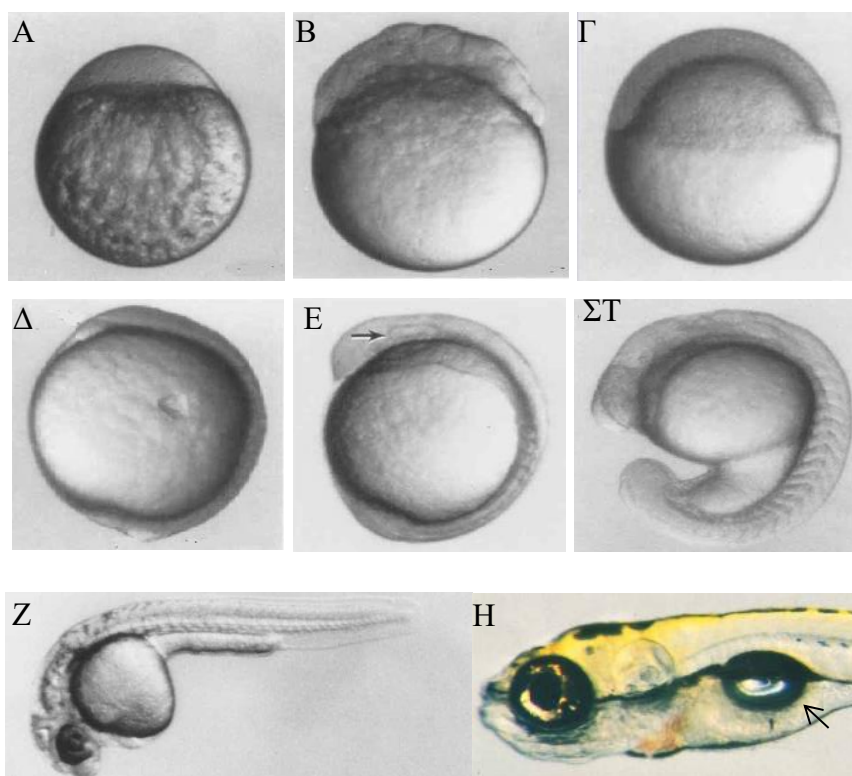
Ακολουθεί το στάδιο του βλαστιδίου ($2\frac{1}{4}$ - $5\frac{1}{4}$ hpf), όπου τα βλαστομερίδια έχουν ένα σχηματισμό ημικυκλίου, ο οποίος με τη διαδοχή των κυτταρικών διαιρέσεων γίνεται όλο και πιο λεπτός. Αυτός ο σχηματισμός ονομάζεται βλαστόδερμα. Σε αυτό το στάδιο, το έμβρυο εισέρχεται στη φάση της μετάβασης του μεσοβλαστιδίου (midblastula transition, MBT), δημιουργείται η λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (yolk syncytial layer, YSL) και ξεκινάει η διαδικασία της επιβολής. Κατά την MTB διακρίνεται στο έμβρυο από τον ζωικό προς το φυτικό πόλο, η καλυπτήρια στιβάδα, τα κύτταρα βάθους, η YSL και η λέκιθος. Η επιβολή αφορά την επέκταση του βλαστοδέρματος και της YSL προς το φυτικό πόλο. Ο βαθμός εξάπλωσης του βλαστοδέρματος, δηλαδή το ποσοστό επιβολής, καθιστά δυνατή την αναγνώριση του σταδίου όπου βρίσκεται το έμβρυο.

Στη συνέχεια, το βλαστόδερμα αρχίζει να επεκτείνεται σταδιακά προς το φυτικό πόλο και από τα δύο άκρα του ώσπου να καλύψει ολόκληρο το λεκιθικό κύτταρο, 100% επιβολή. Αυτό αποτελεί το στάδιο της γαστριδίωσης ($5\frac{1}{4}$ - 10 hpf). Στην αρχή της περιόδου αυτής, όπου παρατηρείται 50% επιβολή (Εικόνα 3Γ), το χείλος του βλαστοδέρματος αναδιπλώνεται εσωτερικά και σχηματίζεται μία πάχυνση, η οποία καλείται βλαστικός δακτύλιος (germ ring). Κατόπιν, στην περιοχή αυτή και πιο συγκεκριμένα κατά μήκος του δακτυλίου παρατηρείται συσσώρευση κυττάρων με συνέπεια τη δημιουργία μίας στιβάδας που ονομάζεται εμβρυϊκή ασπίδα (embryonic shield). Στο τέλος της γαστριδίωσης (10 hpf), στο ένα άκρο του εμβρυϊκού άξονα συγκεντρώνεται μία μάζα κυττάρων από την οποία θα προκύψει το ουριαίο πτερύγιο και κατά μήκος όλου του άξονα φαίνεται να σχηματίζεται η νευρική πλάκα, η πάχυνση της οποίας είναι πιο έντονη στο ζωικό πόλο. Στο σημείο αυτό θα δημιουργηθεί το κεφάλι του ψαριού (Εικόνα 3Δ).

Τη γαστριδίωση ακολουθεί η περίοδος της κατάτμησης (10-24 hpf), κατά την οποία παρατηρούνται οι πρώτες κινήσεις του εμβρύου, ξεκινάει ο σχηματισμός της ουράς και εμφανίζονται διαδοχικά οι σωμίτες στον κορμό και στην ουρά. Επίσης, σε αυτή τη φάση πραγματοποιείται η νευριδίωση και το σώμα του εμβρύου επιμηκώνεται (Εικόνα ΣΤ). Το επόμενο στάδιο είναι το φυλοτυπικό (24-48 hpf), όπου

ξεκινάει ο σχηματισμός των πτερυγίων, η καρδιά γίνεται ορατή, εμφανίζονται τα πρώτα μελανοφόρα κύτταρα στο δέρμα και τους οφθαλμούς και αναπτύσσεται το κυκλοφορικό σύστημα (Εικόνα 3Z).

Στο στάδιο της εκκόλαψης (48-72 hpf) επιτυγχάνεται η πρώιμη οργανογένεση των βασικών εσωτερικών οργάνων (συκώτι, στομάχι, νεφροί), τα ψάρια έχουν απελευθερωθεί από το χόριο και χαρακτηρίζονται από έντονες και αυθόρμητες κινήσεις. Επιπλέον, σε αυτή τη περίοδο δημιουργούνται οι βραγχιακές σχισμές και τα βραγχιακά τόξα. Μετά την 3^η μέρα το zebrafish περνάει στο στάδιο της πρώιμης προνύμφης όπου ο λεκιθικός σάκος αρχίζει να εξαφανίζεται και η νηκτική κύστη διογκώνεται με αποτέλεσμα το ψάρι να μπορεί να κολυμπάει ενεργά. Επίσης, έχει τη δυνατότητα να κουνάει τα πτερύγια του, τα μάτια και τις γνάθους του. Έτσι λοιπόν, σε αυτή την περίοδο η προνύμφη αποκτά την ικανότητα αποφυγής ερεθισμάτων, αρχίζει να αναπνέει και βρίσκεται προς αναζήτηση τροφής (Εικόνα 3H) (Kimmel et al. 1995).



Εικόνα 3: Αναπτυξιακά στάδια του *Danio rerio*. A) Ζυγωτό. B) Στάδιο 64 κυττάρων. Γ) Στάδιο 50% επιβολής. Δ) Έμβρυο στην τελική φάση της γαστριδίωσης. E) Στάδιο 4 σωμιτών. Το τόξο δείχνει τα οπτικά κυστίδια που αρχίζουν να σχηματίζονται. ΣΤ) 4 σωμιτών. Ζ) Λαρυμνίσκος. Η) Λαρυμνίσκος. Το τόξο δείχνει τα οπτικά κυστίδια που αρχίζουν να σχηματίζονται.

Στάδιο 17 σωματιών. Ξεκινάει η έκταση του σώματος του εμβρύου. Ζ) Έμβρυο στις 28hpf όπου παρατηρούνται μελανοφόρα κύτταρα από το κεφάλι μέχρι τη μέση του λεκιθικού σάκου. Η) Στάδιο πρώιμης προνύμφης. Το βέλος δείχνει τη νηκτική κύστη. Πηγή:(Kimmel et al. 1995)

A.1.5 Πλεονεκτήματα χρήσης του zebrafish ως πειραματικό μοντέλο

Οι ιχθύες ως μία πολυπληθής και φυλογενετικά διαφορετική ομάδα σπονδυλωτών οργανισμών αξιοποιούνται συχνά σε μελέτες που σχετίζονται με τη φυσιολογία, την ανάπτυξη και τις ασθένειες των σπονδυλωτών. Το *Danio rerio* είναι ένα μοντέλο, το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως σε εργαστήρια από όλο τον κόσμο με σκοπό την επίλυση διάφορων βιοιατρικών ερωτημάτων, καθώς φέρει πολλά προτερήματα.

Τα ψάρια zebrafish αναπαράγονται με εξωτερική γονιμοποίηση και κατ' επέκταση αναπτύσσονται μόνα τους ελεύθερα στο νερό και όχι στο σώμα του θηλυκού ατόμου, με συνέπεια να μπορούμε να παρατηρούμε και να πραγματοποιούμε χειρισμούς στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Ένα κύριο πλεονέκτημα τους είναι ότι μέσα σε μόνο 3 με 4 μήνες ωριμάζουν σε ενήλικα άτομα και όταν φυλάσσονται σε ενυδρεία με κατάλληλες συνθήκες μπορούν να ζευγαρώνουν όλο το χρόνο (Spitsbergen and Kent 2004). Επιπλέον, ένα μεμονωμένο υγιές ζευγάρι zebrafish μπορεί να γεννήσει παραπάνω από 200 έμβρυα την εβδομάδα, γεγονός που καθιστά τις στατιστικές μελέτες πιο έγκυρες και ακριβείς. Το έμβρυο zebrafish αναπτύσσεται ταχύτατα, με τα περισσότερα όργανα του να έχουν σχηματιστεί και να είναι λειτουργικά τις πρώτες 5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Έτσι λοιπόν, αποτελεί ένα μοντέλο κατάλληλο για αναπτυξιακές μελέτες (Beis and Stainier 2006).

Επιπρόσθετα, η εκτροφή των οργανισμών αυτών στο ενυδρείο αλλά και η διεκπεραίωση μελετών σε αυτά είναι χαμηλού κόστους εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους σε σχέση με τη χρήση άλλων θηλαστικών πειραματόζωων (Spitsbergen and Kent 2004). Ακόμη, ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα του zebrafish είναι ότι μπορούμε εύκολα να επεμβαίνουμε στο γονιδίωμα του. Έτσι λοιπόν, μεταλλαγμένα και διαγονιδιακά ψάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μοριακές μελέτες που αφορούν διάφορες ασθένειες. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι προνύμφες είναι διάφανες και όταν φέρουν ένα διαγονίδιο μπορούν να εκφράζουν φθορίζουσες

πρωτεΐνες σε κύτταρα που εντοπίζονται σε συγκεκριμένα όργανα με αποτέλεσμα να καθίσταται δυνατή η μή επεμβατική *in vivo* παρακολούθηση της οργανογένεσης (Faillaci et al. 2018).

Τέλος, το γενετικό υλικό του zebrafish έχει αλληλουχηθεί πλήρως και έχει βρεθεί ότι διαθέτει πολλά ορθόλογα γονίδια με τον άνθρωπό. Πιο συγκεκριμένα, σε επίπεδο πρωτεϊνών παρατηρείται 71% ομολογία (MacRae and Peterson 2015). Είναι ένα μοντέλο, λοιπόν, που μπορούμε να χειριστούμε για να καταστήσουμε την έκφραση γονιδίων προκειμένου να μελετήσουμε τη λειτουργία τους με σκοπό την κατανόηση διάφορων διεργασιών αλλά και ασθενειών που αφορούν τον άνθρωπο.

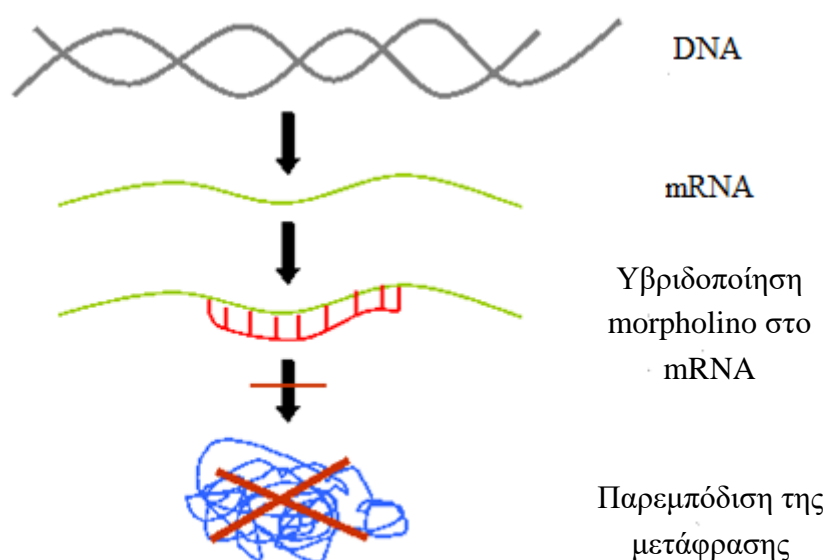
A.2 Στρατηγικές μελέτης του zebrafish (Ορθόδρομη γενετική, αντίστροφη γενετική, χημικός έλεγχος)

Η ανάπτυξη της ορθόδρομης και αντίστροφης γενετικής στην έρευνα έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση της γενετικής βάσης πολλών ανθρώπινων ασθενειών. Το zebrafish αποτελεί ένα μοντέλο στο οποίο εφαρμόζονται αυτές οι στρατηγικές επιτυχώς. Ουσιαστικά, η ορθόδρομη γενετική αποκαλύπτει τη γενετική βάση μίας νόσου, ενώ η αντίστροφη γενετική διερευνά το αν και με ποιο τρόπο ένα γονίδιο σχετίζεται με το φαινότυπο που εμφανίζεται σε μία ασθένεια (Gurumurthy et al. 2016).

Η μεθοδολογία της ορθόδρομης γενετικής (forward genetic) περιλαμβάνει την πρόκληση τυχαίας μεταλλαξιγένεσης με τη χρήση μεταλλαξιογόνων ουσιών, όπως είναι η N-αιθυλ-N-νιτροζουρία (N-ethyl-N nitrosourea, ENU), με συνέπεια την εμφάνιση διάφορων φαινοτύπων στον οργανισμό. Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να μελετήσουμε τα γονίδια που εμπλέκονται σε συγκεκριμένες αναπτυξιακές διαδικασίες και σε διάφορες ασθένειες (Gut et al. 2017).

Η τεχνολογία της αντίστροφης γενετικής (reverse genetic) εφαρμόζεται στο ψάρι ζέβρα έχοντας ως στόχο την κατανόηση του λειτουργικού ρόλου γονιδίων. Η πιο γνωστή τεχνική για την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης αποτελεί η ένεση με αντισημαίνοντα **μορφολινοφωσφοροδιαμίδικά** ολιγομερή ή αλλιώς ολιγονουκλεοτίδια μορφολίνο (morpholino oligomer molecules, MO) σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου (Giardoglou and Beis 2019). Τα MOs είναι

χημικά σχεδιασμένα ολιγομερίδια, μήκους περίπου 22 νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι συμπληρωματικά με τμήματα των mRNA γονιδίων, παρεμποδίζοντας έτσι τη μετάφραση ή το μάτισμα. Συνεπώς, δεν παράγεται η εκάστοτε πρωτεΐνη και με την παρατήρηση των φαινοτύπων που εμφανίζονται τις πρώτες 5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση μπορούμε να καταλάβουμε τη συσχέτιση ενός γονιδίου με μία συγκεκριμένη αναπτυξιακή λειτουργία.



Εικόνα 4: Τα μόρια morpholino υβριδοποιούνται στο mRNA βάση συμπληρωματικότητας με αποτέλεσμα να μην παράγεται η πρωτεΐνη. Πηγή:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techmorpholino/>

Ο φαινότυπος που προκαλείται από ένεση με MO συνήθως είναι πιο σοβαρός από αυτόν που εμφανίζει ένα άτομο που έχει μεταλλαγή στο συγκεκριμένο γονίδιο. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε διάφορους λόγους, όπως στο γεγονός ότι στα μεταλλαγμένα ζυγωτά μπορεί να γίνεται φαινοτυπική διάσωση από μητρικά φυσιολογικά mRNAs που υπάρχουν σε αυτά, τα οποία καταστέλλονται από τα MOs. Επίσης, είναι πιθανό να πραγματοποιείται γενετική επιδιόρθωση στα μεταλλαγμένα άτομα ή ακόμη μπορεί τα MOs να προσδεθούν σε περιοχές εκτός στόχου (Stainier et al. 2017).

Η αντίστροφη γενετική περιλαμβάνει και εργαλεία τα οποία έχουν αναπτυχθεί ραγδαία τα τελευταία χρόνια, με τη βοήθεια των οποίων επιτυγχάνεται η ενσωμάτωση ενός τμήματος DNA, η διαγραφή ή η αντικατάσταση κάποιων νουκλεοτιδίων στο γονιδίωμα ενός ζωντανού οργανισμού. Τα εργαλεία αυτά αφορούν νουκλεάσες, οι οποίες κόβουν το DNA σε επιθυμητές θέσεις και στη συνέχεια ακολουθεί η επιδιόρθωση του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται στοχευόμενες μεταλλάξεις. Οι πιο κοινές νουκλεάσες που χρησιμοποιούνται είναι οι νουκλεάσες ψευδαργύρου (Zinc Finger Nucleases), οι νουκλεάσες TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) και το σύστημα CRISPR-Cas9. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μεταλλαγμένες σειρές zebrafish, που φέρουν συγκεκριμένους φαινότυπους. Επομένως, σε μία μελέτη θα πρέπει να χρησιμοποιούνται και να συγκρίνονται τα μεταλλαγμένα άτομα με τα έμβρυα που έχουν ενεθεί με MO προκειμένου να εξακριβώνεται και να γίνεται καλύτερα αντιληπτός ο λειτουργικός ρόλος των γονιδίων (Stainier et al. 2017).

Επιπρόσθετα, το zebrafish χρησιμοποιείται για μελέτες που αφορούν χημικούς ελέγχους (chemical screening) διάφορων ουσιών ή φαρμάκων. Ουσιαστικά, η έκθεση ενός οργανισμού σε μία ουσία έχει το πλεονέκτημα ότι μπορούμε να ελέγξουμε όλες τις αλληλεπιδράσεις που μπορεί να έχει με οποιαδήποτε βιολογική οδό σε αντίθεση με πειράματα που πραγματοποιούνται σε κυτταρικές σειρές. Επίσης, εξετάζεται η τοξικότητα της ουσίας, η βιομετατροπή της από το μεταβολισμό του οργανισμού και η φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική του εκάστοτε φαρμάκου.

Με τη μεθοδολογία του χημικού ελέγχου μπορούν να παρατηρηθούν διάφοροι φαινότυποι στο ψάρι ζέβρα, όπως αλλαγές στη συμπεριφορά αλλά και μεταβολές στην έκφραση γονιδίων σε ολόκληρο τον οργανισμό ή σε συγκεκριμένους ιστούς λόγω της χημικής δράσης μιας ουσίας. Μελέτες έχουν δείξει ότι το 50-70% των χημικών ουσιών που έχουν δοκιμαστεί στο zebrafish παρουσιάζουν τα ίδια αποτελέσματα με πειράματα που έχουν γίνει σε καλλιέργειες θηλαστικών κυττάρων. Σε ένα έμβρυο zebrafish το φάρμακο θα διεισδύσει μέσω του χορίου, της επιδερμίδας ή μέσω του πεπτικού συστήματος, ενώ σε μια προνύμφη ή σε ένα ενήλικο άτομο μέσω των βραγχίων (Wiley, Redfield, and Zon 2017). Η στρατηγική που ακολουθείται περιλαμβάνει τη γονιμοποίηση των κατάλληλων στελεχών, τη συλλογή των εμβρύων και τη μεταφορά τους σε ένα πιάτο από 96 πηγαδάκια, όταν αυτά

βρίσκονται στο επιθυμητό αναπτυξιακό στάδιο, στα οποία θα προστεθεί μία ή διαφορετικές ουσίες στο καθένα (Brady, Rennekamp, and Peterson 2016).

