



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«Μελέτη μηχανισμών καρδιοπαθειών χρησιμοποιώντας το
Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΑΡΑΝΤΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΑΘΗΝΑ 2020

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**«Μελέτη μηχανισμών καρδιοπαθειών χρησιμοποιώντας το
Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ ΣΑΡΑΝΤΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΑΘΗΝΑ 2020

**«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του
ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202)»**

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.»

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευθυμιάπουλος Σπυρίδων, Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μπέης Δημήτριος, Ερευνητής Β΄

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Γαϊτανάκη Αικατερίνη, Καθηγήτρια

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευθυμιάπουλος Σπυρίδων, Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μπέης Δημήτριος, Ερευνητής Β΄

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

Ντέντος Σκαρλάτος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Παπαζαφείρη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σίδερης Διαμάντης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Εθνικό & Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Μαυροειδής Μανώλης, Ερευνητής Γ΄

Ίδρυμα Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν στην εποχή μας μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο. Επίσης, πολύ σημαντική είναι η συμβολή της αγγειογένεσης στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η συμβολή της βασικής έρευνας ώστε να μελετηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί των παθήσεων αυτών αλλά και να ανακαλυφθούν νέα φάρμακα που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Τα τελευταία χρόνια σημαντικό ρόλο παίζει προς αυτές τις κατευθύνσεις το ζωϊκό πρότυπο μοντέλο zebrafish.

Το zebrafish (*Danio rerio*) χρησιμοποιείται ευρέως ως ζωϊκό μοντέλο για την κατανόηση της παθοφυσιολογίας των καρδιαγγειακών παθήσεων. Στην παρούσα διατριβή παρουσιάζεται ο καρδιακός φαινότυπος υποτροφικού κόλπου, *myh6^{-/-}*, σε ενήλικα ψάρια, τα οποία φέρουν μετάλλαξη στη βαριά αλυσίδα κολπικής μυοσίνης του zebrafish. Οι ομόζυγοι φορείς επιβιώνουν μέχρι την ενηλικίωση και είναι γόνιμοι. Στα ενήλικα μεταλλαγμένα ψάρια, ο κόλπος παραμένει υποπλαστικός-και εμφανίζει εναπόθεση ελαστίνης, ενώ οι κοιλίες παρουσιάζουν αυξημένο μέγεθος. Στα θηλαστικά, η υπερτροφία είναι ο συνηθέστερος μηχανισμός που οδηγεί σε καρδιομεγαλία. Χρησιμοποιώντας την ανοσοϊστοχημεία και συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης για να μετρήσουμε το μέγεθος, την πυκνότητα και τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων, αποδεικνύεται ότι η μεγέθυνση της κοιλίας *myh6^{-/-}* οφείλεται κατά κύριο λόγο στην υπερπλασία. Εντούτοις, εντοπίσαμε παρόμοια μεταγραφικά προφίλ στην απόκριση υπερτροφίας θηλαστικών μέσω RT-PCR των υπερπλαστικών κοιλιών. Περαιτέρω, δείχνουμε την ενεργοποίηση της οδού του στρες-ΕΔ με ανάλυση ανοσοαποτυπώματος κατά Western. Συμπερασματικά, μπορούμε να υποθέσουμε, με βάση το μοντέλο μας, ότι μονοπάτια μοριακής σηματοδότησης που συνδέονται με την υπερτροφία στα θηλαστικά, σε συνδυασμό με την ενεργοποίηση του στρες-ΕΔ, καταλήγουν σε υπερπλασία στο zebrafish. Επιπλέον, αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρθηκε η εναπόθεση ελαστίνης στον κόλπο.

Παράλληλα, μελετήθηκαν μικρά μόρια που αναστέλλουν την αγγειογένεση και είναι ελπιδοφόρα υποψήφια φάρμακα για τον καρκίνο, τις αμφιβληστροειδοπάθειες και τον εκφυλισμό της ωχράς κηλίδας που σχετίζεται με την ηλικία. Η *in vivo* φαινοτυπική διαλογή σε zebrafish (*Danio rerio*) αναδεικνύεται ως μια ισχυρή μεθοδολογία για την ταυτοποίηση και βελτιστοποίηση νέων ενώσεων με φαρμακολογική δράση. Το zebrafish παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα για τις *in vivo* φαινοτυπικές παρατηρήσεις ειδικά για την αγγειογένεση, καθώς αναπτύσσεται ταχέως και δεν βασίζεται σε λειτουργικό καρδιαγγειακό σύστημα για να επιβιώσει για

αρκετές ημέρες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Σε αυτή τη μελέτη, χρησιμοποιούμε μια διαγονιδιακή σειρά που επιτρέπει τη μη επεμβατική παρακολούθηση της αγγειογένεσης σε κυτταρικό επίπεδο. Η αναστολή της αγγειογένεσης μπορεί να παρατηρηθεί κάτω από ένα στερεοσκόπιο φθορισμού και να ποσοτικοποιηθεί. Εκμεταλλευόμενοι τις δυνατότητες του zebrafish, χρησιμοποιήσαμε μια σειρά από 60 καινοτόμες ενώσεις που σχεδιάστηκαν με βάση την αναστολή του υποδοχέα VEGFR2. Στα πειράματα αυτά μπορεί να υπολογιστεί η συγκέντρωση στην οποία προκαλείται τοξικότητα και να καταδειχθούν πιθανές παρενέργειες των υπό εξέταση ουσιών. Με αυτόν τον τρόπο αποκαλύφθηκαν 6 αντιστρεπτοί αναστολείς της αγγειογένεσης.

Τέλος, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής επιχειρήθηκε να ανιχνευθούν γονίδια τα οποία παίζουν ρόλο στη μορφογένεση των καρδιακών βαλβίδων και να αποδειχθεί η σχέση τους μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR-Cas και να δημιουργηθεί μια διαγονιδιακή σειρά zebrafish που να αποκρίνεται στις αλλαγές της διαμητρικής τάσης.

Συμπερασματικά, από την παρούσα διατριβή προκύπτει η μεγάλη δυνατότητα του zebrafish για ανασύσταση/αναδιαμόρφωση της καρδιάς του σε παθολογικές καταστάσεις και αποδεικνύεται η ικανότητά του να χρησιμοποιείται ως ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των καρδιαγγειακών παθήσεων.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are nowadays one of the leading causes of death in the developed world. Also very important is the contribution of angiogenesis to the development of cancerous tumors. It is therefore necessary to contribute to the basic research in order to better study the mechanisms of these diseases but also to discover new drugs related to angiogenesis. In recent years, the zebrafish animal model has played an important role in these conditions.

Zebrafish (*Danio rerio*) is widely used as an animal model to understand the pathophysiology of cardiovascular diseases. Here, we present the adult cardiac phenotype of weak atrium, *myh6^{-/-}*, which carry mutations in the zebrafish atrial myosin heavy chain. Homozygous mutants survive to adulthood and are fertile despite their initial weak atrial beat. In adult mutants, the atrium remains hypoplastic and shows elastin deposition while mutant ventricles exhibit increased size. In mammals, hypertrophy is the most common mechanism resulting in cardiomegaly. Using immunohistochemistry and confocal microscopy to measure cardiomyocyte cell size, density and proliferation, we show that the enlargement of the *myh6^{-/-}* ventricle is predominantly due to hyperplasia. However, we identified similar transcriptional profiles to the mammalian hypertrophy response via RT-PCR of the hyperplastic ventricles. Furthermore, we show activation of the ER-stress pathway by western blot analysis. In conclusion, we can assume, based on our model, that molecular signaling pathways associated with hypertrophy in mammals, in combination with ER-stress activation, result in hyperplasia in zebrafish. In addition, to our knowledge, this is the first time to report elastin deposition in the atrium.

In parallel, we studied small molecules that inhibit angiogenesis and are attractive drug candidates for cancer, retinopathies, and age-related macular degeneration. *In vivo* phenotypic screening in zebrafish (*Danio rerio*) emerges as a powerful methodology to identify and optimize novel compounds with pharmacological activity. Zebrafish provides several advantages for *in vivo* phenotypic screens especially for angiogenesis, since it develops rapidly, externally, and does not rely on a functional cardiovascular system to survive for several days during development. In this study, we utilize a transgenic line that allows the noninvasive monitoring of angiogenesis at a cellular level. The inhibition of angiogenesis can be observed under a fluorescent stereoscope and quantified. To exemplify the versatility and robustness of the zebrafish screen, we have employed a series of 60 novel compounds that were designed based on a potent VEGFR2

inhibitor. Herein, we report their structure-based design, synthesis, and *in vivo* zebrafish screening for optimal activity, toxicity, and off-target effects, which revealed six reversible inhibitors of angiogenesis.

Finally, in the present doctoral dissertation, genes were attempted to play a role in the morphogenesis of the heart valves and to demonstrate their relationship through targeted mutagenesis with the help of the CRISPR-Cas system and to create a transgenic zebrafish to respond to shear stress.