Στο zebrafish έχουν εφαρμοστεί πολλές θεωρίες, οι οποίες σχετίζονται με τον καρκίνο. Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι μεταφέροντας σε ένα ψάρι κάποια καρκινικά κύτταρα από τον ασθενή, μπορούμε να παρατηρήσουμε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, την πορεία της αγγειογένεσης του όγκου, την ικανότητα μετάστασης αλλά και να εντοπίσουμε πιο φάρμακο είναι καταλληλότερο για την θεραπεία που θα λάβει ο συγκεκριμένος ασθενής. Συνεπώς, ελέγχοντας την πρόοδο ενός όγκου στο zebrafish μπορούμε να προβλέψουμε την εξέλιξη της νόσου με σκοπό τη χορήγηση της πιο αποτελεσματικής θεραπείας (Bootorabi et al. 2017).

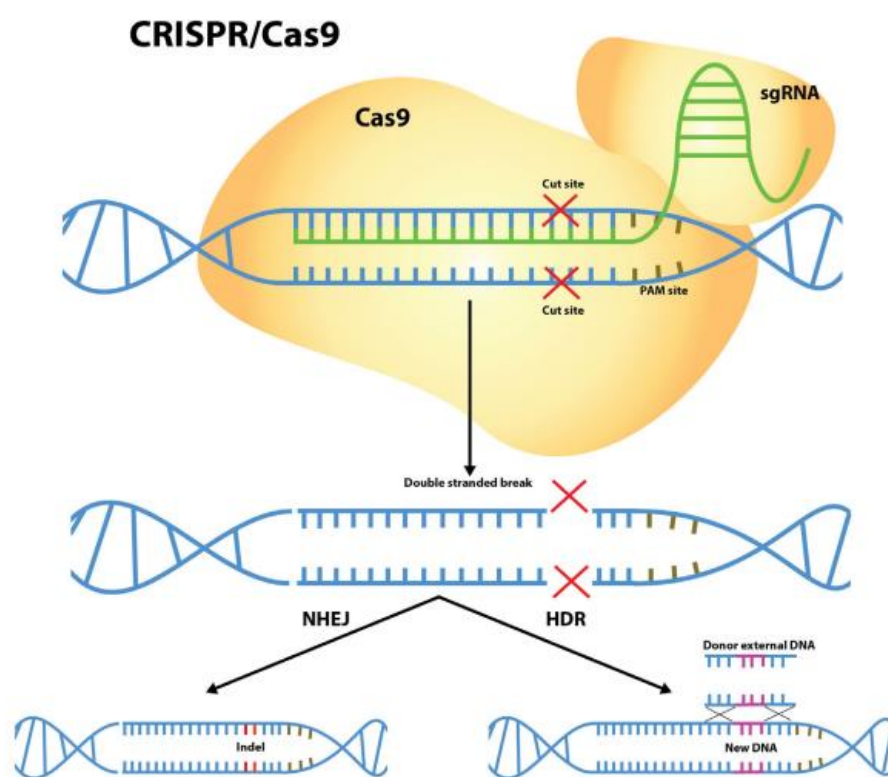
A.3 Η τεχνολογία του CRISPR-Cas9 συστήματος

Οι ερευνητές μελέτησαν το σύστημα CRISPR-Cas9 στο βακτήριο *Streptococcus pyogenes*. Το σύστημα αυτό αφορά μικρές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (CRISPR) του βακτηριακού DNA, οι οποίες έχουν μήκος 20-40 νουκλεοτιδίων και έχουν εντοπιστεί στο 40% των βακτηριακών γονιδιωμάτων και στο 90% των αρχαίων. Ανάμεσα σε αυτές τις αλληλουχίες εντοπίζονται μικρά τμήματα ξένου DNA που ονομάζονται spacer DNA, τα οποία έχουν ενσωματωθεί στο βακτηριακό γονιδίωμα κατά τις προηγούμενες εκθέσεις του μικροοργανισμού σε ένα φάγο ή ιό. Σε αυτό διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο μικρές ομάδες γονιδίων *cas*, οι οποίες βρίσκονται κοντά στις CRISPR αλληλουχίες. Ένα από αυτά κωδικοποιεί τη νουκλεάση Cas9.

Με την είσοδο ενός ξένου DNA, οι πρωτεΐνες Cas1 και Cas2 το αναγνωρίζουν, το κόβουν και ενσωματώνουν ένα τμήμα του στο βακτηριακό γονιδίωμα και συγκεκριμένα ανάμεσα σε δύο CRISPR αλληλουχίες. Στη συνέχεια, θα παραχθεί η Cas9 πρωτεΐνη, στην οποία θα εφαρμόσει το μετάγραφο του spacer και της αντίστοιχης CRISPR αλληλουχίας που το ακολουθεί (crRNA). Προκειμένου να δράσει η Cas9 απαιτείται ένα ακόμη RNA, το tracrRNA, ένα τμήμα του οποίου είναι συμπληρωματικό με κομμάτι του crRNA. Όταν αυτά τα δύο μέταγραφα υβριδοποιηθούν θα σχηματίσουν ένα ενιαίο RNA το οποίο ονομάζεται guideRNA (gRNA). Τέλος, η Cas9 με τη βοήθεια του gRNA, αναγνωρίζει το κομμάτι του ξένου

DNA που έχει ενσωματωθεί στο βακτηριακό γενετικό υλικό και το καταστρέφει (Cong et al. 2013).

Το σύστημα CRISPR-Cas9 έχει ξεχωρίσει και χρησιμοποιείται ευρέως από πολλούς επιστήμονες της βιοιατρικής από όλο τον κόσμο. Η νουκλεάση Cas9 έχοντας ως οδηγό ένα guide RNA, εντοπίζει το τμήμα-στόχο του DNA και το κόβει. Κατόπιν, επιτυγχάνεται η επιδιόρθωση του γενετικού υλικού με μη ομόλογη ένωση άκρων ή με ομόλογο ανασυνδυασμό (Doudna and Charpentier 2014). Έτσι, λοιπόν, μπορούν να προκληθούν μεταλλάξεις με σκοπό τη μελέτη γονιδίων.



Εικόνα 5: Ο μηχανισμός του CRISPR-Cas9 συστήματος. Πηγή:(Cribbs and Perera 2017)

Το εργαλείο αυτό, το οποίο αποτελεί έναν ενδογενή αμυντικό μηχανισμό των βακτηρίων και των αρχαίων σε εξωγενές DNA, χρησιμοποιείται και για θεραπευτικούς σκοπούς. Η τεχνική CRISPR είναι αρκετά οικονομική, με μεγάλη απόδοση και ειδικότητα. Επίσης, είναι εύκολη στο σχεδιασμό, ενώ μπορεί να τροποποιεί ταυτόχρονα περισσότερα από ένα γονίδια, χρησιμοποιώντας διαφορετικά

gRNAs. Αυτή η ιδιότητα παρέχει τη δυνατότητα αντιμετώπισης πολυγονιδιακών νόσων (Memi, Ntokou, and Papangeli 2018).

A.4 Το zebrafish ως μοντέλο μελέτης του καρδιαγγειακού συστήματος

Σύμφωνα με ευρήματα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO), οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος οδηγούν στον θάνατο περίπου 17,9 εκατομμυρίων ανθρώπων ετησίως, αριθμός που αντιστοιχεί στο 31% των θανάτων παγκοσμίως (Giardoglou and Beis 2019). Η μελέτη των κυτταρικών, μοριακών και γενετικών μηχανισμών, που συμμετέχουν στο σχηματισμό, τη διαφοροποίηση και την ανάπτυξη της καρδιάς θα βοηθήσει στην κατανόηση των νόσων αυτών αλλά και στην εύρεση στοχευόμενης θεραπείας.

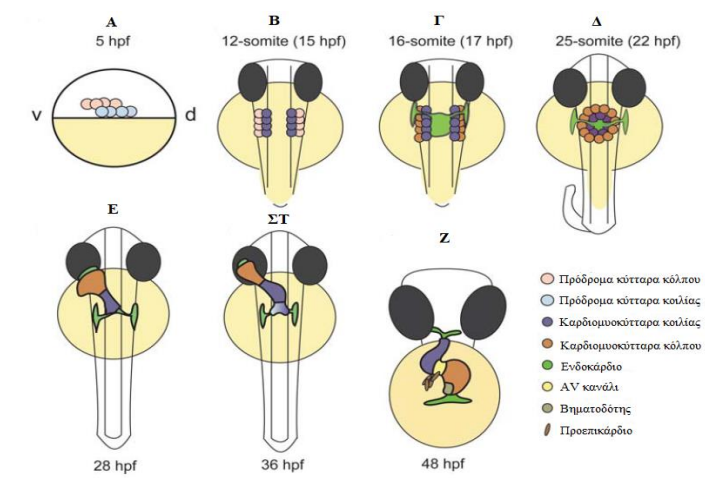
Το zebrafish αποτελεί ένα αρκετά κατάλληλο ζωικό μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης της καρδιάς καθώς διαθέτει κάποια ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Ένα από αυτά είναι ότι η εξωτερική ανάπτυξη των εμβρύων επιτρέπει τη μη επεμβατική παρατήρηση της ανάπτυξης της καρδιάς. Επίσης, τα έμβρυα στις πρώτες μέρες μετά τη γονιμοποίηση προσλαμβάνουν το οξυγόνο που χρειάζονται με παθητική διάχυση και δεν εξαρτώνται από το καρδιαγγειακό τους σύστημα. Ως εκ τούτου, τα ψάρια στα οποία έχουν προκληθεί μεταλλάξεις σε γονίδια που σχετίζονται με το σχηματισμό της καρδιάς μπορούν να επιβιώσουν και να συνεχίσουν να αναπτύσσονται για κάποιες μέρες, γεγονός που διευκολύνει τη μελέτη του φαινοτύπου τους. Παρόλο που τα zebrafish διαθέτουν μία απλούστερη σε δομή καρδιά, πολλά γονίδια που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη της διατηρούνται σε όλους τους σπονδυλωτούς οργανισμούς (J. Liu and Stainier 2012).

A.4.1 Η ανάπτυξη της καρδιάς

Το πρώτο στάδιο ανάπτυξης της καρδιάς αφορά τη διαφοροποίηση των μυοκαρδιακών και ενδοκαρδιακών προγονικών κυττάρων. Τα πρώτα αποτελούνται από τα πρόδρομα κύτταρα του κόλπου (atrial precursors) και τα πρόδρομα κύτταρα της κοιλίας (ventricular precursors), τα οποία ανιχνεύονται στο στάδιο του βλαστιδίου στην πλευρική οριακή ζώνη και στις δύο πλευρές του εμβρύου (Εικόνα 6A). Κατά τη διάρκεια της γαστριδίωσης τα προγονικά καρδιακά κύτταρα

κατευθύνονται προς το μεσόδερμα της πρόσθιας πλευρικής πλάκας (anterior lateral plate mesoderm, ALPM). Στο στάδιο των 12 με 15 σωματιών (15hpf) επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων του μυοκαρδίου, τα οποία τοποθετούνται σε αμφίπλευρες περιοχές στο ALPM (Εικόνα 6B,Γ). Κατόπιν, αυτά συγχωνεύονται δημιουργώντας ένα δίσκο, που στο κέντρο του εντοπίζονται κύτταρα του ενδοκαρδίου (Εικόνα 6Δ). Από την περιοχή του ALPM, που προέρχεται το ενδοκάρδιο, έχει αποδειχθεί ότι δημιουργούνται και τα αιμοποιητικά κύτταρα προγονικής μυελογενούς προέλευσης (Bakkers 2011).

Στη συνέχεια, ο δίσκος αυτός επιμηκύνεται σε ένα γραμμικό σωλήνα, ο οποίος αποτελείται από κύτταρα του κόλπου, της κοιλίας και του ενδοκαρδίου, κύτταρα δηλαδή του πρώτου καρδιακού πεδίου (First heart field, FHF). Σε ένα δεύτερο στάδιο, πληθυσμοί καρδιακών κυττάρων που δεν έχουν διαφοροποιηθεί ακόμη στρατολογούνται στο γραμμικό σωλήνα της καρδιάς και τον εκτείνουν προς τους αρτηριακούς και φλεβικούς πόλους (28hpf) (Εικόνα 6E). Αυτοί οι πληθυσμοί χαρακτηρίζονται ως κύτταρα του δεύτερου καρδιακού πεδίου (Second heart field, SHF). Έτσι, ο καρδιακός γραμμικός σωλήνας κατευθύνεται προς την αριστερή πλευρά του εμβρύου και δημιουργεί ένα βρόγχο (Εικόνα 6ΣΤ). Στις 48 hpf η συστρεφόμενη καρδιά εντοπίζεται στην περικαρδιακή κοιλότητα και διαχωρίζεται σε δύο θαλάμους λόγω της συστολής του κολποκοιλιακού (atrio-ventricular, AV) καναλιού (Εικόνα 6Z). Η καρδιά είναι όμως ακόμα ανώριμη καθώς κύριες δομές, όπως ο αρτηριακός βολβός, οι βαλβίδες, οι μυοκαρδιακές δοκίδες και το επικάρδιο, ολοκληρώνονται σε 3-5 μέρες μετά τη γονιμοποίηση (D. Brown et al. 2016).

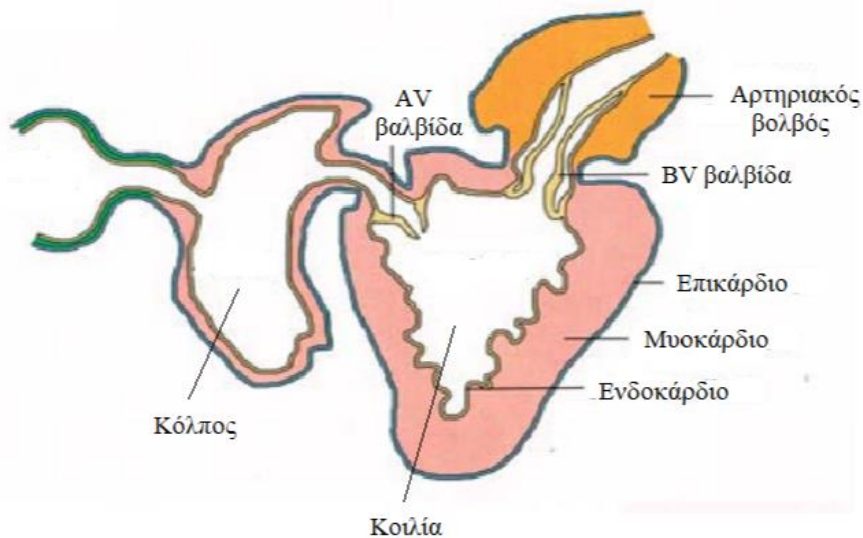


Εικόνα 6: Στάδια ανάπτυξης της καρδιάς στο zebrafish. Πηγή:(Bakkers 2011)

Οι καρδιακές βαλβίδες αποτελούν κρίσιμα συστατικά της καρδιάς των σπονδυλωτών. Ο ρόλος τους είναι να εξασφαλίζουν τη μονοκατευθυντήρια ροή του αίματος και την αποφυγή της ανάδρομης ροής. Διάφορες δυσπλασίες στις βαλβίδες οδηγούν σε πολλές καρδιακές παθήσεις στον άνθρωπο. Το AV κανάλι δημιουργείται στο όριο μεταξύ κόλπου και κοιλίας. Τα καρδιακά κύτταρα του AV δημιουργούν έναν αυλό, ενώ τα υποκείμενα ενδοκαρδιακά κύτταρα του AV μετατρέπονται από επιθηλιακά σε μεσεγγυματικά σχηματίζοντας το ενδοκαρδιακό μαξιλάρι. Αυτό, στη συνέχεια, αναδιαμορφώνεται με αποτέλεσμα να προκύπτουν οι πρώιμες βαλβίδες στις 76 hpf, οι οποίες στο τέλος θα εξελιχθούν σε ώριμες (D. Brown et al. 2016).

Η καρδιά του zebrafish αποτελείται από τρία στρώματα, το επικάρδιο εξωτερικά, το ενδοκάρδιο εσωτερικά και το μυοκάρδιο ενδιάμεσα σε αυτά. Διαθέτει έναν κόλπο, μία κοιλία και δύο βαλβίδες, τις κολποκοιλιακές (AV) και τις αορτικές (BV) βαλβίδες. Στην καρδιά των ψαριών αυτών εντοπίζεται και ένας ακόμη ιδιαίτερος σχηματισμός, ο αρτηριακός βολβός (arteriosus bulbus, BA), ο οποίος έχει την ικανότητα να διογκώνεται εξαιτίας των πολυάριθμων λείων μυϊκών ινών που τον αποτελούν (Yacoub, Brand, and Schlueter 2012). Η καρδιά τοποθετείται στον περικαρδιακό σάκο, ανάμεσα στο βραγχιακό επικάλυμμα και στο οστό του θωρακικού πτερυγίου.

Το μη-οξυγονωμένο αίμα αρχικά εισέρχεται στον κόλπο, ο οποίος συσπάται με αποτέλεσμα το αίμα να οδηγείται στην κοιλία, που έχει διασταλεί, μέσω μίας AV βαλβίδας. Η AV βαλβίδα επαρκεί για να αποτρέψει την οπισθοδρόμηση της ροής του αίματος στην καρδιά (Beis et al. 2005). Στη συνέχεια, η κοιλία συσπάται και δημιουργείται σχετικά υψηλή πίεση ώστε να αντλείται το αίμα στον αρτηριακό βολβό με τη βοήθεια της BV βαλβίδας. Ο αρτηριακός βολβός εκτείνεται σε κάθε κοιλιακή συστολή και επιστρέφει στη φυσιολογική του κατάσταση κατά τη διάρκεια μίας κοιλιακής διαστολής. Αυτή η ικανότητα παρέχει σταθερή ροή του αίματος στα βράγχια, η οποία είναι απαραίτητη για την επαρκή ανταλλαγή αερίων (Hu, Joseph Yost, and Clark 2001).



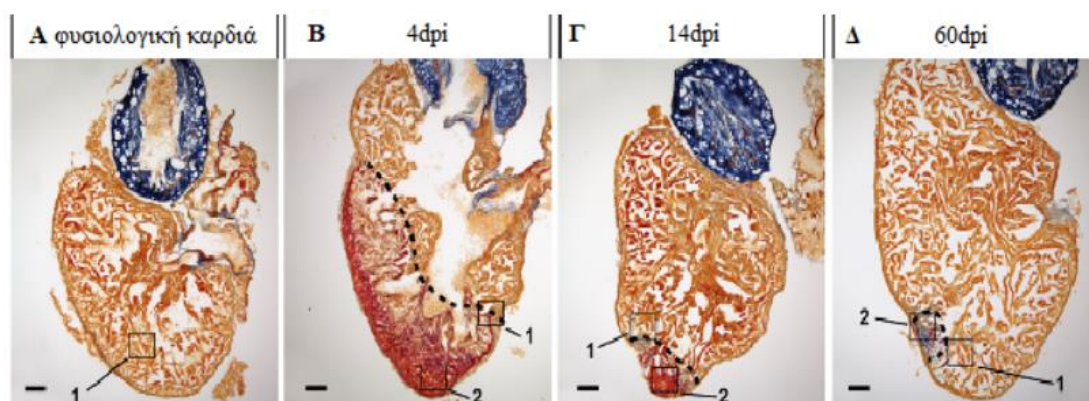
Εικόνα 7: Σχηματική αποτύπωση της καρδιάς του zebrafish. Πηγή:(Poon and Brand 2013)

A.4.2 Αναγέννηση της καρδιάς του zebrafish

Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των ενήλικων ψαριών zebrafish αποτελεί η ικανότητα τους να αναγεννούν διάφορα τμήματα του σώματος τους, όπως τα πτερύγια τους, τον αμφιβληστροειδή χιτώνα, το μυελό των οστών, τον τελεγκέφαλο και το νεφρό τους. Το 2002 ο Poss και οι συνεργάτες του απέδειξαν ότι η καρδιά του zebrafish έχει την ίδια δυνατότητα καθώς μετά από ακρωτηριασμό της κοιλίας, εκείνη αναγεννιόταν σε ποσοστό 20% (Poss, Wilson, and Keating 2002). Πιο συγκεκριμένα, στο σημείο της τομής η καρδιά αιμορραγεί για μερικά δευτερόλεπτα αλλά γρήγορα σχηματίζεται ινώδης θρόμβος και έτσι το ψάρι επιβιώνει. Στη συνέχεια, ο θρόμβος αντικαθιστάται από νέο μυ μέσα σε λίγες εβδομάδες, ώσπου 30 με 60 ημέρες μετά τον τραυματισμό η κοιλία επαναφέρεται στη φυσιολογική της μορφή. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι όταν ξαναδημιουργηθεί το τμήμα που έχει υποστεί βλάβη, δεν παρατηρείται σχηματισμός ουλώδους ιστού (González-Rosa, Burns, and Burns 2017).