In conclusion, the present thesis shows the great potential of zebrafish for the reconstruction / remodeling of the heart in pathological conditions and proves its ability to be used as an ideal model for the study of cardiovascular diseases.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας, του κέντρου Κλινικής, Πειραματικής, Χειρουργικής και Μεταφραστικής Έρευνας του Ιδρύματος Ιατροβιολογικών Ερευνών της Ακαδημίας Αθηνών, στο εργαστήριο του **Δρ. Μπέη**.

Για την εκπόνηση της παρούσης διδακτορικής διατριβής θα ήθελα να ευχαριστήσω πολλούς που συνέβαλαν στη δημιουργία της. Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως, την επιβλέπουσα Καθγήτρια Γαϊτανάκη Αικατερίνη για την καίρια συμβολή της στα πειράματα, για τη συνδρομή της στον έλεγχο της προόδου μου και των εκθέσεών μου και την εν γένει καθοδήγησή της με σκοπό την επιστημονική αρτιότητα.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο του εργαστηρίου **Ερευνητή Β' Δρ. Μπέη** που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, μου παρείχε όποια υλικοτεχνική υποδομή χρειάστηκε για την ολοκλήρωσή της και με βοήθησε πολύ στο να εμβαθύνω στις γνώσεις αλλά και στη λογική που διέπει ένα σύγχρονο Εργαστήριο Βιολογικής έρευνας. Επιπροσθέτως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον **Καθηγητή Ευθυμιόπουλο Σπυρίδωνα** για την συμβολή του στην διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Επιπλέον, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον **μεταδιδάκτορα Μαλισσόβα Νίκο** ο οποίος αφιέρωσε μεγάλο ποσοστό του χρόνου του και της ενέργειάς του για να μου μεταφέρει ό,τι χρειάζεται, ώστε να μπορώ να σταθώ σε ένα εργαστήριο αλλά και να μπορώ να χειρίζομαι τον πρότυπο οργανισμό Zebrafish. Ακόμη, οφείλω πολλά στην **μεταδιδάκτορα Αγάλου Αδαμαντία** για τις σημαντικές επισημάνσεις της, τις γνώσεις και την εμπειρία της, την αμέριστη στήριξή της και την βοήθειά της σε ό,τι και αν χρειάστηκα.

Θέλω να κάνω ειδική μνεία στους συμφοιτητές μου **Αναγιάννη Σοφία** και **Κέφαλο Τάκη**, με τους οποίους ξεκινήσαμε μαζί αυτή την πορεία. Ακόμη, θέλω να ευχαριστήσω την **Κατσούδα Αντωνία**, **Μπουρνελέ Δέσποινα**, **Roedel Claudia**, **Κατράκη Ματίνα**, **Γιαρδόγλου Τότα** και τα δεκάδες άλλα παιδιά που πέρασαν από το εργαστήριο, όλα αυτά τα χρόνια για τη συνεργασία τους και τις στιγμές που ζήσαμε όλοι μαζί, στις επιτυχίες και στις αποτυχίες.

Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να ευχαριστήσω πολλά στελέχη της Ακαδημίας που συνέβαλλαν στην πραγματοποίηση της παρούσης διατριβής. Μεταξύ αυτών ο

υπεύθυνος του τμήματος Imaging **κ. Παγκάκη** και τη συνεργάτη του **κ. Ριγανά** και ο υπεύθυνος του τμήματος Ιστολογίας **κ. Ψαρρά**.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω όλη την οικογένειά μου για την αμέριστη στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια...

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<i>Σύντμηση</i>	<i>Αγγλικός όρος</i>	<i>Ελληνικός όρος</i>
ADP	Adenosine diphosphate	Διφωσφορική αδενοσίνη
ALPM	anterior lateral plate mesoderm	Προσθιο-πλευρική μεσοδερμική πλάκα
amhc	atrial myosin heavy chain	Βαριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου
Ang	Angiotensin	Αγγειοποιητίνη
ATF6	Activating Transcription Factor-6	Διεγερτικός παράγοντας μεταγραφής-6
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BiP	Binding immunoglobulin protein	Δεσμευτική πρωτεΐνη ανοσοσφαιρίνης
bmp4	Bone morphogenetic protein 4	Μορφογενετική πρωτεΐνη οστού 4
BP	Base Pair	Ζεύγη βάσεων
BSA	Bovine serum albumin	Αλβουμίνη ορού βοδιού
BA	Bulbous Arteriosus	Αρτηριακός βολβός
Cas9	CRISPR associated protein 9	CRISPR συσχετιζόμενη με την πρωτεΐνη 9
CMs	Cardiomyocytes	Καρδιομυοκύτταρα
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	Συστοιχίες τακτικά διατεταγμένων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών
dH₂O	Distilled water	Απεσταγμένο νερό
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	Διμεθυλοσουλφοξείδιο
DNA	deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dpf	days post fertilization	Μέρες μετά την γονιμοποίηση
ECM	Extracellular matrix	Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινο τετραοξικό οξύ

eIF2α	eukaryotic translation initiation factor-2	Ευκαρυωτικός παράγοντας-2 έναρξης της μετάφρασης
ER-stress	endoplasmic reticulum-stress	Στρες του ενδοπλασματικού δικτύου
EW	Egg Water	Νερό για Αυγά Zebrafish
EMT	<i>epithelial-mesenchymal transition</i>	Επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	Πράσινη φθορίζουσα ουσία
Grp94	94 kDa glucose-regulated protein	94 kDa πρωτεΐνη που ρυθμίζεται από γλυκόζη
HPF	Hours Post Fertilization	Ώρες μετά τη γονιμοποίηση
IC	inner curvature	Εσωτερική καμπυλότητα
IRE1	Inositol-Requiring-Protein 1	Πρωτεΐνη που απαιτεί Ινοσιτόλη-1
ISH	in situ hybridization	Υβριδισμός in situ
ISV	intersegmental vessel	Διατμηματικό αγγείο
kdrI	Vascular endothelial growth factor receptor kdr-like	Αυξητικός παράγοντας του ενδοθηλίου των αγγείων τύπου kdr
LC₅₀	Lethal concentration in 50% of animals	Συγκέντρωση που προκαλεί το θάνατο στο 50% των ζώων
Mef-2c	Myocyte-specific enhancer factor 2C	Μυοκυτταρικός ενισχυτής-2C
MHC	Myosin heavy chain	Βαριά αλυσίδα της μυοσίνης
MLC	Myosin light chain	Ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης
MPa	Megapascal	Μεγαπασκαλ (μονάδα πίεσης)
MYBPC3	Myosin-binding protein C3	Πρωτεΐνη C3 που δεσμεύεται στη μυοσίνη
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells	Πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τ-κυττάρων
OC	outer curvature	Εξωτερική καμπυλότητα
OCT	Optimal Cutting Temperature	Ιδανική Θερμοκρασία Κοπής
PBS	Phosphate-buffered saline	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PFA	paraformaldehyde	Παραφορμαλδεΰδη
REF	retrograde flow fraction	ανάδρομο κλάσμα ροής
RIPA buffer	Radio Immuno Precipitation Assay buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού ραδιενεργού ιζήματος
RNA	Ribonucleic acid	Ριβονουκλεϊκό οξύ
RNA-seq	Ribonucleic acid Sequencing	Ανάλυση αλληλουχίας του RNA
RT	Room Temperature	Θερμοκρασία δωματίου
SRF	Serum response factor	Παράγοντας απόκρισης ορού
SSRE	Shear Stress Response Elements	Στοιχεία απόκρισης διατμητικής τάσης
TEF1	Transcription enhancer factor-1	Παράγοντας ενίσχυσης της μεταγραφής
tnnt2	Cardiac troponin T	Καρδιακή τροπονίνη T
TR	thyroid receptor	Θυρεοειδικός υποδοχέας
UPR	Unfolded Protein Response	Απόκριση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών
VEGF	vascular endothelial growth factor	Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας
vmhc	ventricular myosin heavy chain	Βαριά αλυσίδα της μυοσίνης της κοιλίας
WGA	Wheat Germ Agglutinin	Συγκολλητίνη φύτρου σιταριού
YSL	yolk syncytial layer	Συγκυτιακό στρώμα λεκίθου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	14
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
1.1 ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ (Danio rerio)	18
1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	18
1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	19
1.1.3 ΦΥΛΕΤΙΚΟΣ ΔΙΜΟΡΦΙΣΜΟΣ	20
1.1.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	21
1.2.ΤΟ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ ΣΑΝ ΠΡΟΤΥΠΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	21
1.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ	22
1.2.3 ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ ΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ (CHEMICAL GENETIC SCREEN).....	23
1.3 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΖΕΒΡΑΦΙΣΗ	25
1.4 ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΤΕΛΕΟΣΤΕΩΝ ΙΧΘΥΩΝ.....	28
1.5 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	30
1.5.1 ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΡΔΙΑΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ	30
1.5.2 ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΒΑΛΒΙΔΩΝ	34
1.5.3 ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΡΟΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΣ	36
1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	37
1.7 ΒΑΡΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ - ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ ΣΥΣΤΟΛΗΣ.....	39
1.8 ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ.....	40
1.9 ΕΛΑΣΤΙΝΗ	41
1.9.1 Ελαστικές ίνες.....	42
1.10 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ.....	44
1.10.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΔ	46
1.10.2 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΔ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΣΥΝΟΔΟΥΣ	47
1.11 Σύστημα στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης CRISPR-Cas9	48
(Συστοιχίες τακτικά διατεταγμένων βραχειών παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών/CRISPR συσχετιζόμενη πρωτεΐνη-9).....	48
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	51
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53

3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΣΤΑ ΕΝΥΔΡΕΙΑ ΤΟΥ ΙΙΒΕΑΑ.....	54
3.2 ΔΙΑΤΡΟΦΗ.....	56
3.2.1 ΠΡΩΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΜΕ <i>Artemia salina</i>	56
3.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ	57
3.4 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ & ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	59
3.5 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ZEBRAFISH ΑΠΟ ΕΛΕΓΧΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΓΕΝΕΣΗ	60
3.6 ΕΚΤΟΜΗ ΚΑΡΔΙΑΣ ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΟ ΚΑΙ ΝΕΑΡΟ ZEBRAFISH.....	61
3.7 ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ.....	62
3.8 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ.....	65
3.9 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN.....	66
3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΟ ZEBRAFISH.....	71
3.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΥΡΕΣ ZEBRAFISH	71
3.12 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ ΚΑΙ IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	72
3.13 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	74
3.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΑΡΔΙΑ ZEBRAFISH ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ RT-PCR	78
3.14.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ	78
3.14.2 ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (REVERSE TRANSCRIPTION)	79
3.14.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL TIME PCR)	80
3.15 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ.....	81
3.16 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ	83
3.17 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ <i>E. coli</i>	84
3.18 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	85
3.19 ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ.....	85
3.20 ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΓΕΝΕΣΗΣ CRISPR-CAS9	87
3.21 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΕΜΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΗΝ SSRE ΔΟΜΗ	90
3.22 ΧΗΜΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ – ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	93
3.23 ΦΑΙΝΥΛΕΦΡΙΝΗ.....	102
3.24 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ (ΚΣ)	103
3.25 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΡΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ ΜΗΚΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ.....	103
3.26 ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	104

3.27 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	104
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	105
4Α Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ $myh6^{-/-}$ ΣΤΑ ΕΝΗΛΙΚΑ ZEBRAFISH	106
4.1Α ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ	106
4.2Α ΥΠΟΠΛΑΣΤΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗ ΚΟΙΛΙΑ ΣΤΑ $MYH6^{-/-}$ ZEBRAFISH	110
4.3Α Η ΚΟΙΛΙΑ ΤΩΝ $myh6^{-/-}$ ΨΑΡΙΩΝ ΔΙΕΥΡΥΝΕΤΑΙ ΛΟΓΩ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑΣ	113
4.4Α ΑΥΞΗΣΗ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑΣ ΣΤΙΣ ΚΟΙΛΙΕΣ ΤΩΝ $MYH6^{-/-}$ ΗΛΙΚΙΑΣ 6 ΕΒΔΟΜΑΔΩΝ	117
4.5Α ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ	118
4Β ΧΗΜΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΟΡΙΩΝ – ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ VEGFR2.....	120
4.1Β Έλεγχος ομολογίας του VEGFR2 μεταξύ ZEBRAFISH, ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΠΟΝΤΙΚΟΥ	120
4.2Β Έλεγχος της τοξικότητας για τα 60 μόρια – υποψηφίους αναστολείς της ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ VEGFR2.....	121
4.3Β ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 6 ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	124
4.4Β Έλεγχος βιοενεργότητας και της αντιστρεπτής δράσης των 6 νέων μορίων – αναστολέων της ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ	128
4Γ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΜΗΤΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ.....	130
4.1Γ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ	131
4.2Γ In situ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ.....	134
4.3Γ CRISPR fkbp5.....	136
4.4Γ ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ	136
4.5Γ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΖΩΟΥ ΠΟΥ ΝΑ ΑΠΟΚΡΙΝΕΤΑΙ in vivo ΣΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΜΗΤΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ.....	137
4.6Γ ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ SSRE ΜΕ TOL2 ΑΚΡΑ	142
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	145
5Α ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	146
5Β ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	151
5Γ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	156
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	160
7.ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	174
8.ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	178

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ZEBRAFISH (Danio rerio)



Εικόνα1: Το zebrafish, *Danio rerio* (Πηγή : <https://www.worldlifeexpectancy.com/fish-life-expectancy-zebra-danio-or-zebrafish>)

1.1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

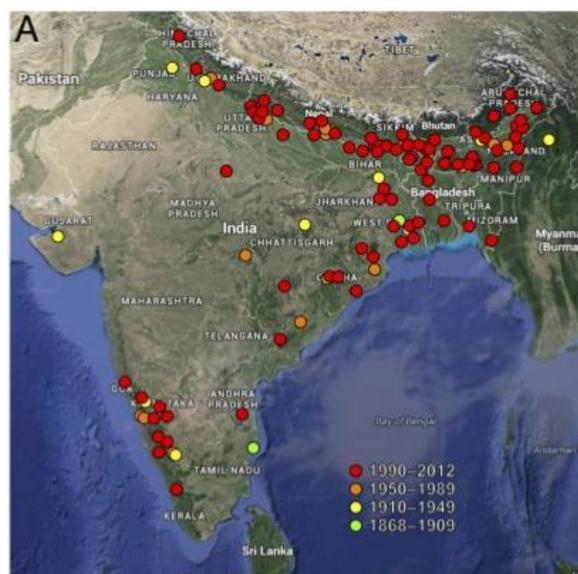
Το **Zebrafish**, είναι ένα τροπικό ψάρι το οποίο ζει στο γλυκό νερό (λίμνες, ποτάμια) και ανήκει στην οικογένεια των **Κυπρινοειδών** και το είδος ***Danio rerio*** (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Ταξινόμηση του zebrafish

Βασίλειο:	Ζώα
Συνομοταξία:	Χορδωτά
Ομοταξία:	Ακτινοπτερύγια
Τάξη:	Κυπρινόμορφα
Οικογένεια:	Κυπρινοειδή
Γένος:	<i>Danio</i>
Είδος:	<i>D. rerio</i>

Το Zebrafish έχει και τις εξής ονομασίες: *Brachydanio rerio*, Leopard Danio, Striped danio, Zebra, Zebra danio. Αρχικά, το zebrafish αναφερόταν στην επιστημονική βιβλιογραφία ως *Brachydanio rerio*. Το όνομα *Danio* προέρχεται από την ιδιωματική γλώσσα των κατοίκων της Ινδίας και της Σρι Λάνκα.

Η προέλευσή του είναι από τον ποταμό Γάγγη και έχει ως ενδιαίτημα τα ποτάμια, τα ρυάκια, τα κανάλια, τις τάφρους, τα λιμνάζοντα ύδατα, τα νερά με μικρή ροή ή καθόλου ροή περιλαμβανομένων και των ορυζώνων. Το Zebrafish είναι ενδημικό είδος στην περιοχή γύρω από τα Ιμαλάια, σε χώρες όπως είναι η Ινδία, το Μπουτάν, το Μπαγκλαντές, η Μιανμάρ, το Νεπάλ, το Πακιστάν. Εισαχθέντες πληθυσμοί του είδους εντοπίζονται στα ηπειρωτικά ύδατα των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (Καλιφόρνια, Κονέκτικατ, Φλόριντα και Νέο Μεξικό) και στον Καναδά. Οι πληθυσμοί αυτοί βρέθηκαν στις συγκεκριμένες περιοχές κατά πάσα πιθανότητα λόγω ηθελημένης απελευθέρωσης στο περιβάλλον ή διαφυγής από ιχθυοκαλλιέργειες (Εικ. 2) (www.fishbase.org). Το Zebrafish είναι παμφάγο ζώο. Τρέφεται κυρίως με ζωοπλαγκτό, έντομα, προνύμφες εντόμων και φυτοπλαγκτό (Spencer et al., 2008).



Εικόνα 2: Ενδημική εξάπλωση *Πηγή : Parichy, 2015*

Το Zebrafish διαθέτει 25 ζεύγη χρωμοσωμάτων, 1,412 δις βάσεων, 36,7% περιεκτικότητα σε GC, 28.770 γονίδια και 27.404 πρωτεΐνες (Howe et al, 2013). Έχει φυλογενετική σχέση με το είδος *Danio kyathit* και με το γένος *Devario*.

1.1.2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Το Zebrafish, έχει ατρακτοειδή, πλευρικά πιεσμένο κορμό και το στόμα του έχει φορά προς τα πάνω με την κάτω γνάθο να προεξέχει σε σχέση με την άνω γνάθο. Η κοινή του ονομασία Zebrafish ή αλλιώς ψάρι-ζέβρα, οφείλεται στο γεγονός

ότι εμφανίζει ένα μοτίβο εναλλαγής πέντε σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων λωρίδων που εκτείνονται μέχρι το τέλος του ουραίου πτερυγίου, το οποίο θυμίζει τις ρίγες του θηλαστικού Ζέβρα (Εικ. 1). Το εδρικό πτερύγιο έχει επίσης χαρακτηριστικές ρίγες και διακλαδισμένες ακτίνες. Το μοτίβο οφείλεται σε τρεις τύπους κυττάρων: τα μελανοφόρα (σκούρα μπλε), τα ξανθοφόρα (χρυσά) και τα ιριδοφόρα (ιριδίζοντα) κύτταρα (Parichy, 2006). Το Zebrafish μπορεί να μεγαλώσει μέχρι και τα 6,4 εκ., ενώ αυτά που βρίσκονται σε ενυδρεία σπάνια μεγαλώνουν πάνω από τα 4 εκ. Συνήθως έχουν διάρκεια ζωής 2-3 χρόνια αλλά σε ιδανικές συνθήκες μπορούν να ζήσουν μέχρι και 5 χρόνια. Τα ψάρια που ζουν σε μη φυσικό περιβάλλον αναπτύσσουν συχνά κύρτωση στη σπονδυλική τους στήλη μετά το δεύτερο έτος της ζωής τους. Ο φαινότυπος αυτός προκαλείται από εκφυλισμό των μυών και συνήθως συνδέεται με τη γήρανση (Spence R et al., 2008).