Για περισσότερο από μία δεκαετία, τα πειράματα που αφορούσαν την μελέτη της αναγέννησης της καρδιάς πραγματοποιούνταν με κοιλιακή εκτομή στο επιθυμητό σημείο. Σε αυτό το μοντέλο τραυματισμού, αφού αφαιρεθεί ένα μέρος της κοιλίας η

αναγέννηση εξετάζεται με τον πλήρη ανασχηματισμό του χαμένου ιστού. Τα τελευταία χρόνια, μία καινοτόμα τεχνική έχει έρθει στο προσκήνιο, η μέθοδος της κρυοπληξίας (cryoinjury). Σε αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται ένα μεταλλικό εργαλείο που έχει ψυχθεί με υγρό άζωτο, το οποίο όταν ακουμπήσει ένα τμήμα της κοιλίας αυτό ψύχεται. Η ταχεία ψύξη και απόψυξη των κυττάρων του ιστού οδηγεί σε νέκρωση της περιοχής αυτής, η οποία περιβάλλεται από αποπτωτικά κύτταρα. Λίγο μετά τον τραυματισμό, φλεγμονώδη κύτταρα διεισδύουν στην τραυματισμένη περιοχή και παρατηρείται εκτεταμένη εναπόθεση ινώδους ιστού. Η ίνωση στην καρδιά του zebrafish είναι παροδική καθώς το τραύμα καθαρίζεται και φυσιολογικά καρδιομυοκύτταρα (cardiomyocytes, CMs) αντικαθιστούν τα νεκρωτικά και αποπτωτικά κύτταρα, σε αντίθεση με τα θηλαστικά (González-Rosa, Burns, and Burns 2017). Είναι πιθανό το ινώδες να δρα ως ικρίωμα ή ως παρακρινικό κέντρο σηματοδότησης για την έναρξη πολλαπλασιασμού των καρδιομυοκυττάρων.



Εικόνα 8: Α) Φυσιολογική καρδιά zebrafish. Η καρδιά του ψαριού Β) 4 μέρες, Γ) 14 μέρες και Δ) 60 μέρες μετά από κρυοπληξία. Με πορτοκαλί χρώση έχουν ιχνηθετηθεί τα καρδιομυοκύτταρα, με κόκκινη η περιοχή της ίνωσης και με μπλε το κολλαγόνο. Πηγή:(Schnabel et al. 2011)

Μία άλλη στρατηγική παρακολούθησης της καρδιακής αναγέννησης βασίζεται στην πρόκληση βλάβης μέσω γενετικών συστημάτων με σκοπό την καταστροφή των καρδιομυοκυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την έκφραση τοξινών ή ενζύμων που καταλύουν την παραγωγή κυτταροτοξικών μεταβολιτών. Ένα παράδειγμα ενός τέτοιου διαγονιδιακού συστήματος αποτελεί η ειδική έκφραση της

βακτηριακής νιτρορεδοκτάσης (nitroreductase, NTR) σε καρδιομυοκύτταρα. Η NTR δεν είναι τοξική από μόνη της, αλλά μπορεί να μετατρέπει το προφάρμακο μετρονιδαζόλη (Metronidazole, Mtz) σε ένα μεταβολίτη που οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο (González-Rosa, Burns, and Burns 2017; R. Zhang et al. 2013).

A.4.3 Κυτταρικοί μηχανισμοί αναγέννησης της καρδιάς

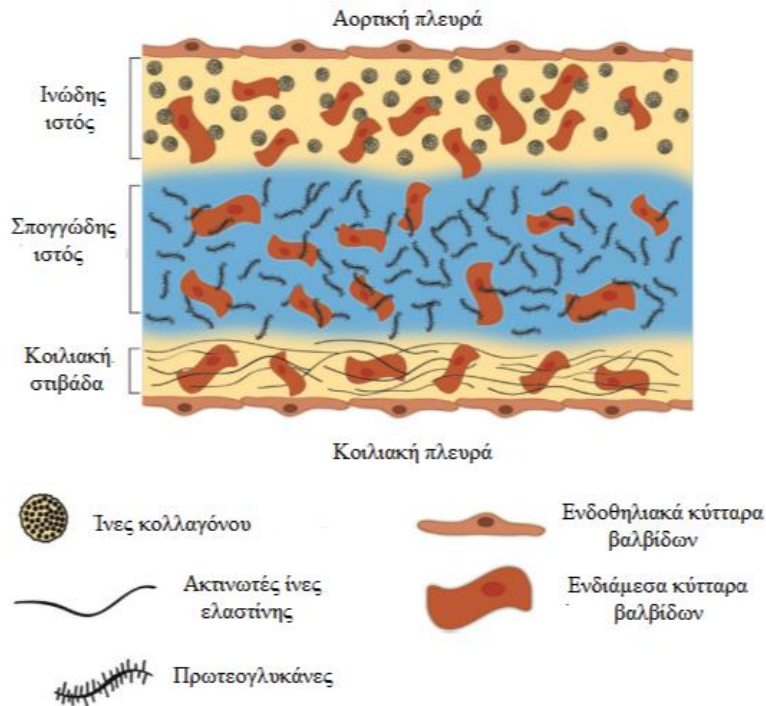
Μελετητές έχουν παρατηρήσει ότι μία βλάβη στην καρδιά επιδιορθώνεται με τα CMs να εισέρχονται στη φάση της μίτωσης και να πολλαπλασιάζονται προκειμένου να αντικαταστήσουν το κατεστραμμένο μυοκάρδιο. Έχουν προταθεί κάποιοι πιθανοί μηχανισμοί που ρυθμίζουν την έναρξη του πολλαπλασιασμού τους. Ένας από αυτούς αφορά διαφοροποιημένα CMs σε υπάρχουσες μυϊκές ίνες που πιθανόν διεγείρονται, εισέρχονται στον κυτταρικό κύκλο, διαιρούνται και αναδιαμορφώνουν την περιοχή του τραύματος. Ενώ, άλλο ένα πιθανό μονοπάτι σχετίζεται με τη στρατολόγηση αδιαφοροποίητων προγονικών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια όταν φτάσουν στο σημείο της βλάβης διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα. Επιπρόσθετα, οι επιστήμονες αναφέρουν ένα ακόμη πιθανό μηχανισμό αναγέννησης της καρδιάς, κατά τον οποίο κύτταρα του υγιούς μυ υποεκφράζουν κάποια γονίδια, όπως το *cmlc2* (cardiac myosin light chain 2) με αποτέλεσμα να αποδιαφοροποιούνται προς τη δημιουργία βλαστικών κυττάρων (Poss 2007).

Το επικάρδιο και το ενδοκάρδιο συμμετέχουν και αυτά στην αναγέννηση της καρδιάς του zebrafish. Το επικάρδιο διεγείρεται με την εκ νέου παραγωγή εμβρυϊκών δεικτών, όπως οι WT1B και TBX18 με αποτέλεσμα τα επικαρδιακά κύτταρα να μεταπίπτουν από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Η αλλαγή του προφίλ τους είναι πολύ σημαντική διότι βοηθάει στην αγγείωση του νέου ιστού. Όσον αφορά το ενδοκάρδιο, μετά τον τραυματισμό, όλη η δομή υφίσταται αλλαγές στη μορφολογία της και στα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη, όπως τα *raldh2* και *heg*. Η παρακρινής δράση του επικαρδίου και του ενδοκαρδίου είναι πολύ σημαντική για την έναρξη του πολλαπλασιασμού των CMs (Bournele and Beis 2016).

A.5 Καρδιακές βαλβίδες

Οι καρδιαγγειακές ασθένειες, οι οποίες οφείλονται σε δυσλειτουργίες των καρδιακών βαλβίδων, έχουν απασχολήσει αρκετά τους επιστήμονες τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε χρόνο καταγράφονται πάνω από 282.000 θάνατοι εξαιτίας των νόσων αυτών, ενώ περίπου 300.000 εγχειρίσεις πραγματοποιούνται κάθε χρόνο (Parvin Nejad et al. 2016). Αυτές οι ασθένειες προκαλούνται είτε από βλάβες στους ιστούς των βαλβίδων είτε από δυσλειτουργίες στην καρδιά που επηρεάζουν δευτερογενώς αυτές.

Η καρδιά του ανθρώπου έχει τέσσερις βαλβίδες. Η τριγλωχίνος και η μιτροειδής (δύο γλωχίνες) εντοπίζονται μεταξύ των κόλπων και των κοιλιών, στη δεξιά και αριστερή πλευρά της καρδιάς αντίστοιχα. Η πνευμονική βαλβίδα βρίσκεται ενδιάμεσα της δεξιάς κοιλίας και της πνευμονικής αρτηρίας, ενώ η αορτική ενώνει την αριστερή κοιλία με την αορτή (Parvin Nejad et al. 2016). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι βαλβίδες αποτελούν λεπτές δομές συνδετικού ιστού, που μοιάζουν με φύλλα και διασφαλίζουν την ομαλή ροή του αίματος ανοίγοντας και κλείνοντας (A. S. Zhu and Grande-Allen 2018). Πιο συγκεκριμένα, κάθε φύλλο της αορτικής βαλβίδας αποτελείται από τρεις στιβάδες διαφορετικού πάχους: τη στιβάδα του ινώδους ιστού, που περιέχει ένα πυκνό δίκτυο ινιδίων κολλαγόνου τύπου I και II, το στρώμα του σπογγώδους ιστού με το χαλαρά διατεταγμένο κολλαγόνο και τις πρωτεογλυκάνες, οι οποίες έχουν την ικανότητα να απορροφούν κραδασμούς και διαθέτουν ενυδατικές ιδιότητες και την κοιλιακή εσωτερική στιβάδα, που αποτελείται από ίνες ελαστικής και κολλαγόνου. Οι ίνες ελαστικής προσφέρουν μεγάλη ελαστικότητα και αντοχή στη βαλβίδα. Παρόμοια δομή έχουν και οι υπόλοιπες βαλβίδες (Usprech, Chen, and Simmons 2016).



Εικόνα 9: Δομή αορτικής βαλβίδας. Πηγή:(Parvin Nejad et al. 2016)

Μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια θεραπεία για τις δυσλειτουργικές βαλβίδες. Η μία στρατηγική αντιμετώπισης αφορά τη μεταμόσχευση, η οποία βελτιώνει αρκετά την επιβίωση και την ποιότητα ζωής των ασθενών, όμως η εύρεση μοσχευμάτων είναι περιορισμένη. Επίσης, σε κάποιες περιπτώσεις τοποθετούν στους ασθενείς μηχανικές ή βιοπροσθετικές βαλβίδες. Οι μηχανικές βαλβίδες, αν και είναι αρκετά ανθεκτικές, προκαλούν συχνά λοιμώξεις, που δύσκολα ξεπερνιούνται, και θρόμβους, γι' αυτό είναι αναγκαίο να χορηγείται στα άτομα αντιπηκτική αγωγή εφ' όρου ζωής. Οι βιοπροσθετικές βαλβίδες έχουν μικρή διάρκεια ζωής και πρέπει να αντικατασταθούν γρήγορα ειδικά στους νεότερους ανθρώπους. Μία άλλη ιδέα η οποία έχει έρθει στο προσκήνιο αφορά τη μηχανική των ιστών των βαλβίδων της καρδιάς (Heart Valve Tissue Engineering, HVTE). Αυτή η σκέψη έχει αναπτυχθεί αρκετά και φαίνεται ότι θα μπορέσει να ξεπεράσει τις δυσκολίες που αντιμετωπίζουν οι παραπάνω στρατηγικές (Parvin Nejad et al. 2016; Usprech, Chen, and Simmons 2016).

Η μεθοδολογία της HVTE περιλαμβάνει την καλλιέργεια κυττάρων που έχουν συλλεχθεί από τον ασθενή σε μία μήτρα ικρίωμα με σκοπό τη δημιουργία μίας

ζωντανής λειτουργικής βαλβίδας με ίδιες μορφολογικές και μηχανικές ιδιότητες με μία φυσιολογική. Αυτού του είδους οι βαλβίδες καθώς αποτελούνται από ζωντανούς πληθυσμούς κυττάρων έχουν τη δυνατότητα να αναπτύσσονται και να αναδιαμορφώνονται σε αντίθεση με τις μηχανικές. Έτσι λοιπόν, αποφεύγονται πιθανές αναγκαίες επανειλημμένες παρεμβάσεις (Parvin Nejad et al. 2016). Το γεγονός αυτό ωφελεί κυρίως τους ασθενείς που βρίσκονται σε παιδική ηλικία διότι γι'αυτούς αποτελεί τη μόνη βιώσιμη λύση που αφορά πλήρης αντικατάσταση του ιστού καθώς προσφέρει αναγεννητική διάσταση (Usprech, Chen, and Simmons 2016).

Οι βαλβίδες της τεχνολογίας HVTE πρέπει να είναι συμβατές με τον οργανισμό δέκτη, να μην αναγνωρίζονται από το ανοσοποιητικό σύστημα και να μην προκαλούν θρόμβους. Πολύ σημαντικό είναι το ικρίωμα να έχει θέσεις προσκόλλησης των κυττάρων των γύρω ιστών προκειμένου να καλυφθεί το υλικό και να μετατραπεί σε μία ζωντανή δομή. Η μελέτη του σχεδιασμού των κατασκευών αυτών δίνει τη δυνατότητα στους επιστήμονες για περαιτέρω έρευνα όσον αφορά το ρόλο των μηχανικών και βιοχημικών ερεθισμάτων σε ασθένειες των βαλβίδων της καρδιάς, όπως είναι η αορτική στένωση και η μιτροειδής παλινδρόμηση. Ο συνδυασμός των μελετών αυτών θα βοηθήσει στην εύρεση της καλύτερης πιθανής θεραπείας (A. S. Zhu and Grande-Allen 2018).

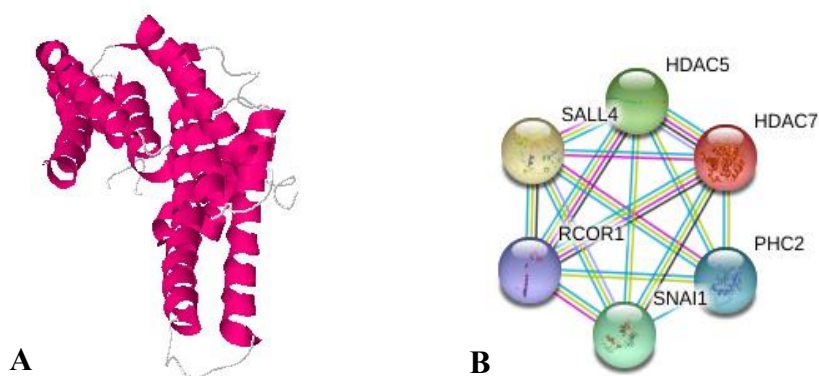
A.5.1 Αναγέννηση των καρδιακών βαλβίδων του zebrafish

Όπως έχει αναφερθεί, το ψάρι ζέβρα έχει τη δυνατότητα να αναγεννά τη καρδιά του μετά από ένα τραυματισμό σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Αντίθετα, το ποντίκι έχει αυτή την ιδιότητα μόνο μέχρι τις επτά πρώτες μέρες μετά τη γέννηση του (Bournele and Beis 2016). Έτσι λοιπόν, το zebrafish αποτελεί ένα χρήσιμο μοντέλο για τη διερεύνηση των διάφορων ασθενειών που σχετίζονται με βλάβες στις καρδιακές βαλβίδες. Πειράματα έδειξαν ότι για να πραγματοποιηθεί η αναγέννηση των βαλβίδων στο ψάρι αυτό, απαιτείται η ενεργοποίηση της Notch σηματοδότησης. Ύστερα από τραυματισμό των βαλβίδων σε ψάρια zebrafish, συλλέχθηκαν οι καρδιές τους σε διάφορες φάσεις κατά τη διάρκεια της αναγέννησης και στη συνέχεια απομονώθηκε και αναλύθηκε το μεταγράφομα τους. Εντοπίστηκαν πολλά γονίδια, τα οποία εκφράζονται ή αποσιωπούνται στη διαδικασία αυτή, με τα εξής να

παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον με σκοπό τη περαιτέρω μελέτη τους: το *snai1a*, το *nr4a3*, το *hhatlb*, το *sfrp2* και το *zgc:92518*.

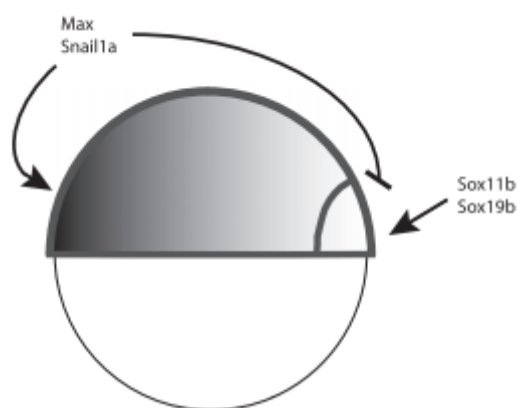
A.5.1.1 *Snai1a*

Το γονίδιο *snai1* (Snail Family Transcriptional Repressor 1) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία δρα ως καταστολέας του εξωδέρματος, επάγοντας την ανάπτυξη του μεσοδέρματος. Σε αυτή τη φάση φαίνεται να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη LOXL2 οξειδώνοντας την ιστόνη H3 με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η μεταγραφή και να μην απελευθερώνεται το ετεροχρωματικό συστατικό CBX5/HP1A, επιτρέποντας έτσι την αναδιάταξη της χρωματίνης και την απόκτηση μεσεγγυματικών χαρακτηριστικών. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στην επιβίωση και τη μετανάστευση των κυττάρων και μπορεί να δεσμεύεται σε συγκεκριμένες περιοχές των υποκινητών μερικών γονιδίων όπως είναι το γονίδιο της E-καδερίνης (*cdh1*), το *cldn7* και το *krt8* (T. Lin et al. 2010; Y. Lin et al. 2010). Μελέτες έχουν δείξει ότι σχετίζεται με διάφορες νόσους όπως είναι το αδενοκαρκίνωμα του γαστροοισοφαγικού συνδέσμου (Dong et al. 2014). Επίσης, φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αναδιαμόρφωσης του κυτταροσκελετού. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 20 και συγκεκριμένα στη θέση 20q13.13 και από αυτό παράγεται μία πρωτεΐνη 264 αμινοξέων. Το παράλογο γονίδιο του είναι το *snai2*.