1.1.3 ΦΥΛΕΤΙΚΟΣ ΔΙΜΟΡΦΙΣΜΟΣ

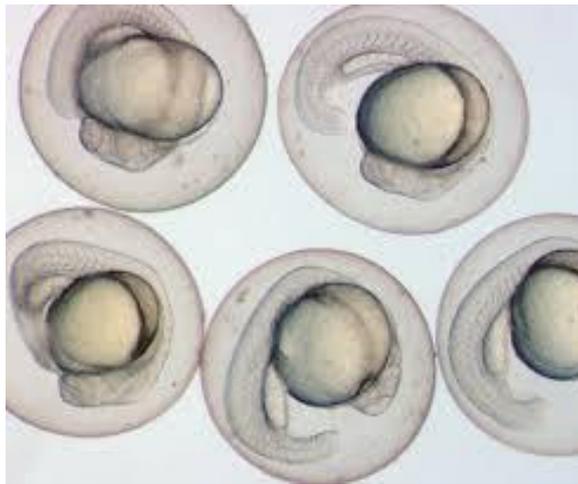
Η πιο σαφής διαφορά είναι η μεγαλύτερη κοιλιά που έχουν τα θηλυκά ειδικά όταν φέρουν ωάρια. Επίσης, το αρσενικό είναι τορπιλόμορφο, με χρυσές ή ροζ ρίγες μεταξύ των μπλε ριγών. Αντίθετα, τα θηλυκά είναι πιο ωοειδή με άσπρη κοιλιά και ασημένιες ρίγες μεταξύ των μπλε ριγών. Επίσης, τα ενήλικα θηλυκά φέρουν μια γενετική θηλή μπροστά από την αρχή του εδρικού πτερυγίου (Εικ. 3).



Εικόνα 3: Πάνω παρατηρούμε ένα αρσενικό Zebrafish και κάτω ένα θηλυκό (Πηγή : <https://www.quora.com/How-do-you-know-the-gender-of-zebrafish>)

1.1.4 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Το zebrafish είναι ωτόκο και η γονιμοποίηση πραγματοποιείται εξωτερικά. Λαμβάνει χώρα από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο όταν βρίσκονται στη φύση και καθόλη τη διάρκεια του έτους σε εργαστηριακές συνθήκες. Η παρουσία του αρσενικού είναι σημαντική για την ωτοκία των θηλυκών. Η ωτοκία πυροδοτείται από την έκθεση του θηλυκού ατόμου σε εκκρινόμενες φερομόνες του αρσενικού (στεροειδές γλυκουρονίδιο) που διαχέονται στο νερό και γίνονται αντιληπτές από το οσφρητικό επιθήλιο των θηλυκών (van der Hurk et al., 1987, von Hofsten and Olssen, 2005). Τα θηλυκά μπορούν να γεννούν, με διαλείμματα 2-3 ημερών, έως και 500 αυγά τα οποία είναι βενθικά, μη κολλώδη (Hill et al., 2005). Τα αυγά ενεργοποιούνται με την επαφή τους με το νερό, ακόμη και εν τη απουσία σπέρματος. (Nagel, 2002) (Μεταπτυχιακή εργασία Σαράντη Π., 2012).



Εικόνα 4: Αυγά Zebrafish 48 hpf. Παρατηρούμε το διαφανές χρώμα τους. (Πηγή : <https://owlcation.com/stem/The-why-and-how-of-breeding-zebrafish-for-research>)

1.2.ΤΟ ZEBRAFISH ΣΑΝ ΠΡΟΤΥΠΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΣΤΗΝ

ΕΡΕΥΝΑ

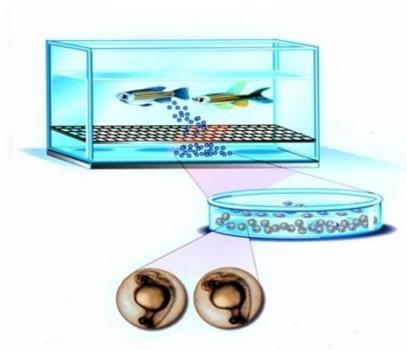
Το Zebrafish, αποτελεί ένα ζωικό μοντέλο που την τελευταία 25ετία χρησιμοποιείται ευρέως στην ερευνητική κοινότητα. Πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον

George Streisinger τη δεκαετία του 1970, όταν θέλησε να χρησιμοποιήσει ένα πιο απλό σπονδυλωτό ζωικό μοντέλο από το ποντίκι και επέλεξε το Zebrafish.

1.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΓΙΑ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗΝ ΕΡΕΥΝΑ

Το Zebrafish, παρέχει πολλά πλεονεκτήματα για την βιο-ιατρική έρευνα σε πολλούς τομείς (μεταξύ άλλων στο κυκλοφορικό σύστημα, αναγεννητική ιατρική, ογκολογία, φαρμακολογία). Πιο αναλυτικά τα πλεονεκτήματά του είναι τα εξής :

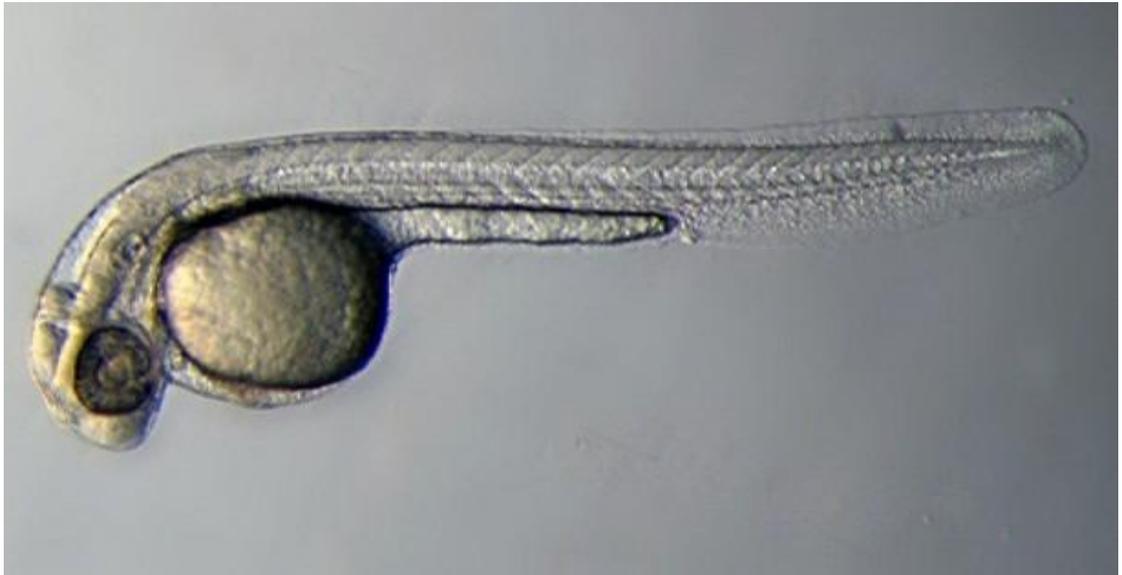
- Ως σπονδυλωτός οργανισμός έχει μεγαλύτερο ποσοστό ομολογίας γονιδιώματος με το ανθρώπινο γονιδίωμα (αγγίζει το 75%) σε σχέση με άλλα γενετικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται ως τώρα (π.χ. *C. Elegans*, *Drosophila*) και η αλληλούχηση του γονιδιώματος του zebrafish έχει ολοκληρωθεί και δημοσιευθεί.
- Οι εγκαταστάσεις του συντηρούνται χωρίς ιδιαίτερο κόστος
- Το κάθε ζευγάρι μπορεί να δώσει έως 400 γονιμοποιημένα αυγά και μάλιστα 2 φορές την εβδομάδα.
- Η γονιμοποίηση των αυγών είναι εξωτερική και συλλέγονται εύκολα (Εικ. 5).



Εικόνα 5: Απεικόνιση της ωοτοκίας του Zebrafish (Πηγή: <http://protocols.davidson.edu/comments.php?DiscussionID=51>)

- Η ανάπτυξη πραγματοποιείται τάχιστα, η καρδιά αρχίζει να χτυπά στις 24 ώρες και σε 3 μήνες είναι ήδη ενήλικο και έτοιμο για αναπαραγωγή.

- Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του είναι διαφανές και συνεπώς μπορούν να πραγματοποιηθούν *in vivo* παρατηρήσεις. (Εικ. 6).



Εικόνα 6: Έμβρυο 72 hpf (hours post fertilization-ώρες μετά τη γονιμοποίηση) (όπου παρατηρείται το διαφανές σώμα του και συνεπώς επιτρέπεται η εύκολη παρατήρησή του.

(Πηγή:https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Zebrafish_Development)

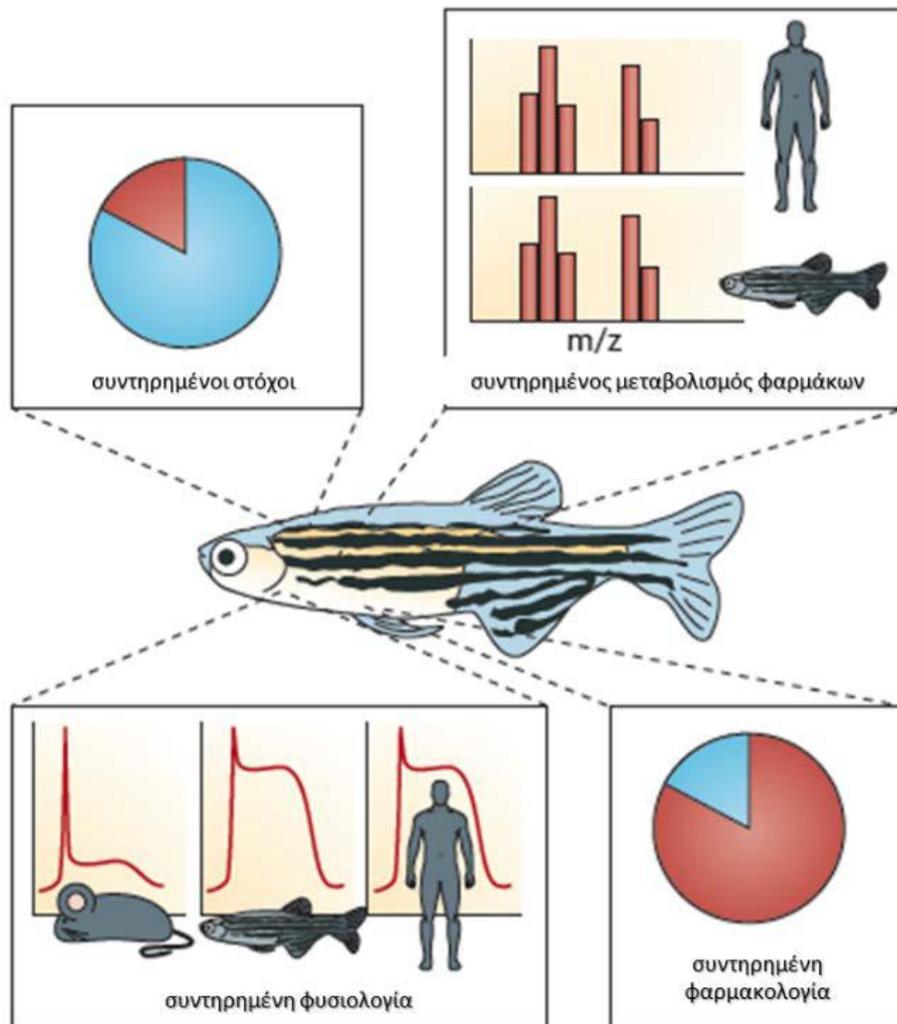
- Μπορούν να δημιουργηθούν διαγονιδιακά zebrafish με καθορισμένη έκφραση γονιδίων.
- Το μέγεθός του (περίπου 3 εκ.), το καθιστά ένα είδος εξαιρετικά εύκολο στη διατήρηση και τους χειρισμούς.
- Τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια πληθώρα γενετικών τεχνικών όπως είναι η ορθόδρομη γενετική ανάλυση (forward genetics), η ανάδρομη γενετική ανάλυση (reverse genetics) και ο χημικός γενετικός έλεγχος (Lawson and Wolfe 2011).

1.2.3 ΧΡΗΣΗ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΓΙΑ ΧΗΜΙΚΟ ΓΕΝΕΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ (CHEMICAL GENETIC SCREEN)

Ο χημικός γενετικός έλεγχος (chemical genetic screen) μπορεί να περιγραφεί ως μία διαδικασία στην οποία μικρά χημικά μόρια ελέγχονται για την ικανότητά τους να αλλάξουν μία βιολογική διαδικασία σε ένα γνωστό βιολογικό σύστημα. Ο χρονικός

έλεγχος μπορεί να επιτευχθεί εύκολα, αφού το μόριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα συγκεκριμένο χρονικό (αναπτυξιακό) σημείο. Από τη στιγμή που το μόριο θα δώσει ένα αποτέλεσμα, στην περίπτωση που αυτό είναι θετικό, μπορεί να δοθεί το έναυσμα για την ανακάλυψη ενός νέου φαρμάκου (Zon and Peterson, 2005; Tsang 2010).

Λόγω των πλεονεκτημάτων του που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη ενότητα, το zebrafish έχει χρησιμοποιηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια στο χημικό γενετικό έλεγχο (Εικ. 7) Οι έλεγχοι στους οποίους χρησιμοποιείται περιλαμβάνουν τη μελέτη τοξικότητας χημικών μορίων (οικοτοξικολογικά τεστ), την ανίχνευση πιθανών αναστολέων μιας γενετικής μεταλλαγής, ή την εύρεση πιθανών αναστολέων ή επαγωγέων βιολογικών διαδικασιών (π.χ. αγγειογένεση), καθώς και των μοριακών μηχανισμών δράσης τους. Πολύ συχνά χρησιμοποιούνται μόρια από χημικές βιβλιοθήκες. Τα μόρια αυτά μπορεί να έχουν προκύψει από σύνθεση φαρμάκων και βρίσκονται αποθηκευμένα ως παραλλαγές μιας δραστηρικής ουσίας. Χρησιμοποιούνται για την πιθανή ανακάλυψη νέων φαρμάκων, ακόμα και σε μηχανισμούς διαφορετικούς από αυτούς για τους οποίους αρχικά συντέθηκαν. Στους ελέγχους αυτούς μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολυάριθμα έμβρυα σε πλάκες μικρών φρεατίων (well plates) και να προστεθούν τα χημικά μόρια υπό δοκιμή σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Paz and Zhu, 2005; Grant et al., 2010). Η προσθήκη των μορίων σε αναπτυξιακά στάδια μικρότερα των 6 hpf μπορεί να αυξήσει τη θνησιμότητα, λόγω της υψηλής ευαισθησίας του εμβρύου. Επίσης, λαμβάνονται υπόψη και άλλες παράμετροι, όπως η συγκέντρωση της ουσίας και η αφαίρεση του χορίου (μηχανικά με λαβίδες ή με την προσθήκη προνάσης) ή μη από το έμβρυο (κάτι που επηρεάζει την απορρόφησή της από αυτό). Ένας τομέας στον οποίο βρίσκει συχνά εφαρμογή η χρήση τέτοιων βιβλιοθηκών για χημικό γενετικό έλεγχο τα τελευταία χρόνια, είναι αυτός της ανίχνευσης μορίων-υποψήφιων αναστολέων της αγγειογένεσης, με απώτερο σκοπό την παραγωγή αντικαρκινικών ουσιών.



Εικόνα 7: Η καταλληλότητα του ζωικού μοντέλου zebrafish για την ανακάλυψη ανθρώπινων φαρμάκων (Ανατύπωση MacRae and Peterson 2015)

1.3 ΑΝΑΠΤΥΞΙΑΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ZEBRAFISH

Η ανάπτυξη του zebrafish περιλαμβάνει τα εξής στάδια: το ζυγωτό (zygote), την περίοδο αυλακώσεων (cleavage), το βλαστίδιο (blastula), το γαστρίδιο (gastrula), την περίοδο δημιουργίας μεταμερών (segmentation), τη φαρυγγική περίοδο (pharyngula), την περίοδο εκκόλαψης (hatching period) και την περίοδο της πρώιμης προνύμφης (early larva) (Kimmel et al., 1995; Slack, 2012). Πρέπει να τονιστεί ότι ο ρυθμός ανάπτυξης του Zebrafish εξαρτάται από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Συνεπώς, σε υψηλότερες θερμοκρασίες αναπτύσσεται γρηγορότερα και σε χαμηλότερες πιο αργά. Η θερμοκρασία αναφοράς είναι οι 28,5 °C.