Εικόνα 10: Γονίδιο *Snai1* A) Δομή πρωτεΐνης. Πηγή: <http://oca.weizmann.ac.il/oca-bin/ccpeek?id=4QLI> B) Γονίδια που αλληλεπιδρά. Πηγή: <https://www.genecards.org/>

Στο zebrafish υπάρχουν δύο ορθόλογα γονίδια για το *snail* του ανθρώπου, το *snail1a* και το *snail1b*, που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 11 και 23 αντίστοιχα. Κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish πολλά μοριακά μονοπάτια είναι απαραίτητα για τη σωστή διαμόρφωση των τριών στρωμάτων του εμβρύου (εξωτερικό προστατευτικό επιθήλιο, περιβάλλον στρώμα, κοιλιακός άξονας). Ερευνητές έχουν αποδείξει ότι ένας ρόλος του γονιδίου *snail1a* σχετίζεται με το σχηματισμό του ραχιαίου περιβάλλον στρώματος (dorsal enveloping layer, dEVL) και του κοιλιακού άξονα (dorso-ventral axis) έχοντας κατασταλτική δράση μαζί με το *max* γονίδιο (Chen et al. 2012).



Εικόνα 11: Σχηματική ανατύπωση του προτεινόμενου μηχανισμού σχηματισμού του dEVL και του κοιλιακού άξονα στο zebrafish. Τα γονίδια *snail1a* και *max* έχουν ανασταλτικό ρόλο, ενώ τα *sox* ρυθμίζουν θετικά την ανάπτυξη τους. Πηγή:(Chen et al. 2012)

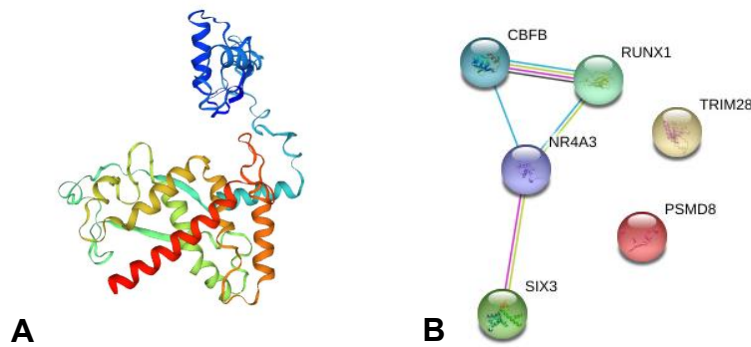
Άλλες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια morpholinos για το *snail1a* στη *Drosophila melanogaster* και στο *Danio rerio* αναφέρουν ότι απενεργοποιώντας αυτό παρατηρούνται σοβαρά προβλήματα στη μετακίνηση των κυττάρων στο στάδιο της γαστριδίωσης (X. Liu et al. 2009).

A.5.1.2 *Nr4a3*

Το γονίδιο *nr4a3* (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 3) κωδικοποιεί ένα μέλος της υπερικογένειας μίας στεροειδούς-θυροειδούς ορμόνης ρετινοειδούς υποδοχέα. Στον άνθρωπο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 9, στη θέση 9q31.1 και παράγεται από αυτό μία πρωτεΐνη 626 αμινοξέων. Αποτελεί ένα μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος δεσμεύεται σε ειδικές περιοχές υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και τη διαφοροποίηση πολλών κυτταρικών τύπων. Επιπλέον, διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στο μεταβολισμό και τη φλεγμονή. Έχει βρεθεί ότι μεσολαβεί στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των αγγειακών λείων μυών, των μυελοειδών προγονικών κυττάρων και των παγκρεατικών κυττάρων τύπου Β (Nomiyama et al. 2006; Tessem et al. 2014). Παρεμβαίνει στην επιβίωση των κυττάρων των νευρώνων και των λείων μυών, συμμετέχει στην επαγόμενη από τον κύκλο του CREB νευρωνική επιβίωση και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του υπόκαμπου ρυθμίζει την επιβίωση των πυραμιδικών κυττάρων και την καθοδήγηση των αξόνων (Ponnio and Conneely 2004; Volakakis et al. 2010).

Όσον αφορά τη δράση του στη φλεγμονή, όταν διεγερθεί ο TNF παράγοντας, το *nr4a3* βοηθάει στην προσκόλληση μονοκυττάρων προκαλώντας την έκφραση των γονιδίων *vcam1* και *icam1* (Zhao et al. 2010). Στα ιστιοκύτταρα επάγει τη σύνθεση και την απελευθέρωση κυτοκινών αλλά παρεμποδίζει γεγονότα που οδηγούν σε αποκοκκίωση. Στο μεταβολισμό συμβάλει στο ενεργειακό ισοζύγιο περιορίζοντας την έκφραση των νευροπεπτιδίων AGRP σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο με το ενεργοποιημένο NR3C1 στο AGRP-γλυκοκορτικοειδές στοιχείο απόκρισης (GRE) με συνέπεια να εξασθενεί η δυνατότητα δέσμευσης του NR3C1 στο DNA. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στη μεταφορά της γλυκόζης μετατοπίζοντας τον μεταφορέα της SLC2A4 στην κυτταρική επιφάνεια (Q. Liu et al. 2013).

Το γονίδιο *nr4a3* έχει συσχετιστεί με κάποιες ασθένειες όπως το χονδροσάρκωμα, το εξωσκελετικό μυξοειδές χονδροσάρκωμα και το επιθηλιακό μυοεπιθηλιακό καρκίνωμα. Ακόμη, φαίνεται να συμμετέχει στην καρδιακή υπερτροφία ενεργοποιώντας το *parp1* (Feng et al. 2015). Ένα σημαντικό παράλογο αυτού του γονιδίου είναι το *nr4a2*.



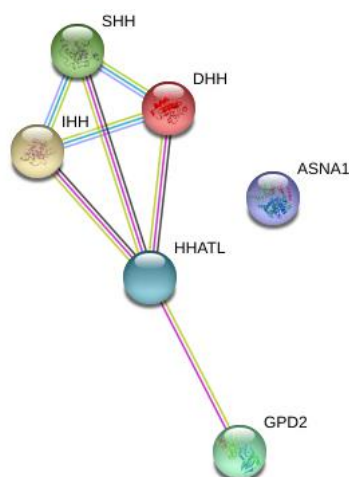
Εικόνα 12: Γονίδιο *Nr4a3* A) Δομή πρωτεΐνης. Πηγή: <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q92570?csm=FB4A1AB7667D96F6> B) Γονίδια που αλληλεπιδρά Πηγή: <https://www.genecards.org/>

Το ορθόλογο γονίδιο του στο zebrafish βρίσκεται στο χρωμόσωμα 16 και έχει 9 εξόνια. Μελετητές έχουν αποδείξει ότι στο ψάρι ζέβρα το *nr4a3* γονίδιο φαίνεται να παίζει ρόλο στην ανάπτυξη των ουδετεροφίλων, καθώς όταν αυτό απενεργοποιηθεί παράγεται μειωμένος αριθμός κυττάρων του πληθυσμού αυτού (Prince et al. 2017). Επίσης, έχει ανιχνευτεί ότι εκφράζεται σε κάποιο αριθμό κυττάρων κοντά στη ραχιαία τελεγκεφαλική περιοχή του πρόσθιου τμήματος του τελεγκεφάλου και στο παρέγχυμα (Diotel et al. 2015).

A.5.1.3 *Hhatlb*

Το γονίδιο *hhatl* (Hedgehog Acyltransferase Like) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 3 του ανθρώπου, στη θέση 3p22.1. Παράγει μία πρωτεΐνη 504 αμινοξέων, η οποία έχει δράση μεταφοράς μεταφέροντας ακυλομάδες από μία ένωση σε άλλη (Gaudet et al. 2011). Επιπλέον, ρυθμίζει αρνητικά την ομοιοπολική προσάρτηση μίας ομάδας παλμιτουλίου στο αμινοτελικό άκρο μίας πρωτεΐνης. Σε κυτταρικό επίπεδο φαίνεται να εκφράζεται στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου και την πλασματική μεμβράνη, επηρεάζοντας τη δομή τους. Αρχικά, θεωρήθηκε βασική πρωτεΐνη για το μεταβολισμό και τη μεταφορά της γλυκερόλης αλλά αποτελέσματα ερευνών δείχνουν ότι η HHATL σχετίζεται με πολλές κυτταρικές διαδικασίες, όπως είναι ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Έχει παρατηρηθεί ότι παράγεται στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας και πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε επιληπτικούς

ασθενείς έδειξαν ότι αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης αυτής μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μυοκαρδιακή νέκρωση με αποτέλεσμα οι επιπτώσεις στους ασθενείς να μην είναι τόσο δραματικές (P. Zhang et al. 2018).



Εικόνα 13: Εικόνα 12: Γονίδια που αλληλεπιδρά το *Hhatl*. Πηγή: <https://www.genecards.org/>

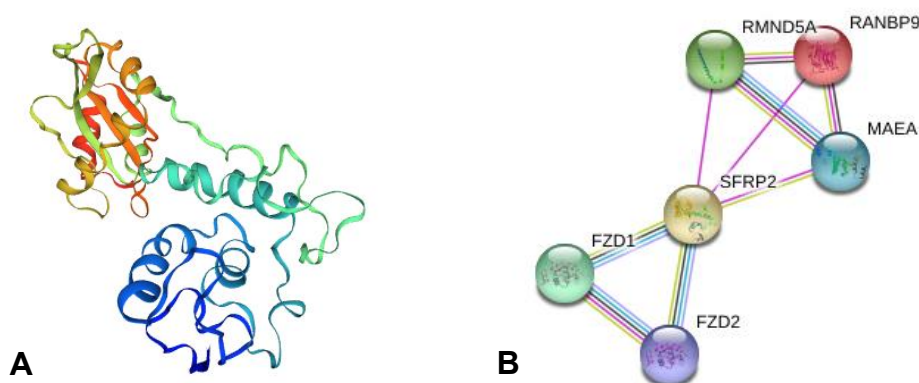
Στο *Danio rerio* το ανθρώπινο γονίδιο *hhatl* έχει δύο ορθόλογα γονίδια το *hhatla* και το *hhatlb*. Το *hhatlb* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 24.

A.5.1.4 *Sfrp2*

Το γονίδιο *sfrp2* (Secreted Frizzled Related Protein 2) κωδικοποιεί ένα μέλος της οικογένειας πρωτεϊνών SFRP, που περιέχει μία περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες, η οποία είναι ομόλογη ως προς τη Wnt-θέση πρόσδεσης των πρωτεϊνών που είναι ενωμένες με G πρωτεΐνες (Frizzled proteins). Οι πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής δρουν ως διαλυτοί ρυθμιστές της σηματοδότησης Wnt και παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και της διαφοροποίησης συγκεκριμένων κυτταρικών τύπων. Επίσης, το *sfrp2* συμμετέχει στην ανάπτυξη του αμφιβληστροειδούς χιτώνα και στη διαδικασία της μυογένεσης (Chang et al. 1999). Η μεθυλίωση αυτού του γονιδίου αποτελεί ένα πιθανό δείκτη για την ανίχνευση του

καρκίνου του παχέος εντέρου. Το πιο σημαντικό παράλογο αυτού του γονιδίου είναι το *sfrp1*.

Ο γενετικός τόπος του ανθρώπινου *sfrp2* είναι στο χρωμόσωμα 4 και πιο συγκεκριμένα στη θέση 4q31.3, ο οποίος κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που αποτελείται από 295 αμινοξέα. Αυτή παράγεται κυρίως στην εξωκυτταρική περιοχή, στην πλασματική μεμβράνη και στον πυρήνα του κυττάρου. Η πρωτεΐνη του γονιδίου *sfrp2* έχει ανιχνευτεί στο λιπώδη ιστό, στην καρδιά, στον εγκέφαλο, στους σκελετικούς μύες, στο πάγκρεας, στο θύμο αδένα, στον προστάτη, στο λεπτό έντερο και στο κόλον (E. Hu et al. 1998; Melkonyan et al. 2002).



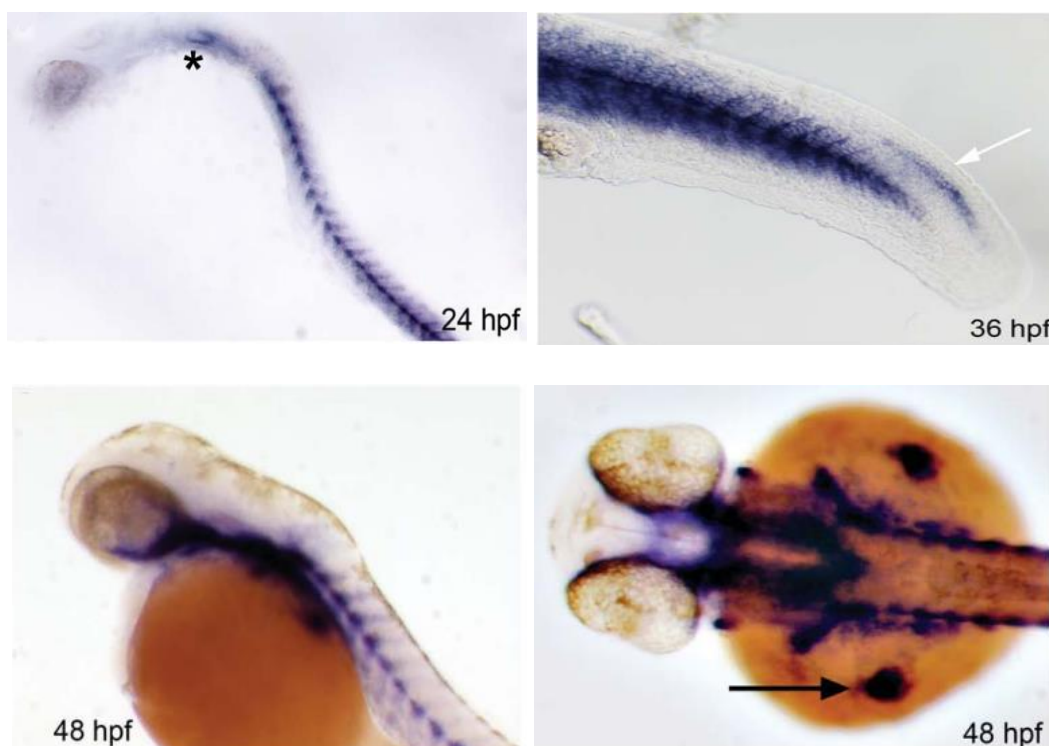
Εικόνα 14: Γονίδιο *Sfrp2* A) Δομή πρωτεΐνης.

Πηγή:<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/Q96HF1?csm=97597971541BFBC4> B) Γονίδια που αλληλεπιδρά. Πηγή:<https://www.genecards.org/>

Με βάση μελέτες που υλοποιήθηκαν, οι επιστήμονες διαπίστωσαν ότι γερασμένοι ινοβλάστες εκκρίνουν τον παράγοντα SFRP2, ο οποίος επάγει την έναρξη ενός μονοπατιού στα καρκινικά κύτταρα του μελανώματος, που έχουν ως συνέπεια τη μείωση της β-κατενίνης και τελικά την έλλειψη του καίριου παράγοντα οξειδοαναγωγής, APE1. Η απώλεια του APE1 εξασθενεί την ικανότητα των κυττάρων να επιδιορθώνουν βλάβες στο DNA, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα ανθεκτικά στη στοχευόμενη θεραπεία. Οι ερευνητές συμπέρανε, λοιπόν, ότι αύξηση των επιπέδων του SFRP2 σχετίζεται με την αύξηση της αγγειογένεσης στους όγκους αλλά και στη μετάσταση των κυττάρων του μελανώματος (Kaur et al. 2016).

Επιπρόσθετα, ο Kobayashi και οι συνάδελφοι του διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη SFRP2 παράγεται κατά την ινωτική φάση ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου σε μοντέλα ποντικών. Αντίθετα, σε ποντίκια, στα οποία είχε κατασταλεί ο παράγοντας αυτός, παρατηρήθηκε μικρότερο ποσοστό ίνωσης του μυοκαρδίου και βελτιωμένη καρδιακή λειτουργία μετά το έμφραγμα. Οι μελετητές πρότειναν ότι η χορήγηση ενός ανταγωνιστή του SFRP2 ίσως αποτελεί μία αποτελεσματική θεραπευτική λύση για την αντιμετώπιση της ίνωσης και τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά από ένα τέτοιο επεισόδιο (Kobayashi et al. 2009).

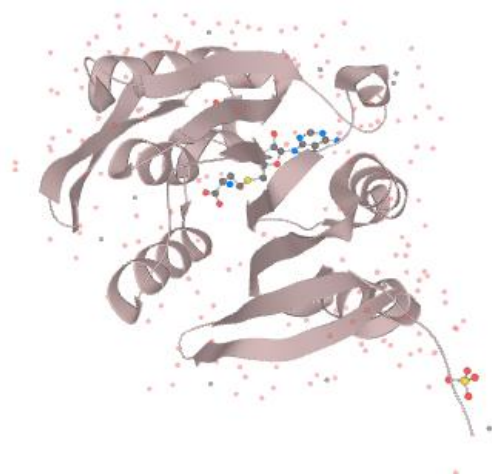
Στο zebrafish εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1 και φέρει 3 εξόνια. Η έκφραση του αρχικά ανιχνεύεται στο στάδιο των 5 σωματιών στα ωτικά κυστίδια και στο ραχιαίο νωτιαίο μυελό, ενώ στη συνέχεια εμφανίζεται σταδιακά στους σχηματισμένους σωματίες. Ως και το τέλος της σωματογένεσης ανιχνεύεται στο φακό των ματιών, στα αναπτυσσόμενα θωρακικά πτερύγια και στα βραγχιακά τόξα (Tendeng and Houart 2006). Πειράματα που έχουν γίνει στο ψάρι ζέβρα απέδειξαν ότι το γονίδιο αυτό ρυθμίζει την επεξεργασία του προκολλαγόνου σε κολλαγόνο και αποτελεί ένα πολύ σημαντικό παράγοντα για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Q. Zhu et al. 2019). Ακόμη, φαίνεται να εμπλέκεται και στη διαφοροποίηση των μυοβλαστών (Milla et al. 2012).



Εικόνα 15: Προφίλ έκφρασης του *sfrp2*. Ο αστερίσκος δείχνει τα ωτικά κυστίδια, το μαύρο βέλος τα θωρακικά πτερύγια και το άσπρο βέλος το νωτιαίο μυελό. Πηγή:(Tendeng and Houart 2006)

A.5.1.5 *Zgc:92518*

Το γονίδιο με αριθμό 92518 φαίνεται να κωδικοποιεί μία μεθυλοτρανσφεράση, η οποία μεθυλιώνει λυσίνες σε συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Η μεθυλίωση αυτή επάγεται σε συνθήκες στρες, όπως για παράδειγμα στο στρες του ενδοπλασματικού δικτύου και πιθανόν έχει ρυθμιστικό ρόλο στη μετάφραση. Σε κυτταρικό επίπεδο παράγεται στο κυτταρόπλασμα και στα κεντροσώματα (Malecki et al. 2017). Επιπλέον, αλληλεπιδρά με μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών θερμικού σοκ (Heat Shock Protein), της οικογένειας των τσαπερονινών TCP-1 αλλά και με την τουμπουλίνη. Πολλές από αυτές αποτελούν υποστρώματα μεθυλίωσης (Cloutier et al. 2013). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12, στη θέση 12q14.1 και από αυτό παράγεται μία πρωτεΐνη από 226 αμινοξέα, ενώ στο *Danio rerio* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1.



Εικόνα 16: Δομή πρωτεΐνης 92518. Πηγή:<https://www.uniprot.org/uniprot/Q96AZ1>

B. ΣΚΟΠΟΣ

Οι καρδιοπάθειες αναφέρονται συνήθως σε δυσπλασίες της δομής της καρδιάς, οι οποίες υπάρχουν από τη γέννηση και αποτελούν από τις βασικότερες αιτίες θνησιμότητας των νεογνών. Σύνηθες είναι το γεγονός ο φαινότυπος να παραμένει αδρανής μέχρι την ενηλικίωση των ατόμων. Οι πληροφορίες για το γενετικό υπόβαθρο των νόσων αυτών παραμένουν περιορισμένες. Το ζωικό μοντέλο zebrafish χαρακτηρίζεται ως ένα πολύτιμο εργαλείο μελέτης της μοριακής βάσης των καρδιακών ελαττωμάτων εξαιτίας της ικανότητας αναγέννησης της καρδιάς του.

Στην παρούσα εργασία, διερευνάται η λειτουργικότητα των γονιδίων *snail1a*, *nr4a3*, *hhat1b*, *sfrp2* και *zgc:92518* κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη του zebrafish, καθώς αυτά φαίνεται να διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στη διαδικασία αναγέννησης των καρδιακών του βαλβίδων. Πιο συγκεκριμένα, αυτό θα επιτευχθεί εξετάζοντας τους φαινοτύπους των εμβρύων τις πρώτες μέρες της ζωής τους αφού έχει αποσιωπηθεί η μετάφραση των γονιδίων αυτών.

Γ.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Γ.1 Πειραματόζωα

Γ.1.1 Συνθήκες διαβίωσης

Η εκτροφή και η διαβίωση των πειραματόζωων *Danio rerio* (zebrafish) πραγματοποιείται στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών Ακαδημίας Αθηνών (ΙΒΕΑΑ) σε συστήματα ανακύκλωσης και αποστείρωσης γλυκού νερού σε δοχεία 1, 3 και 10 λίτρων. Στα δοχεία 1L πρέπει να φυλάσσονται 1-3 ψάρια, στα δοχεία 3L πρέπει να τοποθετούνται 6-12 ψάρια και στα δοχεία 10L περίπου 12-20 άτομα. Οι αριθμοί αυτοί πρέπει να τηρούνται διότι δοχεία με πολύ πυκνούς πληθυσμούς οδηγούν σε μειωμένη ανάπτυξη των ατόμων. Ωστόσο, δοχεία με πυκνότητα μικρότερη του ενός ψαριού ανά λίτρο δημιουργεί προβλήματα που οφείλονται στην υπερβολική σίτιση αλλά και καταστάσεις στρες με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα της εκκρινόμενης κορτιζόλης.

Στη μονάδα είναι απαραίτητο να διατηρούνται συγκεκριμένες συνθήκες για τη φυσιολογική επιβίωση των zebrafish. Η θερμοκρασία της μονάδας κυμαίνεται από 27°C έως 29°C, τιμές δηλαδή κατάλληλες για τα τροπικά ψάρια αυτά. Το νερό χαρακτηρίζεται από pH 6.5-7.5, αγωγιμότητα 400-700 μS , συγκεντρώσεις νιτρικών μικρότερες από 2.5 mg/ml και νιτρικών μικρότερες από 0.025 mg/ml. Επίσης, στα ενυδρεία πραγματοποιείται τεχνητή εναλλαγή φωτεινής-σκοτεινής περιόδου, όπου επικρατεί 14 ώρες φως και 10 ώρες σκοτάδι.

Όσον αφορά τα έμβρυα zebrafish, από τη στιγμή που θα συλλεχθούν μέχρι και την 5^η μέρα ζωής τους, θα διατηρηθούν σε τρυβλία Petri με Egg Water σε επωαστικό θάλαμο με θερμοκρασία 28°C. Μετά την 5^η μέρα, τα έμβρυα μεταφέρονται στη Μονάδα Ζωικών Προτύπων, όπου μέχρι την ολοκλήρωση του πρώτου μήνα ζωής τους φυλάσσονται σε δοχεία 1L σε ομάδες έως 25 ατόμων. Απαιτείται η συνεχής αλλαγή του Egg Water και η προσθήκη νερού από τα συστήματα, προκειμένου να διατηρείται καθαρό το δοχείο. Ύστερα, τα ψάρια τοποθετούνται στις δεξαμενές των συστημάτων παροχής αποστειρωμένου νερού (Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Τα αυτόματα συστήματα παροχής νερού στα ενυδρεία της Μονάδας Ζωικών Προτύπων.

Γ.1.2 Διατροφή

Η διατροφή των πειραματόζωων πραγματοποιείται τουλάχιστον δύο φορές την ημέρα και βασικό ρόλο διαδραματίζει η ηλικία των ψαριών. Μέχρι την 5^η μέρα ζωής των zebrafish δεν απαιτείται εξωγενής χορήγηση τροφής, διότι τα θρεπτικά υλικά που χρειάζονται τα λαμβάνουν από τη λέκιθο. Από την 5^η μέρα έως τον πρώτο μήνα ξεκινά η λήψη ξηράς τροφής Z000 δύο φορές την ημέρα. Όταν ολοκληρώσουν τον πρώτο μήνα ζωής, το πρωί τρέφονται με *Artemia salina*, όπου καλλιεργείται στο ενυδρείο. Το μεσημέρι στα ψάρια από 1 έως δύο μηνών χορηγείται ξηρά τροφή Z100, ενώ τα ψάρια που είναι μεγαλύτερα των 2 μηνών λαμβάνουν Z300 ή Z400.

Διαδικασία καλλιέργειας της γαρίδας *Artemia salina*:

1. Προσθήκη 1L απιονισμένου νερού ddH₂O και 40 gr αλάτων Instant Ocean σε κωνικό δοχείο.
2. Ανάδευση μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
3. Προσθήκη κατάλληλης ποσότητας από αυγά *Artemia salina*.
4. Τροφοδότηση της καλλιέργειας με αέρα και επώαση για 48 ώρες στη θερμοκρασία του ενυδρείου (27°C-29°C).

Ετοιμασία της πρωινής διατροφής με γαρίδα *Artemia salina*:

1. Διέλευση του διαλύματος της καλλιέργειας από σουρωτήρι προκειμένου να συγκρατηθούν οι γαρίδες.
2. Μεταφορά των γαρίδων σε ένα κυλινδρικό δοχείο το οποίο διαθέτει μαγνήτη στη βάση του, ρίχνοντας ddH₂O στο σουρωτήρι. Τα κελύφη και οι μη εκκολαπτόμενες γαρίδες θα καθιζάνουν και στο διάλυμα θα παραμείνουν οι ζωντανές γαρίδες.
3. Μεταφορά του καθαρού διαλύματος με τις ζωντανές γαρίδες σε πλαστικά δοχεία.
4. Χορήγηση τροφής στα ψάρια με τη βοήθεια πιπέτας.

Γ.1.3 Διαγονιδιακές σειρές zebrafish

Στα ενυδρεία της Μονάδας Ζωικών Προτύπων εκτρέφονται πολλές διαγονιδιακές σειρές *Danio rerio*. Για τη διεξαγωγή της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν οι εξής σειρές ενήλικων ψαριών:

- ❖ Tg (*flk*:GFP): Το γονίδιο *flk* ή αλλιώς *kdrl* (kinase insert domain receptor like) κωδικοποιεί έναν υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα VEGF, ο οποίος εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο υποδοχέας αυτός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αγγειογένεση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου. Τα ψάρια με το διαγονίδιο *flk*:GFP εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε όλα τα αγγεία τους, όπου παράγεται ο συγκεκριμένος υποδοχέας (Choi et al. 2007).
- ❖ Tg (*tcf*:dsRed): Ο μεταγραφικός παράγοντας TCF αποτελεί έναν κρίσιμο μεσολαβητή στην ενεργοποίηση μονοπατιών MAP κινάσης, τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη των σπονδυλωτών (L. A. Brown et al. 1999). Τα κύτταρα των ατόμων με το διαγονίδιο *tcf*:dsRed, που παράγουν την πρωτεΐνη TCF, εκφράζουν την κόκκινη φθορίζουσα πρωτεΐνη.

- ❖ Tg (*tie2:EGFP*): Το γονίδιο *tie2* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη, η οποία συμμετέχει στην ανάπτυξη της καρδιάς των εμβρύων zebrafish και πιο συγκεκριμένα στη διατήρηση των αλληλεπιδράσεων του ενδοκαρδίου με το μυοκάρδιο (Gjini et al. 2011). Τα διαγονιδιακά έμβρυα *tie2:EGFP* εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα της κολποκοιλιακής βαλβίδας και του αρτηριακού βολβού.

Γ.2 Υλικά

Για τη διαβίωση του πειραματόζωου *Danio rerio* απαιτούνται τα εξής υλικά:

- ❖ Τα αφυδατωμένα αυγά της *Artemia salina* και η ξηρή τροφή (Z000, Z100, Z300, Z400) της εταιρίας ZM Fish Food.
- ❖ Άλατα Instant Ocean
- ❖ Egg Water (EW) σύστασης: 0.3 g/L Instant Ocean Salts, 0.08 g/L CaSO₄, απιονισμένο νερό (ddH₂O)
- ❖ Egg Water (EW) με μπλε του μεθυλενίου (Methylene Blue) σύστασης: 1 ml αρχικού διαλύματος Methylene Blue (10 mg/L) για 1 L Egg Water

Για το χειρισμό των εμβρύων είναι αναγκαία τα εξής:

- ❖ Διάλυμα καθαρισμού (Bleaching buffer) σύστασης: 180 μl διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου 10% (hypochlorin solution) και 500 ml EW.
- ❖ Διάλυμα 1-φαινυλο 2-θειουρίας (PTU) σύστασης: 125 g σκόνης PTU και 100 ml EW.
- ❖ Προνάση (pronase) συγκέντρωσης 20 mg/ml, πρωτεάση του βακτηρίου *Streptomyces griseus*. Διαλύεται σε ddH₂O.
- ❖ Ανασθητικό διάλυμα Tricaine methanesulfonate 0,4% σύστασης: 4 g σκόνης Tricaine και 1 L ddH₂O. Προσαρμογή του pH στην τιμή 7 με τη χρήση διαλύματος Tris/HCL pH 9.0.

Η σύνθεση των αντισημείωντων **μορφολινοφωσφοροδιαμιδικών** ολιγομερών (Morpholino Oligomer Molecules, MO) πραγματοποιήθηκε από τη Gene Tools και για τις ενέσεις παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα (Stock):

- ❖ MO *snai1a*: 1mM, Mr = 8127.82
- ❖ MO *nr4a3*: 1 mM, Mr = 8476.13
- ❖ MO *hhatlb*: 1 mM, Mr = 8289.96
- ❖ MO *sfrp2*: 1 mM, Mr = 8434.07
- ❖ MO *zgc:92518* : 1 mM, Mr = 7799.52

Γ.3.Μέθοδοι

Γ.3.1 Διασταυρώσεις ενήλικων ατόμων zebrafish

Τα ενήλικα ψάρια *Danio rerio* καθίστανται αναπαραγωγικά μεταξύ της 10^{ης} με 12^{ης} εβδομάδας. Τα άτομα που διατηρούνται στα ενυδρεία της Μονάδας Ζωικών Προτύπων είναι ενεργά όλο το χρόνο και έχουμε τη δυνατότητα να τα διασταυρώνουμε μία με δύο φορές την εβδομάδα. Για να επιτευχθεί μία διασταύρωση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

1. Λήψη ενός αρσενικού και ενός θηλυκού ατόμου της επιθυμητής οικογένειας με τη βοήθεια μίας απόχης.
2. Τοποθέτηση των επιλεγμένων ψαριών σε δοχείο 1 L, το οποίο είναι γεμισμένο με νερό από τα συστήματα του ενυδρείου. Στο δοχείο έχει τοποθετηθεί ένα μεταλλικό δίχτυ, όπου θα διαχωρίζει τα δύο άτομα. Από αυτό μπορούν να διαπεράσουν τα αυγά. Κάτω από το δίχτυ θα τοποθετηθεί το αρσενικό, ενώ πάνω από αυτό το θηλυκό. Στη συνέχεια, το δοχείο σκεπάζεται με ένα ειδικό πλαστικό σκέπαστρο. Τα ψάρια αφήνονται διαχωρισμένα με αυτό τον τρόπο όλη τη νύχτα (16 ώρες) .
3. Τοποθέτηση και των δύο ατόμων το επόμενο πρωί στο επάνω μέρος του διχτυού. Δεν απομακρύνεται το δίχτυ προκειμένου να αποφευχθεί η πιθανή κατάποση των αυγών από τους γονείς.

4. Αναμονή για να επιτευχθεί γονιμοποίηση. Το θηλυκό θα γεννήσει τα αυγά και αυτά στη συνέχεια θα γονιμοποιηθούν από τα σπερματοζώαρια που έχουν απελευθερωθεί από το αρσενικό.
5. Συλλογή των αυγών και επιστροφή των ενήλικων ψαριών στα δοχεία που ανήκουν.



Εικόνα 18: Αναπαράσταση της οργάνωσης των ενήλικων zebrafish για να διασταυρωθούν. Πηγή:<http://www.fac.org.ar/scvc/lave/pediat/diaz/diazi.htm>

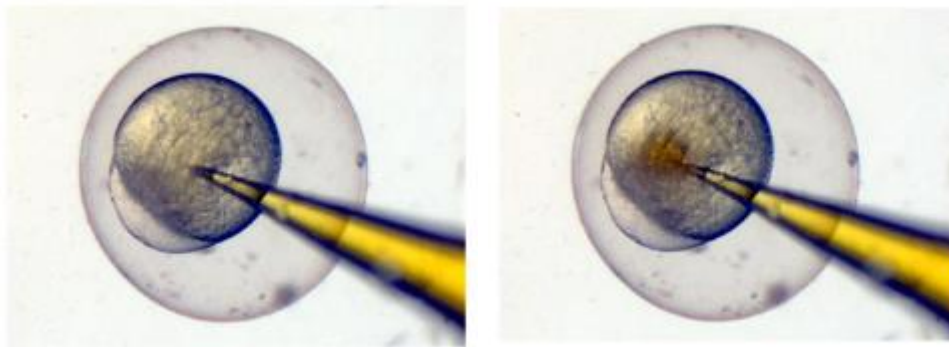
Γ.3.2 Μικροενέσεις με Αντισημαίνοντα Μορφολινοφωσφοδιαμιδικά Ολιγομερή (MO) σε έμβρυα zebrafish

Όταν γεννηθούν και γονιμοποιηθούν τα αυγά είναι απαραίτητο να συλλεχθούν γρήγορα διότι οι μικροενέσεις πρέπει να υλοποιηθούν στο στάδιο του 1 κυττάρου, δηλαδή στα πρώτα 40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Αφού συλλεχθούν τα αυγά, χρησιμοποιώντας ένα σουρωτήρι, μεταφέρονται σε petri με Egg Water.

Για την διαδικασία των μικροενέσεων ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα:

1. Τοποθέτηση βελόνας στο φορέα μικροένεσης, η οποία περιέχει σε όλο της το μήκος λάδι προκειμένου να δημιουργηθεί κενό αέρος.

2. Πατώντας το κουμπί fill εισέρχεται στη βελόνα το διάλυμα MO.
3. Μεταφορά των γονιμοποιημένων εμβρύων σε εκμαγείο αγαρόζης 2% (αύλακες με πλάτος ενός εμβρύου). Τα έμβρυα θα τοποθετηθούν σε σειρά σε αυτές με τη βοήθεια μιας πιπέτας.
4. Με τη χρήση στερεοσκοπίου υλοποιούνται οι ενέσεις. Εισάγεται η βελόνα στο ζωικό πόλο, ιδανικά μέσα στο κύτταρο ή αλλιώς στη λέκιθο κοντά στο κύτταρο και πατώντας το κουμπί inject θα αφεθεί το διάλυμα MO (4.6 nl) στο αυγό.
5. Συλλογή των αυγών που ενέθηκαν σε petri με Egg Water. Είναι απαραίτητο να φυλαχθούν κάποια μη ενεμένα έμβρυα ως μάρτυρες (control).



Εικόνα 19: Μικροένεση σε έμβρυο zebrafish.

Πηγή: http://people.hsc.edu/facultystaff/edevlin/edsweb01/zebrafish_and_retin_oic_acid.htm

Τα διαλύματα MO που ενέθηκαν στα έμβρυα zebrafish περιέχουν τη χρωστική κόκκινο της φαινόλης (phenol red). Η χρωστική αυτή βοηθάει στον οπτικό έλεγχο επιτυχημένης ένεσης. Τα διαλύματα είναι τα εξής:

❖ Για το γονίδιο *snaila*:

- Διάλυμα MO 1 συγκέντρωσης $c_1=6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 4 μl MO Stock και 1 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,0299 \mu\text{g}$.
- Διάλυμα MO 2 συγκέντρωσης $c_2=4,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 3 μl MO Stock και 2 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,02208 \mu\text{g}$.
- Διάλυμα MO 3 συγκέντρωσης $c_3=3,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 2 μl MO Stock, 2 μl phenol red και 1 μl water for injections. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,01495 \mu\text{g}$.

- ❖ Για το γονίδιο *nr4a3*:
 - Διάλυμα MO συγκέντρωσης $c=6.8$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 4 μl MO Stock και 1 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,03128$ μg .

- ❖ Για το γονίδιο *hhatlb*:
 - Διάλυμα MO συγκέντρωσης $c=5.8$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 3.5 μl MO Stock και 1.5 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,02668$ μg .

- ❖ Για το γονίδιο *sfrp2*:
 - Διάλυμα MO συγκέντρωσης $c=5.9$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 3.5 μl MO Stock και 1.5 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,02714$ μg .

- ❖ Για το γονίδιο *zgc:92518*:
 - Διάλυμα MO συγκέντρωσης $c=6.239$ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Προσθήκη 4 μl MO Stock και 1 μl phenol red. Σε κάθε έμβρυο εισέρχονται $m=0,0286$ μg .

Γ.3.3 Χειρισμοί των εμβρύων zebrafish

Μετά τη συλλογή των εμβρύων, για την απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών που πιθανόν υπάρχουν στο νερό, πραγματοποιείται η μέθοδος απολύμανσης (bleaching). Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

1. Επώαση των εμβρύων στο διάλυμα καθαρισμού (bleaching buffer) για 5 λεπτά.
2. Ξέπλυμα προσθέτοντας Egg Water. Αναμονή για 5 λεπτά.
3. Επανάληψη των βημάτων 1 και 2 για ακόμη δύο φορές.
4. Προσθήκη διαλύματος egg water με methylene blue και διατήρηση των αυγών σε αυτό για 24 ώρες.

Κατόπιν, με τη βοήθεια του στερεοσκοπίου απομακρύνονται τα νεκρά και μη γονιμοποιημένα αυγά. Η παρατήρηση του φαινοτύπου των εμβρύων επιτυγχάνεται

στις 24, 48, 72 hpf και στις 5 dpf. Στις 24 ώρες προστίθονται 120 μl προνάσης στο petri με τα έμβρυα για να σπάσει το χόριο, το οποίο έχει σκληρύνει μετά τη διαδικασία του bleaching και έτσι καθίσταται δύσκολο στα έμβρυα να ελευθερωθούν από αυτό. Το ένζυμο αυτό διασπά τις πρωτεΐνες του χορίου με αποτέλεσμα αυτό να μαλακώνει. Η επώαση πραγματοποιείται για μία ώρα σε επωαστικό θάλαμο στους 28 °C. Ακολουθούν 3 πλύσεις με διάλυμα Egg Water με methylene blue. Έπειτα, προστίθεται στο petri διάλυμα egg water με methylene blue το οποίο περιέχει PTU. Το PTU εμποδίζει την παραγωγή της μελανίνης από τα μελανοκύτταρα με αποτέλεσμα να διατηρούνται διάφανα τα έμβρυα και να είναι δυνατή η παρατήρηση των οργάνων τους.

Γ.3.4 Σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων-στόχων για τη σύνθεση του gRNA για το πρωτόκολλο CRISPR.

Η δημιουργία μεταλλαγμένων σειρών zebrafish περιλαμβάνει το σχεδιασμό ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία θα κλωνοποιηθούν προκειμένου να παραχθεί ένα mRNA συμπληρωματικό ως προς την περιοχή του γονιδίου όπου θα επιτευχθεί η μεταλλαγή. Το μετάγραφο αυτό αποτελεί το gRNA-οδηγό, όπου θα χρησιμοποιήσει η Cas9 νουκλεάση για να δράσει.