Το ζυγωτό κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης έχει διάμετρο περίπου 0,7 mm. Η πρώτη αυλάκωση (cleavage) πραγματοποιείται 40 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση. Η γονιμοποίηση επάγει τη διόγκωση και την έξοδο του χορίου από το ζυγωτό και ενεργοποιεί κυτταροπλασματικές διαδικασίες, οι οποίες είναι εμφανείς μετά από περίπου 10 λεπτά. Μετά την πρώτη διαίρεση, τα βλαστομερίδια διαιρούνται ανά 15 λεπτά περίπου (Kimmel *et al.*, 1995) και μία ώρα μετά τη γονιμοποίηση το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων. Οι συνεχιζόμενες διαίρεσεις μεταμορφώνουν το ζυγωτό σε μία συμπαγή μάζα κυττάρων που ονομάζεται μορίδιο (morula). Ενώ οι διαιρέσεις συνεχίζονται και το έμβρυο έχει φτάσει στο στάδιο των 128 κυττάρων, αρχίζουν οι κυτταρικές ανακατατάξεις και το έμβρυο είναι πια στο στάδιο του βλαστιδίου (blastula). Ακολουθεί το στάδιο του βλαστιδίου (2,75 – 5,3 hpf). Στο στάδιο του βλαστιδίου οι συγχρονισμένες διαιρέσεις δίνουν τη θέση τους σε επιμήκεις και ασύμμετρες αυλακώσεις, κατά τη μετάβαση μεσοβλαστιδίου (Midblastula Transition, MBT). Η MBT σηματοδοτεί την έναρξη της μεταγραφής του διπλοειδούς γονιδιώματος και διακρίνει το έμβρυο σε τέσσερις περιοχές: την καλυπτήρια στιβάδα, τα κύτταρα βάθους, τη λεκιθική συγκυτιακή στιβάδα (Yolk Syncytial Layer, YSL) και τη λεκιθική μάζα.

Έπειτα, το έμβρυο εισέρχεται στο στάδιο της γαστριδίωσης (gastrula), πέντε ώρες μετά την έναρξη της γονιμοποίησης και σχηματίζεται ο εμβρυϊκός δίσκος, ο οποίος τελικά θα δώσει τη ραχιαία πλευρά του εμβρύου. Τα κύτταρα επίσης ξεκινούν να συγκλίνουν ραχιαία και στις 6 hpf δημιουργούν τη λεγόμενη ασπίδα. Η γαστριδίωση συνεχίζεται μέχρι το σημείο που η λέκιθος εγκολπώνεται ολόκληρη και το σημείο που η νωτοχορδή ξεκινά να σχηματίζεται. Η γαστριδίωση ολοκληρώνεται μετά από 12 ώρες από τη στιγμή της γονιμοποίησης και έχει ως αποτέλεσμα την αναδιοργάνωση του εμβρύου και το σχηματισμό των τριών βλαστικών στιβάδων (εξώδερμα, μεσόδερμα, ενδόδερμα) των πρωτογενών ιστών του εμβρύου. Στο τέλος της γαστριδίωσης η εξωτερική επιφάνεια του εμβρύου θα αποτελείται αποκλειστικά από εξώδερμα (100% επιβολή). Από το εξώδερμα θα προκύψουν στη συνέχεια οι ιστοί της επιδερμίδας και του κεντρικού νευρικού συστήματος. Όταν ολοκληρώνεται το στάδιο της γαστριδίωσης η ραχιαία επιβλάστη πυκνώνει στο πρόσθιο και το κεντρικό μέρος της και σχηματίζεται η νευρική πλάκα.

Το επόμενο στάδιο είναι ο σχηματισμός των σωματιών. Περίπου 16 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, στο στάδιο των 14 σωματιών, γίνεται η αποκόλληση της ουράς, ενώ μετά την πάροδο 19 ωρών παρατηρούνται και οι πρώτες μυϊκές κινήσεις του εμβρύου. Στην επόμενη φάση, αυτή της φαρυγγικής περιόδου (24 – 48 hpf), ξεκινά η

κυκλοφορία του αίματος και αρχίζει η ανάπτυξη των πτερυγίων και του χρωματισμού του δέρματος.

Κατά την περίοδο της εκκόλαψης (48 hpf–72 hpf) ολοκληρώνεται η πρώιμη οργανογένεση και ξεκινά η ανάπτυξη του χόνδρου στην κεφαλή και των πλευρικών πτερυγίων, ενώ είναι και το χρονικό σημείο που το έμβρυο εξέρχεται από το χόριο. Έπειτα, η νηκτική κύστη διογκώνεται και η προνύμφη αρχίζει να κολυμπά ενεργητικά και να τρέφεται εξωγενώς (περίπου 5 μέρες μετά την γονιμοποίηση).

Μέσα σε 120 ώρες μετά τη γονιμοποίηση τα έμβρυα αναπτύσσουν τα κυριότερα όργανα και ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, της καρδιάς, του ήπατος, του παγκρέατος, του νεφρού, του εντέρου και των αισθητηρίων οργάνων. Το Zebrafish φτάνει στην ενηλικίωση περίπου στους 3 μήνες (Εικ. 8) (Kimmel et al., 1995).

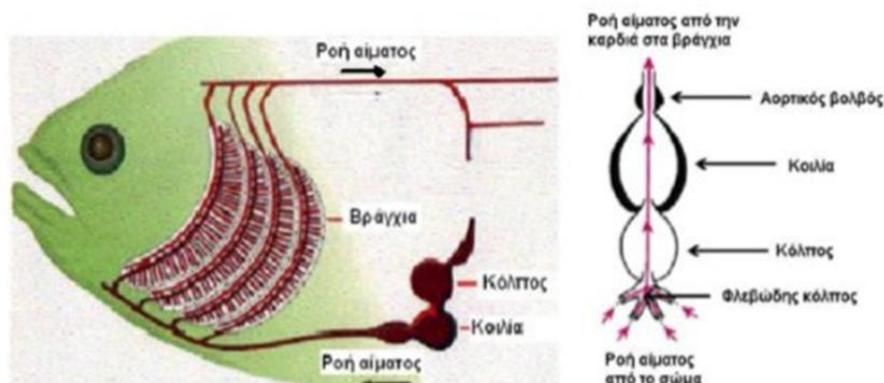


Εικόνα 8 : Τα αναπτυξιακά στάδια του Zebrafish έως τις 48 hpf (Πηγή: Kimmel et al., 1995)

1.4 ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΩΝ ΤΕΛΕΟΣΤΕΩΝ ΙΧΘΥΩΝ

Η σύσπαση της καρδιάς στο zebrafish, ξεκινά στις 22hrpf, αρχικά σαν περισταλτικό κύμα, το οποίο στις 36hrpf μετατρέπεται σε συντονισμένες συσπάσεις του κόλπου και της κοιλίας (Isogai et al., 2001). Η καρδιά των ψαριών είναι μικρότερη σε σύγκριση με των άλλων σπονδυλωτών και, στα περισσότερα είδη, καταλαμβάνει περίπου μόλις το 0,1% του βάρους του σώματός τους. Στο zebrafish, όπως και στα περισσότερα σπονδυλωτά, η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που αναπτύσσεται (Fishman & Chien, 1997). Η καρδιά αναπτύσσεται πολύ γρήγορα και σχηματίζεται πλήρως από τη δεύτερη μέρα μετά τη γονιμοποίηση σε σύγκριση με τα ποντίκια που σχηματίζεται σε 12dpf και στο ανθρώπινο έμβρυο σε 35dpf (Stainier, 2001). Το κυκλοφορικό σύστημα των ψαριών είναι κλειστό και περιλαμβάνει την καρδιά, το αρτηριακό, το φλεβικό και το λεμφικό σύστημα. Δεν υπάρχει πνευμονική κυκλοφορία, ενώ το φλεβικό αίμα εισέρχεται από την καρδιά στα βράγχια για την ανταλλαγή των αερίων και από εκεί το οξυγονωμένο αίμα οδηγείται στο σώμα και όχι πίσω στην καρδιά όπως στα χερσαία σπονδυλωτά (Farrell, 2001b).

Η καρδιά των τελεόστεων είναι δίχωρη, αποτελούμενη από δυο κοιλότητες στη σειρά, τον κόλπο και την κοιλία (Εικ. 14). Στη φλεβική περιοχή, πριν από τον κόλπο, υπάρχει ο φλεβώδης κόλπος (sinus venosus), ο οποίος παρέχει μια σταθερή ροή του αίματος προς την καρδιά. Στην αρτηριακή περιοχή, η κοιλία της καρδιάς ακολουθείται από τον αορτικό βολβό, τα τοιχώματα του οποίου αποτελούνται από λείες μυϊκές ίνες και στερείται βαλβίδων.