Η περιοχή του DNA-στόχου αποτελείται από μία αλληλουχία 20 νουκλεοτιδίων, την οποία ακολουθεί το μοτίβο PAM (NGG). Η ύπαρξη αυτού του στοιχείου αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη σωστή λειτουργία του συστήματος. Ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων της περιοχής-στόχου του κάθε γονιδίου υλοποιήθηκε με το εργαλείο CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). Τα ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων αναγράφονται παρακάτω. Με κόκκινο αναφέρονται οι ακολουθίες PAM.

❖ *Snai1a*

Περιοχή στόχος: 5'AGAAGTATTTACCCAGCAAGAGG 3' (Εξώνιο 2)

Ολιγονουκλεοτίδιο 1: 5'TAGGAGAAGTATTTACCCAGCAAG 3',Tm: 61.8

Ολιγονουκλεοτίδιο 2: 5'AAACCTTGCTGGTGAAATACTTCT 3',Tm: 60.1

❖ *Nr4a3*

Περιοχή στόχος: 5'ACTGGGTAAGGAAGTGGTGG**CGG** 3' (Εξώνιο 4)

Ολιγονουκλεοτίδιο 1: 5'**TAGG**ACTGGGTAAGGAAGTGGTGG 3', Tm: 67.0

Ολιγονουκλεοτίδιο 2: 5'**AAACCC**ACCACTTCCTTACCCAGT 3', Tm: 65.3

❖ *Hhatlb*

Περιοχή στόχος: 5'GATGGGCCCGAAGTAAAAGA**AGG** 3' (Εξώνιο 6)

Ολιγονουκλεοτίδιο 1: 5'**TAGG**GATGGGCCCGAAGTAAAAGA 3', Tm: 62.9

Ολιγονουκλεοτίδιο 2: 5'**AAACTC**TTTTACTTCGGGCCCAT 3', Tm: 63.5

❖ *Sfrp2*

Περιοχή στόχος: 5'CTGTGTGAGAGCGTGAAGAG**CGG** 3' (Εξώνιο 1)

Ολιγονουκλεοτίδιο 1: 5'**TAGG**CTGTGTGAGAGCGTGAAGAG 3', Tm: 67.0

Ολιγονουκλεοτίδιο 2: 5'**AAACCTC**TTACGCTCTCACACAG 3', Tm: 65.3

❖ *Zgc: 92518*

Περιοχή στόχος: 5'AAGATCATTGAGCTGGGAGC**CGG** 3' (Εξώνιο 3)

Ολιγονουκλεοτίδιο 1: 5'**TAGG**AAGATCATTGAGCTGGGAGC 3', Tm: 65.3

Ολιγονουκλεοτίδιο 2: 5'**AAACG**CTCCCAGCTCAATGATCTT 3', Tm: 63.5

Δ.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

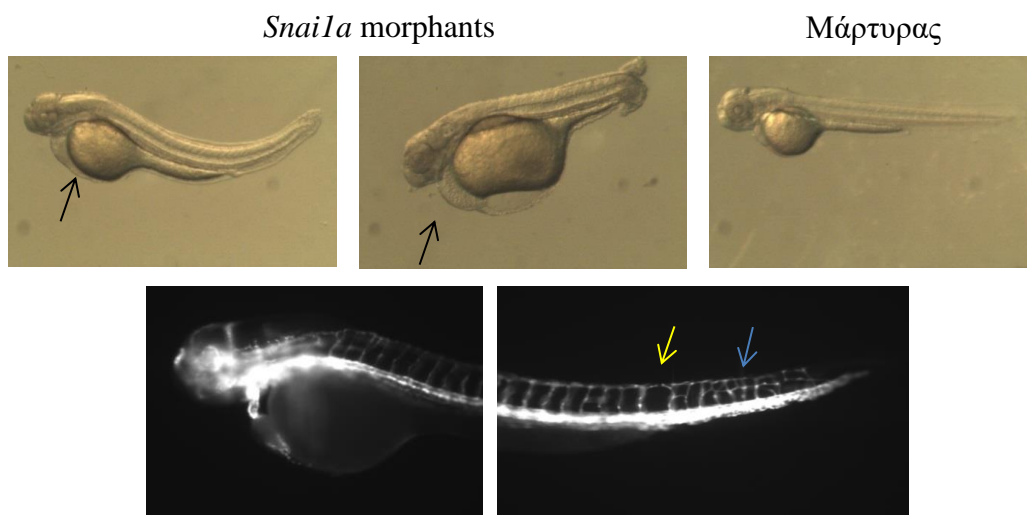
Δ.1 MO *Snail*a

Ο πρώτος έλεγχος περιλάμβανε ενέσεις με διάλυμα MO 1 *Snail*a συγκέντρωσης $c1 = 6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4 μl MO + 1 μl phenol red, $m1 = 0,0299 \mu\text{g}/\text{embryo}$). Παρατηρήθηκαν τα έμβρυα στις 24 hpf, όπου το 36.69% των εμβρύων είχαν πεθάνει και το 22.93% εμφάνιζαν καμπυλότητα στην ουρά τους (Εικόνα 20 Α). Στη συνέχεια, στις 48 hpf από τα zebrafish που επιβίωσαν το 21.74% είχε οίδημα στην καρδιά και καμπυλωτή ουρά. Επίσης, σε μία από τις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, το 30.76% των εμβρύων εμφάνιζαν ανωμαλίες στην αγγείωση του κορμού του σώματος τους, οι οποίες αφορούν την απουσία αγγείων και το σχηματισμό μη φυσιολογικών ενώσεων μεταξύ τους (Εικόνα 20 Β). Στις 72 hpf, εντοπίστηκαν έμβρυα με οίδημα στην καρδιά και αργό καρδιακό χτύπο σε ποσοστό 21.74% και έμβρυα τα οποία δεν είχαν καθόλου αιματική κυκλοφορία σε ποσοστό 10.14% (Εικόνα 20 Γ). Στις 5dpf παρατηρήθηκαν ακριβώς οι ίδιοι φαινότυποι με τα αντίστοιχα ποσοστά με αυτά των 72 hpf (Εικόνα 20 Δ).

A) 24 hpf



B) 48 hpf



Γ) 72 hpf

Snaila morphants

Μάρτυρας



Δ) 5 dpf

Snaila morphants

Μάρτυρας



Εικόνα 20: Απεικόνιση των φαινοτύπων των εμβρύων που ενέθηκαν με MO *Snaila* 1 ($c1= 6.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Α) Έμβρυα 24 hpf με καμπυλωτές ουρές. Β) Έμβρυα 48 hpf με μεγάλα οιδήματα στην καρδιά (επισημαίνονται με μαύρα βέλη) και καμπυλωτές ουρές. Με κίτρινο βέλος τονίζεται το σημείο που απουσιάζουν αγγεία και με μπλε οι μη φυσιολογικές ενώσεις που δημιουργούνται στην αγγείωση. Γ,Δ) Έμβρυα στις 72 hpf και στις 5 dpf αντίστοιχα με ανώμαλα αναπτυγμένες ουρές και καρδιακά οιδήματα.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε μία σειρά πειραμάτων όπου αφορούσαν τις ενέσεις με διάλυμα MO 2 *Snaila* συγκέντρωσης $c2= 4.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (3μl stock MO + 2μl phenol red, $m2=0.02208 \mu\text{g}/\text{embryo}$). Στις 24 hpf το ποσοστό της θνησιμότητας ήταν στο 22.64%. Από τα έμβρυα που επιβίωσαν το 43.9% εμφάνιζε ανωμαλίες στον άξονα του σώματος του, ενώ τα υπόλοιπα ήταν φυσιολογικά (Εικόνα 21 Α). Στις 48 hpf, καταγράφηκε 2.43% θνησιμότητα. Το 15% των εμβρύων είχαν καρδιακά οιδήματα και δεν είχαν καθόλου κυκλοφορία αίματος, το 12.5% είχαν καρδιακά οιδήματα και αργή κυκλοφορία αίματος και σε ποσοστό 15% τα έμβρυα χαρακτηρίζονταν μόνο από καμπυλωτές ουρές (Εικόνα 21 Β). Ενώ, το 60% αυτών δεν εμφάνιζαν κάποιο φαινότυπο. Στις 72 hpf, πάλι η θνησιμότητα βρίσκεται στο

2.5% και το ποσοστό των εμβρύων που έχουν καρδιακό οίδημα και καθόλου αιματική ροή είναι 15.38%, ενώ αυτά που έχουν οίδημα και αργή κυκλοφορία είναι σε ποσοστό 15.38% (Εικόνα 21 Γ). Τα φυσιολογικά έμβρυα αντιστοιχούν στο 74.35%. Τέλος, στις 5 dpf η θνησιμότητα βρίσκεται στο 7.69%, τα έμβρυα χωρίς κυκλοφορία αίματος στο 5.5% και αυτά που ο φαινότυπος τους χαρακτηριζόταν μόνο από καμπυλότητα στην ουρά στο 8.3% (Εικόνα 21 Δ).

Πιο αναλυτικά, σε μία ενδεικτική δοκιμή 4 έμβρυα πέθαναν, 3/30 διέθεταν στριφογυριστές ουρές, 12/30 καμπυλωτές ουρές και 15/30 ήταν φυσιολογικά στις 24 hpf. Την επόμενη μέρα, 1 έμβρυο πέθανε, 3/29 δεν είχαν καθόλου αιματική ροή και είχαν στριφογυριστές ουρές, 5/29 είχαν αργή κυκλοφορία και καμπυλωτές ουρές και 6/29 διέθεταν μόνο ανώμαλο ουραίο πτερύγιο. Ενώ, 15/29 δεν εμφάνιζαν κάποιο φαινότυπο. Στις 72 hpf, 1 έμβρυο ήταν νεκρό, 3/28 παρατηρήθηκαν να έχουν στριφογυριστή ουρά και καθόλου κυκλοφορία και 6/28 χαρακτηρίζονταν από αργή ροή και καμπυλωτή ουρά. Στις 5 dpf, εντοπίστηκαν 3 νεκρά έμβρυα, 2/25 είχαν αργή ροή και 3/25 εμφάνιζαν μόνο καμπυλωτή ουρά.

Τέλος, υλοποιήθηκαν δύο δοκιμασίες ενέσεων με διάλυμα MO 3 *Snaila* συγκέντρωσης $c3= 3.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (2μl stock MO + 2μl phenol red + 1μl water for injections, $m3=0.01495 \mu\text{g}/\text{embryo}$), στις οποίες δεν ανιχνεύτηκε κάποιος φαινότυπος στα έμβρυα zebrafish.

A) 24 hpf

Snaila morphants



Μάρτυρας



B) 48 hpf

Snaila morphants



Μάρτυρας



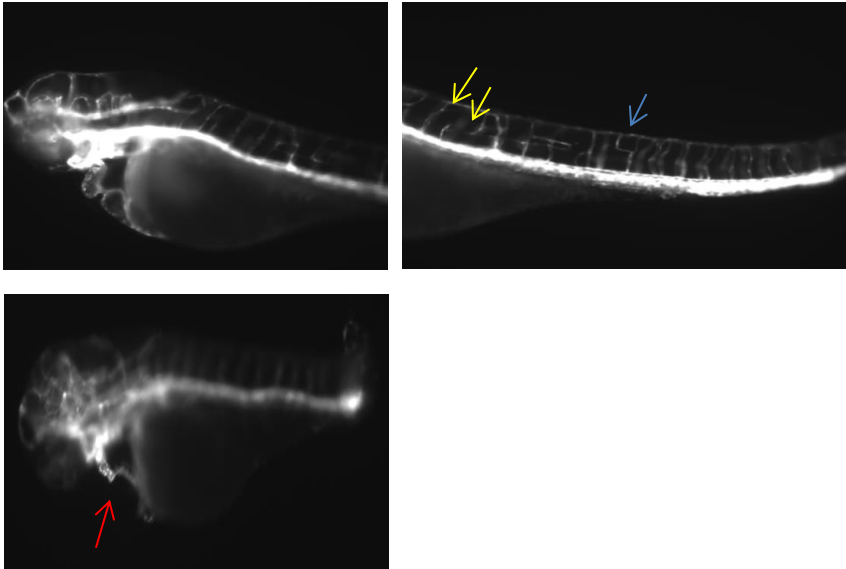
Γ) 72 hpf

Snaila morphants

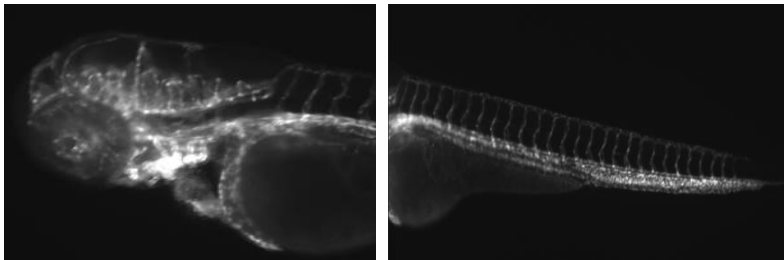
Μάρτυρας



Snaila morphants



Μάρτυρας



Δ) 5 dpf

Snaila morphants

Μάρτυρας



Εικόνα 21: Παρατήρηση των φαινοτύπων των εμβρύων που ενέθηκαν με MO *Snail1a* 2 ($c_2 = 4.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Α) Έμβρυα στις 24 hpf με στριφογυριστές και καμπυλωτές ουρές. Β) Έμβρυα στις 48 hpf με μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και ανωμαλίες στο ουραίο πτερύγιο. Γ) Έμβρυα στις 72 hpf με καρδιακά οιδήματα. Εντοπίζεται έμβρυο με πολύ λεπτό κόλπο και κοιλία (κόκκινο βέλος). Με μπλε βέλη τονίζονται οι μη φυσιολογικές ενώσεις που δημιουργούνται μεταξύ των αγγείων και με κίτρινα βέλη τα μη ολοκληρωμένα αγγεία. Δ) Έμβρυα στις 5 dpf με μη φυσιολογικά αναπτυγμένες ουρές και καρδιακά οιδήματα.

Δ.2 MO *Nr4a3*

Εξετάστηκε ο φαινότυπος εμβρύων, τα οποία είχαν ενεθεί με διάλυμα MO *Nr4a3* συγκέντρωσης $c = 6.8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4 μl stock MO + 1 μl phenol red, $m = 0,03128 \mu\text{g}/\text{embryo}$). Στις 24 hpf καταγράφηκε 50% θνησιμότητα. Από τα άτομα που έζησαν το 90% εμφάνιζαν καμπύλωση στον άξονα του σώματος τους και μικρό κεφάλι, ενώ μόνο το 10% ήταν φυσιολογικά (Εικόνα 22Α). Την επόμενη μέρα, στις 48 hpf το 21% των εμβρύων βρέθηκαν νεκρά, το 60% των επιζώντων είχαν καρδιακό οίδημα, βραδυκαρδία αλλά δεν διέθεταν αιματική κυκλοφορία. Το υπόλοιπο 40% είχαν φυσιολογική ροή αίματος αλλά παρατηρούνταν οίδημα στην καρδιά τους (Εικόνα 22Β). Στις 72 hpf, η θνησιμότητα ήταν στο 8%, τα έμβρυα με καρδιακό οίδημα, βραδυκαρδία και χωρίς αιματική ροή ήταν στο 56%, ενώ αυτά που παρουσίαζαν μόνο καρδιακό οίδημα ήταν σε ποσοστό 43% (Εικόνα 22Γ). Η τελική παρατήρηση υλοποιήθηκε στις 5 dpf, όπου το 60% των ατόμων πέθαναν. Από αυτά που επιβίωσαν είχαν όλα μεγάλα καρδιακά οιδήματα, το 52% αυτών δεν είχαν καθόλου κυκλοφορία αίματος, ενώ το υπόλοιπο 48% αντιστοιχούσε σε αυτά που διέθεταν φυσιολογική ροή (Εικόνα 22Δ).

Σε μία αντιπροσωπευτική δοκιμή στις 24 hpf πέθαναν 55 έμβρυα, 30/38 είχαν καμπυλωτό άξονα σώματος και μικρότερο κεφάλι από τα φυσιολογικά. Η επόμενη παρατήρηση έγινε στις 48 hpf, όπου 7 άτομα ήταν νεκρά, 15/31 έμβρυα δεν είχαν αιματική ροή, είχαν βραδυκαρδία, οίδημα στην καρδιά και μικρότερο σώμα από τα φυσιολογικά. Επίσης, εντοπίστηκαν 10/31 άτομα που χαρακτηρίζονταν μόνο από καρδιακό οίδημα. Στις 72 hpf, 2 έμβρυα πέθαναν, 13/29 είχαν μικρό κεφάλι, βραδυκαρδία, καρδιακό οίδημα και απουσίαζε η κυκλοφορία αίματος, ενώ 10/29

είχαν μόνο οίδημα στην καρδιά. Τέλος, στις 5 dpf, 21 έμβρυα πέθαναν και 8/8 άτομα zebrafish είχαν φυσιολογική ροή αίματος με καρδιακό οίδημα.

A) 24 hpf

Nr4a3 morphants

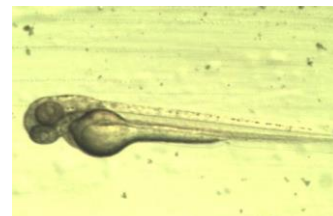
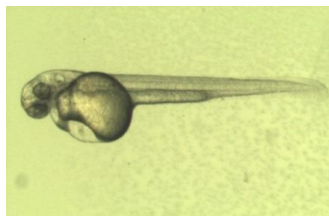
Μάρτυρας



B) 48 hpf

Nr4a3 morphants

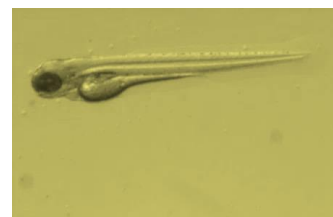
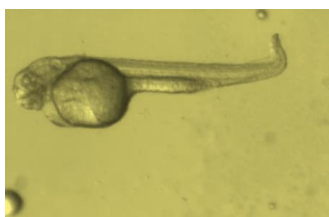
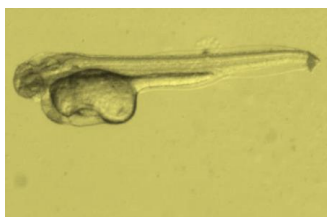
Μάρτυρας



Γ) 72 hpf

Nr4a3 morphants

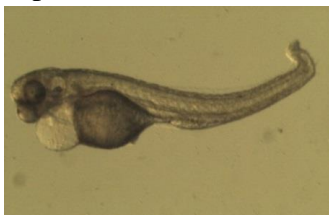
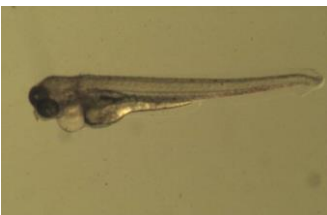
Μάρτυρας



Δ) 5 dpf

Nr4a3 morphants

Μάρτυρας

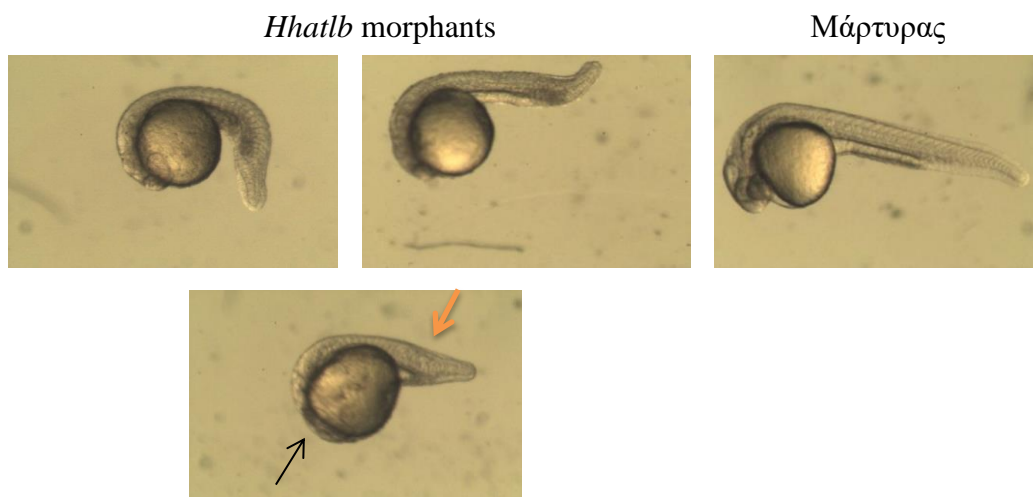


Εικόνα 22: Απεικόνιση φαινοτύπου εμβρύων zebrafish, τα οποία έχουν ενεθεί με MO *Nr4a3* ($c=6.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Α) Έμβρυα 24 hpf με καμπυλωτό σώμα. Β,Γ) Έμβρυα 48 και 72 hpf αντίστοιχα με καρδιακά οιδήματα και μικρά κεφάλια. Δ) Έμβρυα 5 dpf με μεγάλα καρδιακά οιδήματα και καμπυλωτό άξονα σώματος.