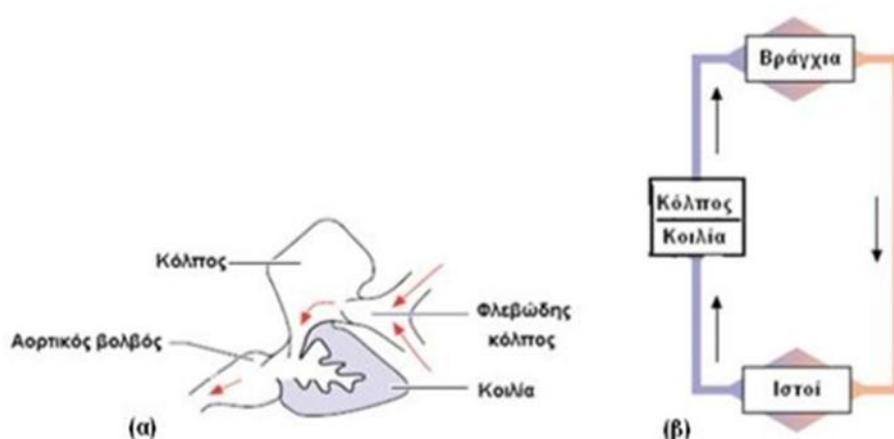


Εικόνα 9: Σχηματικά η κυκλοφορία του αίματος στα τελεόστεα (Farrell, 2001)

Στους τελεόστεους ιχθείς, ο αρτηριακός κώνος (conus arteriosus) αποτελεί τη περιοχή σύνδεσης μεταξύ της κοιλίας και του αορτικού βολβού και έχει περιοριστεί σε ένα δακτύλιο αποτελούμενο από γραμμωτούς μυς και μια μονή σειρά βαλβίδων. Ο αρτηριακός κώνος, επίσης, αποτελεί ένα διακριτό μυώδες τμήμα και διαφέρει τόσο από τον αορτικό βολβό εξαιτίας της μυοκαρδιακής του φύσης, όσο και από το κοιλιακό μυοκάρδιο (Icardo et al., 2003). Ο φλεβώδης κόλπος είναι μια κοιλότητα με λεπτό τοίχωμα που συλλέγει το αίμα των φλεβών και επικοινωνεί με τον κόλπο μέσω ενός ανοίγματος. Στο άνοιγμα αυτό υπάρχουν οι φλεβοκολπικές βαλβίδες (sinoatrial valves), οι οποίες αποτελούνται συνήθως από ενδοκαρδιακό και μυοκαρδιακό ιστό και χρειάζονται για τη ρύθμιση της ροής του αίματος που επεισέρχεται από τον κόλπο (Farrell, 2001b). Στη συνέχεια του φλεβώδους κόλπου βρίσκεται ο κόλπος (atrium). Στα τοιχώματα του κόλπου βρίσκονται τοποθετημένες μυϊκές ίνες με κατεύθυνση προς το κολποκοιλιακό άνοιγμα, έτσι ώστε όταν ο κόλπος συσπάται, το αίμα να έχει κατεύθυνση προς την κοιλία. Τόσο ο φλεβώδης κόλπος όσο και ο κόλπος είναι λεπτότοιχες κοιλότητες σε σχέση με την κοιλία. Το άνοιγμα μεταξύ του κόλπου και της κοιλίας περιβάλλεται από βαλβίδες που εμποδίζουν την αντίστροφη ροή του αίματος (Farrell, 2001b). Η κοιλία (ventricle), αποτελεί συνέχεια του κόλπου και είναι μια μυώδης κοιλότητα, που περιβάλλεται από δυο μυϊκές στιβάδες. Από μια εξωτερική φλοιώδη και πυκνή στιβάδα και μια εσωτερική σπογγώδη. Γενικά, στα ψάρια οι μυϊκές δεσμίδες της εσωτερικής στιβάδας προεξέχουν προς το εσωτερικό της κοιλίας, δημιουργώντας υποκοιλότητες. Οι μυϊκές ίνες της στιβάδας αυτής μπορεί να είναι σε παράλληλη διάταξη ή υπό γωνία ως προς τον άξονα της καρδιάς ή τέλος να διατάσσονται ακτινωτά από την επιφάνεια προς το εσωτερικό τμήμα. Πάνω ακριβώς από την κοιλία εντοπίζονται ο αρτηριακός κώνος και ο αορτικός βολβός (Hoar et al., 1992).

Γενικά, στα ψάρια ο φλεβώδης κόλπος συσπάται, αλλά με μικρό αριθμό μυϊκών ινών και χωρίς βαλβίδες να περιβάλλονται μεταξύ αυτού και των κυριοτέρων φλεβών. Η φλεβική πίεση είναι αυτή που ορίζει την πλήρωση του κόλπου, όπως και στα θηλαστικά (Farrell, 2001b). Το αίμα αρχικά εξωθείται από την καρδιά προς τα βράγχια μέσω της κοιλιακής αορτής (ventral aorta), όπου και λαμβάνει το οξυγόνο (Εικ. 15). Στη συνέχεια, μεταφέρεται προς την κεφαλή, πριν μεταφερθεί στο υπόλοιπο σώμα. Μικρότερα φλεβίδια ενώνονται μεταξύ τους και σχηματίζουν τις κύριες φλέβες, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την επιστροφή του αίματος στην καρδιά μέσω του φλεβώδους κόλπου (Isogai & Weinstein, 2001). Το νερό από το υδάτινο περιβάλλον εισέρχεται από το στόμα του ψαριού και από εκεί μεταφέρεται στα

βράγχια. Στα βράγχια, πραγματοποιείται η ανταλλαγή O_2 και CO_2 και άλλων ενώσεων μεταξύ του νερού και του αίματος, όπου λαμβάνει μέρος επίσης η οξυγόνωση με το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο. Παρά την έλλειψη πνευμονικής κυκλοφορίας και την ύπαρξη δίχωρης καρδιάς στα zebrafish, υπάρχουν σημαντικές ομοιότητες στο καρδιαγγειακό σύστημα των θηλαστικών και του zebrafish, τόσο σε λειτουργικό όσο και σε φυσιολογικό και γενετικό επίπεδο. Το γεγονός αυτό καθιστά το zebrafish ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη της ανάπτυξης της καρδιάς (Dooley & Zon, 2000).



Εικόνα 10: (α) Εγκάρσια τομή και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά της καρδιάς των τελεόστεων ιχθύων, (β) η κυκλοφορία του αίματος (Farrell, 2001b)

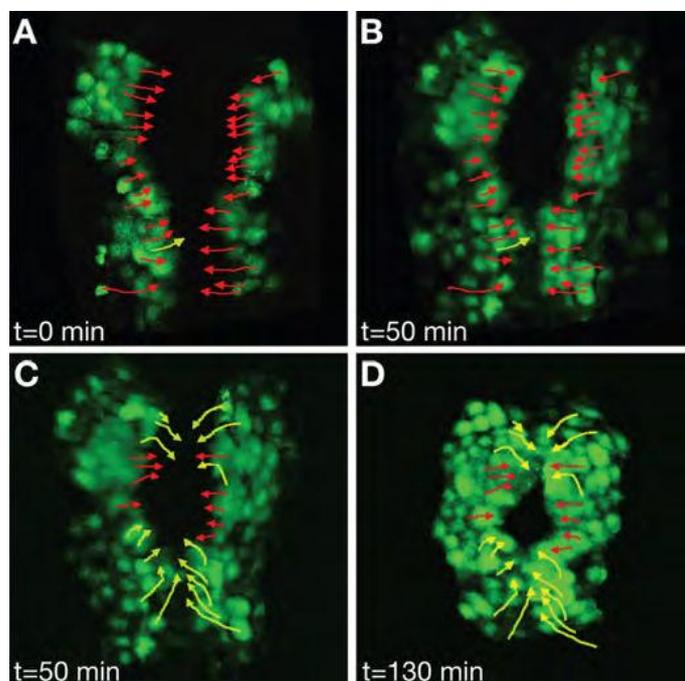
1.5 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

1.5.1 ΑΡΧΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΡΔΙΑΚΟΥ ΣΩΛΗΝΑ

Η ανάπτυξη της καρδιάς στο zebrafish αρχίζει με τη δημιουργία των πρόδρομων καρδιακών κυττάρων στην περιοχή της οριακής ζώνης (marginal zone) πριν από τη φάση της γαστριδίωσης (Stainier et al. 1993). Στις 5 hpf τα προγονικά κύτταρα του μυοκαρδίου και του ενδοκαρδίου τοποθετούνται στο όριο μεταξύ του βλαστοδέρματος και της λεκίθου (Warga, 1996). Κατά τη φάση της γαστριδίωσης, τα πρόδρομα καρδιακά κύτταρα τοποθετούνται ραχιαία κατά μήκος της περιοχής της

μέσης γραμμής (mid-line) ώστε να καταλήξουν στην περιοχή της προσθιοπλευρικής μεσοδερμικής πλάκας (anterior lateral plate mesoderm – ALPM). Έπειτα, τα προγονικά κύτταρα του μυοκαρδίου διαχωρίζονται σε κολπικά και κοιλιακά στο στάδιο των 12 σωματιών (Keegan BR et al., 2004). Σε αντίθεση με τα προγονικά κύτταρα του μυοκαρδίου, αυτά του ενδοκαρδίου διαχωρίζονται σε κολπικά και κοιλιακά, αλλά δεν παρουσιάζουν διαφορετική οργάνωση μεταξύ τους (Keegan BR et al., 2004).