Δ.3 MO *Hhatlb*

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος με το διάλυμα MO *Hhatlb* συγκέντρωσης $c=5.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (3.5μl stock MO + 1.5μl phenol red, $m=0.02668\mu\text{g}/\text{embryo}$), με το οποίο επιτεύχθηκαν ενέσεις σε γονιμοποιημένα αυγά zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου. Παρακολουθήθηκαν τα έμβρυα αυτά για 3 ημέρες. Στις 24 hpf, η θνησιμότητα ήταν στο 45%, πολλά έμβρυα είχαν μη καλά σχηματισμένο κεφάλι ή και ουρά, καθώς τα υπόλοιπα είχαν κοντό άξονα σώματος (Εικόνα 23Α). Έπειτα, στις 48 hpf και στις 72 hpf το 80% των εμβρύων είχαν μεγάλα καρδιακά οιδήματα και δεν υπήρχε ροή αίματος και το υπόλοιπο 20% αυτών είχαν οίδημα στην καρδιά αλλά και μικρό σώμα (Εικόνα 23Β,Γ).

A) 24 hpf



B) 48 hpf



Γ) 72 hpf

Hhatlb morphants

Μάρτυρας



Εικόνα 23: Παρατήρηση φαινοτύπων εμβρύων zebrafish, στα οποία έχει γίνει έγχυση διαλύματος MO *Hhatlb* ($c= 5.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Α) Έμβρυα στις 24 hpf με μικρό άξονα σώματος. Το μαύρο βέλος δείχνει το μη σχηματισμένο κεφάλι ενός εμβρύου και το πορτοκαλί τη μη αναπτυγμένη ουρά. Β,Γ) Ο φαινότυπος των εμβρύων στις 48 και 72 hpf χαρακτηρίζεται από μεγάλα καρδιακά οίδημα και καμπυλωτά σώματα.

Δ.4 MO *Sfrp2*

Προκειμένου να ελεγχθεί ο ρόλος του γονιδίου *sfrp2* πραγματοποιήθηκαν ενέσεις με διάλυμα MO *Sfrp2* συγκέντρωσης $c= 5.9\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ($3.5\mu\text{l}$ stock MO + $1.5\mu\text{l}$ phenol red, $m=0.02714\mu\text{g}/\text{embryo}$). Στις 24 hpf, το 27.08% των εμβρύων ήταν νεκρά. Από αυτά που επιβίωσαν το 62.85% είχαν καμπυλωτές ουρές, ενώ το 4.28% είχαν στριφογυριστό ουραίο πτερύγιο (Εικόνα 24Α). Ωστόσο, στις 48 και 72 hpf μόνο το 2.85% χαρακτηριζόταν από μεγάλο καρδιακό οίδημα και απουσία αιματικής κυκλοφορίας. Το 97.15% των εμβρύων δεν εμφάνιζαν κάποιο φαινότυπο (Εικόνα 24Β,Γ). Σε ένα αντιπροσωπευτικό πείραμα στις 24 hpf πέθαναν 4 έμβρυα και 1/13 είχε στριφογυριστή ουρά. Ενώ, στις 48 hpf, 1/13 έμβρυα εμφάνισε μεγάλο οίδημα στην καρδιά και δεν είχε καθόλου ροή αίματος και 12/13 ήταν φυσιολογικά. Η ίδια αναλογία παρατηρήθηκε και την επόμενη μέρα.

Α) 24 hpf

Sfrp2 morphants

Μάρτυρας



B) 48 hpf

Sfrp2 morphants

Μάρτυρας



Γ) 72 hpf

Sfrp2 morphants

Μάρτυρας



Εικόνα 24: Φαινοτυπική παρατήρηση εμβρύων zebrafish ενεμένων με MO *Sfrp2* ($c=5.9\mu\text{g}/\mu\text{l}$). A) 24 hpf, ενεμένο έμβryo με στριφογυριστή ουρά (1) και έμβryo με καμπυλωτό σώμα (2). B) 48 hpf, ενεμένο έμβryo με στριφογυριστή ουρά (1) και ενεμένο έμβryo χωρίς φαινότυπο (2). Γ) 72 hpf, άτομο με μεγάλο καρδιακό οίδημα (1) και άτομο χωρίς την εμφάνιση κάποιου φαινοτύπου (2).

Δ.5 MO *Zgc:92518*

Ελάχιστες πληροφορίες είναι γνωστές για το γονίδιο *zgc:92518*. Τα πειράματα, όμως, που πραγματοποιήθηκαν εγχέοντας το διάλυμα MO *Zgc:92518* συγκέντρωσης $c=6,239\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (4 μl stock MO + 1 μl phenol red, $m=0,0286\mu\text{g}/\text{embryo}$) σε έμβρυα zebrafish έδειξαν ότι το γονίδιο αυτό φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στις 24 hpf το 34.59% των εμβρύων ήταν νεκρά. Από αυτά που επιβίωσαν το 38.84% εμφάνιζαν καμπυλωτό σώμα και μικρή ουρά (Εικόνα 25A.1), ενώ το 23.97% είχαν μόνο καμπυλωτό άξονα (Εικόνα 25A.2). Στις 48 hpf, η θνησιμότητα ήταν σε ποσοστό 42.15%. Το 20% των ζωντανών εμβρύων δεν είχαν καθόλου κυκλοφορία αίματος και χαρακτηρίζονταν από μεγάλα καρδιακά οίδημα, μικρού μήκους ουρές αλλά και από οίδημα στο πάνω μέρος της κεφαλής (Εικόνα 25B.1). Το 51.43% των ατόμων εμφάνιζαν οίδημα στην καρδιά και στο πάνω μέρος του κεφαλιού, μικρή και καμπυλωτή ουρά, όμως είχαν φυσιολογική κυκλοφορία

(Εικόνα 25B.2). Το υπόλοιπο 28.57% των εμβρύων ήταν φυσιολογικά. Κατόπιν, παρατηρήθηκαν τα έμβρυα στις 72 hpf, όπου το 2.85% αυτών πέθαναν. Από τα zebrafish που επιβίωσαν, το 25% των ατόμων δεν είχαν ροή αίματος και εντοπίζονταν σε αυτά μεγάλα καρδιακά οιδήματα, οιδήματα στην πάνω περιοχή του κεφαλιού και μικρές και καμπυλωτές ουρές (Εικόνα 25Γ.1). Το 23.53% των ατόμων εμφάνιζαν τα ίδια χαρακτηριστικά με τα προηγούμενα, όμως, είχαν φυσιολογική κυκλοφορία (Εικόνα 25Γ.2), καθώς το 51.47% ήταν φυσιολογικά έμβρυα.

Σε μία αντιπροσωπευτική δοκιμή, στις 24 hpf, 16 έμβρυα πέθαναν, 31/69 είχαν έντονα καμπυλωτό σώμα και μικρή ουρά, 11/69 είχαν φυσιολογικό μήκος αλλά καμπυλωτό σώμα. Στις 48 hpf, 8 άτομα ήταν νεκρά, 13/61 εμφάνιζαν μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και στο κεφάλι και δεν είχαν αιματική κυκλοφορία, ενώ διέθεταν κοντό άξονα σώματος. Επίσης, καταγράφηκαν 29/61 άτομα, τα οποία είχαν τον ίδιο φαινότυπο αλλά φυσιολογική κυκλοφορία. Την 3^η μέρα μετά τη γονιμοποίηση, 1 έμβρυο ήταν νεκρό, 15/60 είχαν πολύ μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και το κεφάλι και δεν είχαν ροή και 29/60 χαρακτηρίζονταν από καμπυλωτή ουρά, ομαλή ροή αλλά και από οιδήματα στην καρδιά και στο πάνω μέρος της κεφαλής.

A) 24 hpf



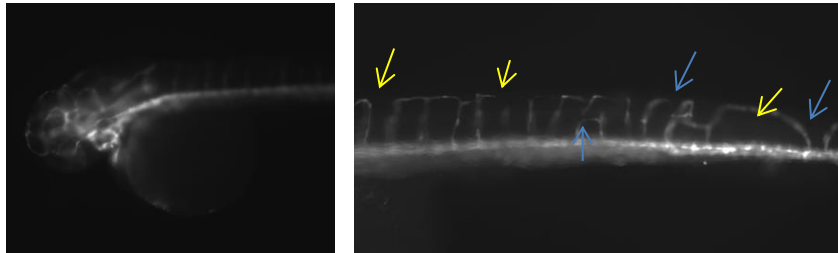
B) 48 hpf



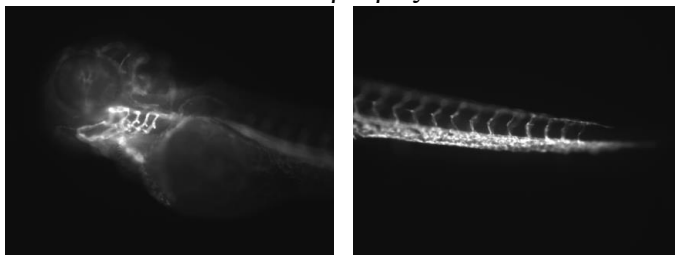
Γ)72 hpf



Zgc:92518 morphant (Embryo 3)



Μάρτυρας



Εικόνα 25: Φαινοτυπική απεικόνιση εμβρύων που έχουν ενεθεί με MO *Zgc:92518* ($c= 6,239\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Α) Έμβρυα 24 hpf: έμβρυο με καμπυλωτό και μικρό σώμα (1) και έμβρυο με καμπύλωση στον άξονα του Β) Έμβρυα 48 hpf: έμβρυο με μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και το κεφάλι (μαύρα βέλη) και μικρό καμπυλωτό σώμα (1) και έμβρυο με οιδήματα στην καρδιά και το κεφάλι και κανονικού μήκους καμπυλωτό σώμα (2). Γ) Έμβρυα 72 hpf: έμβρυο με πολύ μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και το κεφάλι (μαύρα βέλη) και μη αναπτυγμένο ουραίο πτερύγιο (1), έμβρυο με οιδήματα στην καρδιά και το κεφάλι και κανονικού μήκους καμπυλωτό σώμα (2) και έμβρυο με μειωμένο αριθμό αγγείων και μη ολοκληρωμένα αγγεία (κίτρινα βέλη) και μη φυσιολογικές ενώσεις αγγείων (μπλε βέλη).

Ε.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το zebrafish (*Danio rerio*) έχει αναδειχθεί ως ένα πρότυπο μοντέλο των σπονδυλωτών οργανισμών για τη διερεύνηση της μοριακής βάσης της ανάπτυξης της καρδιάς αλλά και για την αξιολόγηση του θεραπευτικού δυναμικού διάφορων μικρών μορίων. Οι καρδιοπάθειες περιλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών, οι οποίες αποτελούν την κύρια αιτία της ανθρώπινης θνησιμότητας (Giardoglou and Beis 2019). Έτσι λοιπόν, η ανάγκη μελέτης του γενετικού υποβάθρου των ασθενειών αυτών χαρακτηρίζεται ως επιτακτική. Το τροπικό αυτό ψάρι ζέβρα εμφανίζει πολλά πλεονεκτήματα και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιείται ευρέως ως πειραματόζωο από πολλές επιστημονικές ομάδες.

Τόσο γενετικοί όσο και μη γενετικοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν καρδιοπάθεια στον άνθρωπο. Οι γενετικοί αφορούν διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, μόρια σηματοδότησης και μηχανές συστολής, παράμετροι που είναι κρίσιμοι και για την ανάπτυξη της καρδιάς του zebrafish, στους οποίους εστιάζει η μελέτη αυτή. Η καρδιά του συγκεκριμένου μοντέλου αναπτύσσεται με τέτοιο τρόπο, ο οποίος ταυτίζεται σε μεγάλο βαθμό με αυτή των θηλαστικών. Αξιοποιώντας την ικανότητα αυτή του οργανισμού και με τη βοήθεια των τεχνικών επεξεργασίας του γονιδιώματος έχουν χαρακτηριστεί κάποια υποψήφια γονίδια, που ρυθμίζουν τη μορφογένεση της καρδιάς αλλά και που πιθανόν μεταλλάξεις σε αυτά ευθύνονται για την εμφάνιση δυσπλασιών στο καρδιαγγειακό σύστημα (D. Brown et al. 2016).

Έχει αποδειχθεί ότι τα θηλαστικά έχουν περιορισμένη ικανότητα καρδιακής αναγέννησης σε περίπτωση τραυματισμού του μυοκαρδίου, παραδείγματος χάρη μετά από ένα έμφραγμα, ενώ η πιθανότητα αναγέννησης των καρδιακών βαλβίδων δεν έχει διερευνηθεί. Ωστόσο, το zebrafish έχει τη δυνατότητα αναγέννησης της καρδιάς του σε όλη τη διάρκεια της ζωής του. Έτσι λοιπόν, οι ερευνητές έχουν εστιάσει το ενδιαφέρον τους στην αναγνώριση των σηματοδοτικών μονοπατιών που ρυθμίζουν την αναγέννηση των οργάνων του ψαριού ζέβρα. Η κατανόηση αυτών των μονοπατιών θα μπορούσε να οδηγήσει στην αξιοποίηση τους με σκοπό την ενεργοποίηση του μηχανισμού της αναγέννησης στα θηλαστικά όταν συμβεί μία βλάβη.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα κατά τα οποία αρχικά προκλήθηκαν βλάβες στις καρδιακές βαλβίδες ατόμων zebrafish και ύστερα απομονώθηκαν οι καρδιές αυτές σε διάφορα στάδια της αναγέννησης τους. Κατόπιν, με την ταυτοποίηση του

μεταγραφώματος κατά τη διάρκεια της αναγεννητικής διαδικασίας, ανιχνεύτηκαν κάποια γονίδια, που εμφανίζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Τα γονίδια αυτά είναι τα εξής: *snail1a*, *nr4a3*, *hhat1b*, *sfrp2* και *zgc:92518*. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία, ελέγχθηκε ο φαινότυπος που προκαλείται σε έμβρυα zebrafish καταστέλλοντας τη μετάφραση αυτών των γονιδίων με τη χρήση Αντισημαίνοντων **Μορφολινοφωσφοροδιαμιδικών Ολιγομερών (MO)**.

Υλοποιήθηκαν ενέσεις σε αυγά zebrafish, στο στάδιο του ενός κυττάρου, με διαλύματα MO *Snail1a* τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων ($c1=6.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c2=4,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, $c3=3,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Στον έλεγχο με το διάλυμα MO 1 η θνησιμότητα στις 24 hpf ήταν σε σχετικά μεγάλο ποσοστό (36.69%) σε σχέση με τις δοκιμές με το διάλυμα MO 2 (22.64%). Οι ενέσεις με το διάλυμα MO 3 δεν οδήγησαν στην εμφάνιση κάποιου φαινοτύπου, οπότε η συγκέντρωση αυτή κρίνεται πολύ λίγη για να πραγματοποιηθεί το πείραμα. Έτσι λοιπόν, καταλαβαίνουμε ότι το MO 1 είναι σε τοξικά επίπεδα για τα έμβρυα, ενώ η καταλληλότερη συγκέντρωση για την παρακολούθηση του φαινοτύπου για το γονίδιο αυτό είναι αυτή του διαλύματος MO 2 ($c2=4,8 \mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Με την ανάλυση του μεταγραφώματος, βρέθηκε ότι η έκφραση του *snail1a* μειώνεται κατά την αναγεννητική διαδικασία των καρδιακών βαλβίδων. Το γονίδιο αυτό είναι ένας καταστολέας του εξωδέρματος, που οδηγεί στη δημιουργία του μεσεγχύματος, ενώ στο zebrafish έχει κατασταλτική δράση ως προς το dEVL και τον κοιλιακό άξονα (Chen et al. 2012). Καταστέλλοντας την έκφραση του, ο φαινότυπος που παρατηρείται στα έμβρυα είναι καρδιακά οιδήματα και ανωμαλίες στο ουραίο πτερύγιο, οι οποίες πιθανόν ευθύνονται στη μη σωστή ανάπτυξη των αγγείων κατά μήκος του σώματος τους. Ο μη ολοκληρωμένος σχηματισμός των αγγείων και οι μη φυσιολογικές διακλαδώσεις που δημιουργούνται σχετίζονται πιθανόν με το ότι ένα ποσοστό των εμβρύων δεν είχαν καθόλου κυκλοφορία αίματος, ενώ ένα άλλο ποσοστό είχε πολύ αργή ροή. Η βαρύτητα του φαινοτύπου εξαρτάται από το βαθμό που έχουν αναπτυχθεί τα αγγεία.

Συνεπώς, το γονίδιο *snail1a* φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish και ειδικότερα μετά τις 48 hpf που ξεκινάει η ανάπτυξη των βαλβίδων, του αρτηριακού βολβού και άλλων σημαντικών δομών της καρδιάς. Ωστόσο, κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των

καρδιακών βαλβίδων πιθανόν μειώνονται τα επίπεδα του διότι ως καταστολέας να επηρεάζει μονοπάτια σημαντικά για την αναδιαμόρφωση των ιστών τους.

Οι έλεγχοι που πραγματοποιήθηκαν με το διάλυμα MO *nr4a3* ($c= 6.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$) χαρακτηρίζονταν από μεγάλα ποσοστά θνησιμότητας σε όλη τη διάρκεια των 5 ημερών όπου παρακολουθήθηκαν τα έμβρυα. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι πιθανόν η τιμή αυτή της συγκέντρωσης είναι τοξική για τα zebrafish και θα πρέπει να δοκιμαστεί το πείραμα με χαμηλότερη συγκέντρωση του MO.

Παρεμποδίζοντας την έκφραση του γονιδίου *nr4a3*, το μεγαλύτερο ποσοστό των εμβρύων διέθετε μεγάλο οίδημα στην καρδιά, βραδυκαρδία και δεν πραγματοποιούνταν η κυκλοφορία του αίματος. Η παρατήρηση των χαρακτηριστικών αυτών οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η παραγόμενη πρωτεΐνη πιθανόν έχει σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο στη δημιουργία του καρδιαγγειακού συστήματος στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης του ψαριού ζέβρα, καθώς μελέτες δείχνουν ότι συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων των λείων μυών των αγγείων (Nomiya et al. 2006). Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε ότι πολλά έμβρυα είχαν μικρότερο κεφάλι. Αυτός ο φαινότυπος φαίνεται να σχετίζεται με το γεγονός ότι το γονίδιο *nr4a3* εκφράζεται στο πρόσθιο τμήμα του τελεγκεφάλου και στο παρέγχυμα του zebrafish (Diotel et al. 2015), με αποτέλεσμα καταστέλλοντας το να μη σχηματίζεται σωστά το κεφάλι.

Το *nr4a3* αποτελεί σημαντικό παράγοντα της φλεγμονής επάγοντας την προσκόλληση των μονοκυττάρων στην εκάστοτε περιοχή (Zhao et al. 2010). Κατά τη διάρκεια της αναγέννησης των βαλβίδων της καρδιάς του zebrafish τα επίπεδα της πρωτεΐνης NR4A3 ανιχνεύτηκαν ότι είναι μειωμένα. Κατά την αναγέννηση, είναι απαραίτητο να δημιουργηθεί νέος υγιής ιστός χωρίς την παρουσία ίνωσης, γι' αυτό το λόγο πιθανόν να μειώνεται η έκφραση αυτού του γονιδίου.

Όσον αφορά τις δοκιμές που περιλάμβαναν την έγχυση του διαλύματος MO *Hhat1b* συγκέντρωσης $c= 5.8\mu\text{g}/\mu\text{l}$ σε έμβρυα zebrafish καταγράφηκαν άτομα με καμπυλωτές ουρές και κοντό άξονα σώματος, από τα οποία τα περισσότερα δεν είχαν φυσιολογική κυκλοφορία αίματος και έφεραν μεγάλα καρδιακά οιδήματα. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι το γονίδιο αυτό διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς του zebrafish και στη φυσιολογική λειτουργία της.

Στον άνθρωπο η ορθόλογη πρωτεΐνη, HHATL, έχει εντοπιστεί ότι εκφράζεται στο μυοκάρδιο της αριστερής κοιλίας και ότι τα αυξημένα επίπεδα αυτής εμποδίζουν τη μυοκαρδιακή νέκρωση (P. Zhang et al. 2018). Κατά την αναγέννηση των βαλβίδων του zebrafish, το γονίδιο *hhatlb* υπερεκφράζεται γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν.

Ο έλεγχος του φαινοτύπου που προκαλείται από την καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *sfrp2* έγινε με το διάλυμα MO συγκέντρωσης $c= 5.9\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Παρατηρήθηκαν τα έμβρυα για 5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Το ποσοστό της θνησιμότητας δεν ήταν μεγάλο τις πρώτες 24 hpf (27.08%). Ο φαινότυπος χαρακτηρίζεται από καρδιακά οιδήματα και ανωμαλίες στο ουραίο πτερόγιο.

Το *sfrp2* κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που συμμετέχει στο Wnt μονοπάτι, η οποία έχει αποδειχθεί ότι επάγει την αγγειογένεση νεοπλασμάτων στον άνθρωπο (Kaur et al. 2016). Στο zebrafish, μελέτες έχουν δείξει ότι ρυθμίζει τη μετατροπή του προκολλαγόνου σε κολλαγόνο (Q. Zhu et al. 2019), εύρημα που πιθανόν σχετίζεται με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του μεταγραφώματος από καρδιακές βαλβίδες που αναγεννιούνται, όπου το γονίδιο αυτό υπερεκφράζεται. Πιο αναλυτικά, η κάθε βαλβίδα αποτελείται από ίνες κολλαγόνου, συνεπώς πιθανόν ύστερα από μία βλάβη κατά την αναγέννηση των βαλβίδων του zebrafish, η πρωτεΐνη SFRP2 να είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική αναδιαμόρφωση της δομής τους. Επίσης, η Wnt σηματοδότηση είναι πολύ σημαντική για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επομένως, η έκφραση του *sfrp2* εκτιμάται ότι είναι εξίσου κρίσιμη.

Οι δοκιμές που περιλάμβαναν τις ενέσεις σε αυγά με διάλυμα MO *Zgc:92518* ($c= 6,239\mu\text{g}/\mu\text{l}$) είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση χαρακτηριστικού φαινοτύπου. Στα έμβρυα παρατηρήθηκαν μεγάλα οιδήματα στην καρδιά και το πάνω μέρος του κεφαλιού και μικρές καμπυλωτές ουρές, ενώ σε ποσοστό περίπου 20% ο φαινότυπος συνοδευόταν και από απουσία φυσιολογικής ροής αίματος. Επιπλέον, στα περισσότερα δεν είχαν σχηματιστεί σωστά τα αγγεία κατά μήκος του άξονα του σώματος.

Το γονίδιο *zgc:92518* δεν έχει χαρακτηριστεί πλήρως, καθώς ελάχιστες πληροφορίες είναι γνωστές γι' αυτό. Από αυτό παράγεται μία μεθυλοτρανσφεράση, η οποία δρα σε συνθήκες στρες και γι' αυτό το λόγο πιθανόν να εκφράζεται με αυξημένους ρυθμούς κατά την αναγέννηση των βαλβίδων του ψαριού ζέβρα.

Παρατηρώντας τα έμβρυα που καταστείλαμε την έκφραση του γίνεται αντιληπτό ότι έχει ρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη της καρδιάς, του κεφαλιού αλλά και των αγγείων στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού αυτού.

Εν κατακλείδι, καταστέλλοντας τη μετάφραση των γονιδίων που αναφερθήκαν παραπάνω, παρατηρούμε ότι τα έμβρυα zebrafish εμφανίζουν σοβαρές διαταραχές στην ανάπτυξη της καρδιάς και των αγγείων τους αλλά και προβλήματα στη κυκλοφορία του αίματος. Συνεπώς, τα γονίδια αυτά σχετίζονται με την ανάπτυξη και διαμόρφωση του καρδιαγγειακού συστήματος των ψαριών αυτών. Κρίνεται αναγκαίο η δημιουργία μεταλλαγμένων σειρών zebrafish, οι οποίες θα φέρουν αλλαγές σε τμήματα των συγκεκριμένων γονιδίων προκειμένου να μελετηθεί και να συγκριθεί ο φαινότυπος τους με αυτά που ενέθηκαν με τα διαλύματα MO. Επίσης, θα μπορούσαμε να εφαρμόσουμε το σύστημα Cre/loxP σε συνδυασμό με θερμικό σοκ (Heat shock) υπερεκφράζοντας τα γονίδια αυτά ή δημιουργώντας επαγόμενες μεταλλαγμένες σειρές. Με αυτόν τον τρόπο, θα γίνει καλύτερη κατανόηση του ρόλου του κάθε γονιδίου αλλά και τα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία συμμετέχουν. Τα γονίδια *snail1a*, *nr4a3*, *hhat1b*, *sfrp2* και *zgc:92518*, φαίνεται να έχουν καθοριστικό ρόλο στην αναγέννηση των βαλβίδων της καρδιάς του zebrafish. Η διαλεύκανση του μηχανισμού αυτού θα βοηθήσει στη δυνατότητα επαγωγής του ενδογενούς δυναμικού αναγέννησης της καρδιάς των θηλαστικών όταν υποστεί μία βλάβη.

Για την αντιμετώπιση των καρδιοπαθειών που οφείλονται σε δυσλειτουργίες των καρδιακών βαλβίδων έχουν προταθεί κάποιες στρατηγικές που στηρίζονται στη μηχανική των ιστών των βαλβίδων της καρδιάς (HVTE). Η τεχνολογία της HVTE χρησιμοποιεί μία μήτρα ικρίωμα δημιουργώντας μία λειτουργική βαλβίδα από ζωντανούς πληθυσμούς κυττάρων. Ένας λειτουργικός ιστός απαιτεί τη σωστή μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση αυτών των πληθυσμών. Μελέτες έχουν δείξει ότι ακινητοποιώντας ή εκθέτοντας διάφορους χημειοτακτικούς και αυξητικούς παράγοντες στο περιβάλλον του ιστού αυτό γίνεται εφικτό. Η μεθοδολογία αυτή παραμένει αμφιλεγόμενη καθώς τα ικρίωματα δεν μπορούν να αποκειστούν με μεγάλη αποτελεσματικότητα και έχουν παρατηρηθεί παρενέργειες σε κλινικές μελέτες (Namirgi et al. 2017). Η ανίχνευση των σηματοδοτικών μονοπατιών που εμπλέκονται στη διαδικασία αναγέννησης των καρδιακών βαλβίδων πιθανόν να αποτελούσε εφόδιο για το σωστό σχηματισμό των βαλβίδων της τεχνολογίας HVTE.

ΣΤ.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avdesh, Avdesh et al. 2012. "Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (Danio Rerio) Laboratory: An Introduction." *Journal of Visualized Experiments*.
- Bakkers, Jeroen. 2011. "Zebrafish as a Model to Study Cardiac Development and Human Cardiac Disease." *Cardiovascular Research*.
- Beis, D. 2005. "Genetic and Cellular Analyses of Zebrafish Atrioventricular Cushion and Valve Development." *Development*.
- Beis, Dimitris, and Didier Y R Stainier. 2006. "In Vivo Cell Biology: Following the Zebrafish Trend." *Trends in Cell Biology*.
- Bootorabi, Fatemeh et al. 2017. "Zebrafish as a Model Organism for the Development of Drugs for Skin Cancer." *International Journal of Molecular Sciences*.
- Bournele, Despina, and Dimitris Beis. 2016. "Zebrafish Models of Cardiovascular Disease." *Heart Failure Reviews*.
- Brady, Colleen A., Andrew J. Rennekamp, and Randall T. Peterson. 2016. "Chemical Screening in Zebrafish." In *Methods in Molecular Biology*,.
- Brown, Daniel, Leigh Samsa, Li Qian, and Jiandong Liu. 2016. "Advances in the Study of Heart Development and Disease Using Zebrafish." *Journal of Cardiovascular Development and Disease*.
- Brown, Louise A. et al. 1999. "Molecular Characterization of a Zebrafish TCF ETS-Domain Transcription Factor." *Oncogene*.
- Chang, Jinghua T. et al. 1999. "Cloning and Characterization of a Secreted Frizzled-Related Protein That Is Expressed by the Retinal Pigment Epithelium." *Human Molecular Genetics*.
- Chen, Yi Yen et al. 2012. "Heterogeneity across the Dorso-Ventral Axis in Zebrafish EVL Is Regulated by a Novel Module Consisting of Sox, Snail1a and Max Genes." *Mechanisms of Development*.
- Choi, Jayoung et al. 2007. "FoxH1 Negatively Modulates Flk1 Gene Expression and Vascular Formation in Zebrafish." *Developmental Biology*.
- Cloutier, Philippe et al. 2013. "A Newly Uncovered Group of Distantly Related Lysine Methyltransferases Preferentially Interact with Molecular Chaperones to Regulate Their Activity." *PLoS Genetics*.
- Cong, Le et al. 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science*.
- Cribbs, Adam P., and Sumeth M.W. Perera. 2017. "Science and Bioethics of CRISPR-CAS9 Gene Editing: An Analysis towards Separating Facts and Fiction." *Yale Journal of Biology and Medicine*.

- Diotel, Nicolas et al. 2015. “Comprehensive Expression Map of Transcription Regulators in the Adult Zebrafish Telencephalon Reveals Distinct Neurogenic Niches.” *Journal of Comparative Neurology*.
- Dong, H. et al. 2014. “Snail1 Correlates with Patient Outcomes in E-Cadherin-Preserved Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma.” *Clinical and Translational Oncology*.
- Doudna, Jennifer A., and Emmanuelle Charpentier. 2014. “The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9.” *Science*.
- Faillaci, Francesca et al. 2018. “Obese Zebrafish: A Small Fish for a Major Human Health Condition.” *Animal Models and Experimental Medicine*.
- Feng, Xiao Jun et al. 2015. “The Orphan Receptor NOR1 Participates in Isoprenaline-Induced Cardiac Hypertrophy by Regulating PARP-1.” *British Journal of Pharmacology*.
- Gaudet, Pascale, Michael S. Livstone, Suzanna E. Lewis, and Paul D. Thomas. 2011. “Phylogenetic-Based Propagation of Functional Annotations within the Gene Ontology Consortium.” *Briefings in Bioinformatics*.
- Gerlach, Gabriele, and Nadine Lysiak. 2006. “Kin Recognition and Inbreeding Avoidance in Zebrafish, *Danio Rerio*, Is Based on Phenotype Matching.” *Animal Behaviour*.
- Giardoglou, Panagiota, and Dimitris Beis. 2019. “On Zebrafish Disease Models and Matters of the Heart.” *Biomedicines*.
- Gjini, E. et al. 2011. “Zebrafish Tie-2 Shares a Redundant Role with Tie-1 in Heart Development and Regulates Vessel Integrity.” *Disease Models & Mechanisms*.
- González-Rosa, Juan Manuel, Caroline E. Burns, and C. Geoffrey Burns. 2017. “Zebrafish Heart Regeneration: 15 Years of Discoveries.” *Regeneration*.
- Gurumurthy, Channabasavaiah B. et al. 2016. “CRISPR: A Versatile Tool for Both Forward and Reverse Genetics Research.” *Human Genetics*.
- Gut, Philipp, Sven Reischauer, Didier Y. R. Stainier, and Rima Arnaout. 2017. “Little Fish, Big Data: Zebrafish as a Model for Cardiovascular and Metabolic Disease.” *Physiological Reviews*.
- Hu, Norman, H. Joseph Yost, and Edward B. Clark. 2001. “Cardiac Morphology and Blood Pressure in the Adult Zebrafish.” *Anatomical Record*.
- Kaur, Amanpreet et al. 2016. “SFRP2 in the Aged Microenvironment Drives Melanoma Metastasis and Therapy Resistance.” *Nature*.
- Kimmel, Charles B. et al. 1995. “Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.” *Developmental Dynamics*.
- Kobayashi, Koichi et al. 2009. “Secreted Frizzled-Related Protein 2 Is a Procollagen C Proteinase Enhancer with a Role in Fibrosis Associated with Myocardial Infarction.” *Nature Cell Biology*.

- Lawrence, Christian, John P. Ebersole, and Richard V. Kesseli. 2008. "Rapid Growth and Out-Crossing Promote Female Development in Zebrafish (*Danio Rerio*)."
Environmental Biology of Fishes.
- Lin, T. et al. 2010. "Requirement of the Histone Demethylase LSD1 in Snail1-Mediated Transcriptional Repression during Epithelial-Mesenchymal Transition." *Oncogene*.
- Lin, Yiwei et al. 2010. "The SNAG Domain of Snail1 Functions as a Molecular Hook for Recruiting Lysine-Specific Demethylase 1." *EMBO Journal*.
- Liu, Jiandong, and Didier Y R Stainier. 2012. "Zebrafish in the Study of Early Cardiac Development." *Circulation Research*.
- Liu, Qinglan et al. 2013. "6-Mercaptopurine Augments Glucose Transport Activity in Skeletal Muscle Cells in Part via a Mechanism Dependent upon Orphan Nuclear Receptor NR4A3." *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*.
- Liu, Xiaolin et al. 2009. "NF- κ B and Snail Coordinate the Cell Cycle with Gastrulation." *Journal of Cell Biology*.
- MacRae, Calum A., and Randall T. Peterson. 2015. "Zebrafish as Tools for Drug Discovery." *Nature Reviews Drug Discovery*.
- Malecki, Jędrzej et al. 2017. "The Novel Lysine Specific Methyltransferase METTL21B Affects MRNA Translation through Inducible and Dynamic Methylation of Lys-165 in Human Eukaryotic Elongation Factor 1 Alpha (EEF1A)." *Nucleic Acids Research*.
- Memi, Fani, Aglaia Ntokou, and Irinna Papangeli. 2018. "CRISPR/Cas9 Gene-Editing: Research Technologies, Clinical Applications and Ethical Considerations." *Seminars in Perinatology*.
- Milla, Luis A. et al. 2012. "Yeast-Based Assay Identifies Novel Shh/Gli Target Genes in Vertebrate Development." *BMC Genomics*.
- Namiri, Mehrnaz et al. 2017. "Engineering Natural Heart Valves: Possibilities and Challenges." *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
- Nasiadka, Andrzej, and Matthew D. Clark. 2012. "Zebrafish Breeding in the Laboratory Environment." *ILAR Journal*.
- Nomiyama, Takashi et al. 2006. "The NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Is Induced by Platelet-Derived Growth Factor and Mediates Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation." *Journal of Biological Chemistry*.
- Parvin Nejad, Shouka et al. 2016. "Biomechanical Conditioning of Tissue Engineered Heart Valves: Too Much of a Good Thing?" *Advanced drug delivery reviews*.
- Ponnio, T., and O. M. Conneely. 2004. "Nor-1 Regulates Hippocampal Axon Guidance, Pyramidal Cell Survival, and Seizure Susceptibility." *Molecular and Cellular Biology*.

- Poon, Kar Lai, and Thomas Brand. 2013. "The Zebrafish Model System in Cardiovascular Research: A Tiny Fish with Mighty Prospects." *Global Cardiology Science and Practice*.
- Poss, Kenneth D. 2007. "Getting to the Heart of Regeneration in Zebrafish." *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Poss, Kenneth D., Lindsay G. Wilson, and Mark T. Keating. 2002. "Heart Regeneration in Zebrafish." *Science*.
- Prince, Lynne R. et al. 2017. "NR4A Orphan Nuclear Receptor Family Members, NR4A2 and NR4A3, Regulate Neutrophil Number and Survival." *Blood*.
- Schnabel, Kristin, Chi Chung Wu, Thomas Kurth, and Gilbert Weidinger. 2011. "Regeneration of Cryoinjury Induced Necrotic Heart Lesions in Zebrafish Is Associated with Epicardial Activation and Cardiomyocyte Proliferation." *PLoS ONE*.
- Spence, R. et al. 2006. "The Distribution and Habitat Preferences of the Zebrafish in Bangladesh." *Journal of Fish Biology*.
- Spence, Rowena, Gabriele Gerlach, Christian Lawrence, and Carl Smith. 2008. "The Behaviour and Ecology of the Zebrafish, *Danio Rerio*." *Biological Reviews*.
- Spitsbergen, Jan M., and Michael L. Kent. 2004. "The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research—Advantages and Current Limitations." *Toxicologic Pathology*.
- Stainier, Didier Y. R. et al. 2017. "Guidelines for Morpholino Use in Zebrafish." *PLOS Genetics*.
- Tendeng, Christian, and Corinne Houart. 2006. "Cloning and Embryonic Expression of Five Distinct Sfrp Genes in the Zebrafish *Danio Rerio*." *Gene Expression Patterns*.
- Tessem, J. S. et al. 2014. "Nkx6.1 Regulates Islet β -Cell Proliferation via Nr4a1 and Nr4a3 Nuclear Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Usprech, Jenna, Wen Li Kelly Chen, and Craig A. Simmons. 2016. "Heart Valve Regeneration: The Need for Systems Approaches." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*.
- Volakakis, N. et al. 2010. "NR4A Orphan Nuclear Receptors as Mediators of CREB-Dependent Neuroprotection." *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Wiley, D. S., S. E. Redfield, and L. I. Zon. 2017. "Chemical Screening in Zebrafish for Novel Biological and Therapeutic Discovery." *Methods in Cell Biology*.
- Yacoub, Magdi, Thomas Brand, and Jan Schlueter. 2012. "Think Small: The Zebrafish as a Novel Disease Model in QCRC." *Qatar Foundation Annual Research Forum Proceedings*.
- Zhang, Peng et al. 2018. "Quantitative Proteomic Analysis to Identify Differentially Expressed Proteins in Myocardium of Epilepsy Using ITRAQ Coupled with Nano-LC-MS/MS." *Journal of Proteome Research*.

- Zhang, Ruilin et al. 2013. "In Vivo Cardiac Reprogramming Contributes to Zebrafish Heart Regeneration." *Nature*.
- Zhao, Yue et al. 2010. "Deficiency of the NR4A Orphan Nuclear Receptor NOR1 Decreases Monocyte Adhesion and Atherosclerosis." *Circulation Research*.
- Zhu, Amadeus S., and K. Jane Grande-Allen. 2018. "Heart Valve Tissue Engineering for Valve Replacement and Disease Modeling." *Current Opinion in Biomedical Engineering*.
- Zhu, Qin et al. 2019. "Synergistic Effect of PCPE1 and SFRP2 on the Processing of Procollagens via BMP1." *FEBS Letters*.