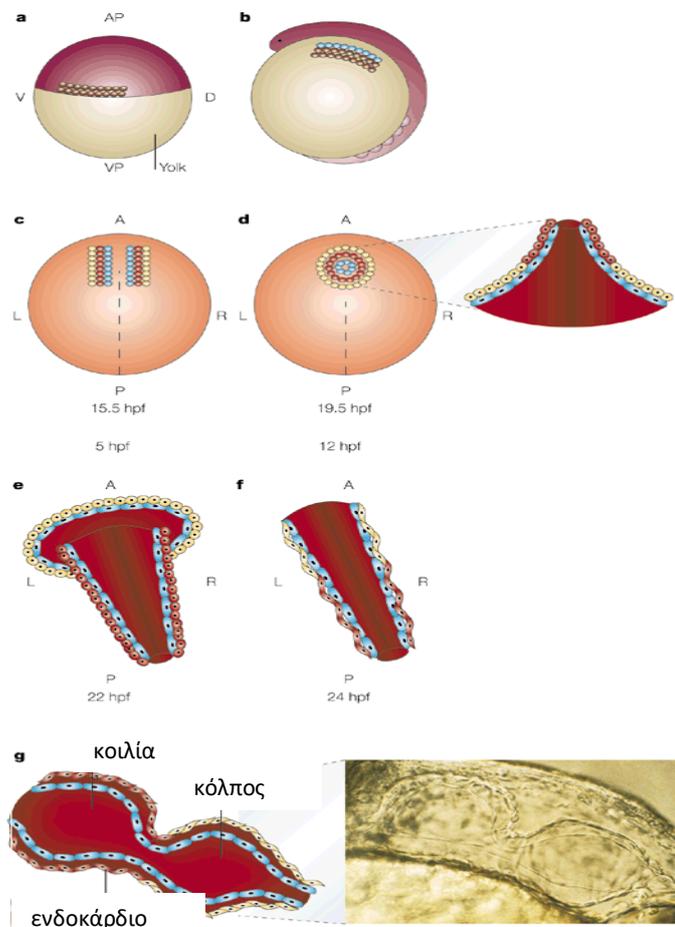
Στη συνέχεια, αυτά τα κύτταρα έρχονται πιο κοντά μεταξύ τους και στο στάδιο των 15 σωματιών (16 hpf) τα κύτταρα αυτά βρίσκονται ενδιάμεσα του συγκυτιακού λεκιθικού στρώματος (yolk syncytial layer-YSL) στην κοιλιακή τους πλευρά και του πρόσθιου ενδοδέρματος στη ραχιαία τους πλευρά και δημιουργούνται 2 αρχέγονοι σωλήνες μυοκαρδίου (Stainier και Fishman, 1992). Τα καρδιομυοκύτταρα ακόμη δεν είναι συσταλάτα, αλλά αρχίζουν να εκφράζουν γονίδια του σαρκομερούς (Yelon et al., 1999). Καθώς οι αμφίπλευροι πληθυσμοί των καρδιομυοκυττάρων πλησιάζουν μεταξύ τους, δημιουργούν ένα δακτύλιο από κύτταρα, που αναφέρεται ως καρδιακός κώνος, μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται καρδιακή σύντηξη. Η καρδιακή σύντηξη πραγματοποιείται από κάτω προς τα πάνω. Στο κέντρο του κώνου υπάρχουν τα πρόγονα κύτταρα του ενδοκαρδίου (Εικ. 9).



Εικόνα 11 : Τα στάδια της καρδιακής σύντηξης. Ξεκινούν με τα κύτταρα που βρίσκονται από κάτω και στο τέλος ενώνονται και αυτά της κορυφής. (Πηγή : Holtzman et al. 2007)

Στις 20 hpf (22 σωμαίτες) ο καρδιακός κώνος είναι μια δομή με αυλό που προβάλλει σε ραχιαία και κοιλιακή θέση (Glickman and Yelon, 2002). Στη συνέχεια, ο κώνος αυξάνει σε μέγεθος, παράγοντας ένα αρχέγονο σωλήνα μυοκαρδίου (Εικ. 10). Το ενδοκάρδιο σχηματίζει την εσωτερική στιβάδα του μυοκαρδιακού σωλήνα.

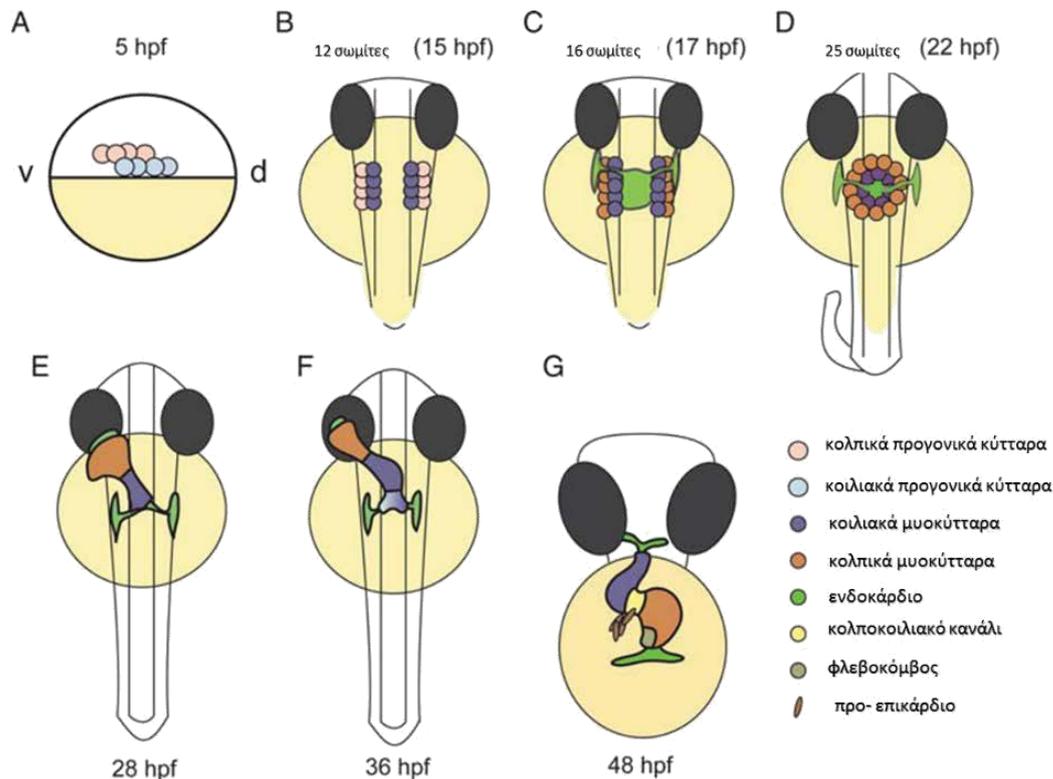
Μεταξύ των 24 hpf και 48 hpf η καρδιά μετατρέπεται σταδιακά από ένα απλό σωλήνα σε ένα όργανο με 2 θαλάμους, έναν κόλπο και μια κοιλία που διαχωρίζονται από το κολποκοιλιακό κανάλι. Ο καρδιακός σωλήνας έχει αρχικά την κοιλιακή του πλευρά δεξιά και την κολπική του αριστερά. Στις 36 ώρες μετά τη γονιμοποίηση ξεκινά η συστροφή (looping) της καρδιάς με τη μετατόπιση της κοιλίας κατά μήκος της μέσης γραμμής, με αποτέλεσμα η κολποκοιλιακή βαλβίδα να γίνεται για πρώτη φορά ορατή. Έχει παρατηρηθεί ότι, όπως και στα ποντίκια, υπάρχει μία αρχική εκτόπιση του καρδιακού σωλήνα που προβλέπει την μετέπειτα κατεύθυνση της συστροφής. Έτσι τη αριστερόστροφη εκτόπιση διαδέχεται η δεξιόστροφη εκτόπιση και αντίστροφα.



Nature Reviews | Genetics

Εικόνα 12: Συνοπτικά τα στάδια της ανάπτυξης της καρδιάς μέχρι το σχηματισμό του καρδιακού σωλήνα. (Πηγή : Didier Y. R. Stainier, 2001)

Παράλληλα, οι θάλαμοι δημιουργούνται μέσω μια διαδικασίας που ονομάζεται μπαλονισμός και κατά την οποία συγκεκριμένα εξογκώματα αλλάζουν τη δομή του καρδιακού σωλήνα (Εικ. 11). Στις 48 hpf οι θάλαμοι διακρίνονται από το σχηματισμό εσωτερικής και εξωτερικής καμπυλότητας (inner – outer curvature) και αποκτούν τη μορφή φασολιού με μια διαδικασία που ονομάζεται διόγκωση θαλάμων (chamber ballooning) (Bakkers 2011).

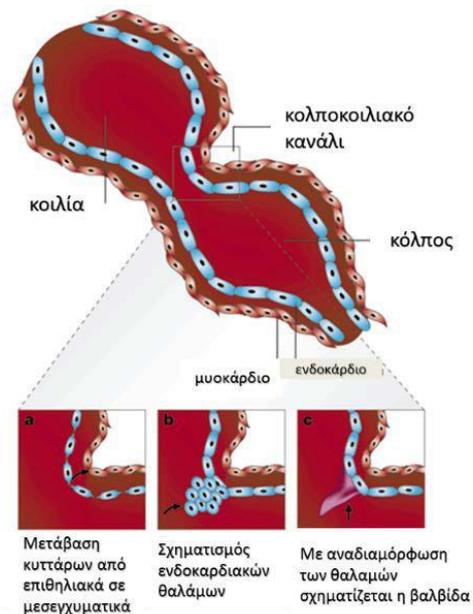


Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση όλων των σταδίων ανάπτυξης της καρδιάς μέχρι και τις 48 hpf (Πηγή : Bakkers 2011)

1.5.2 ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΒΑΛΒΙΔΩΝ

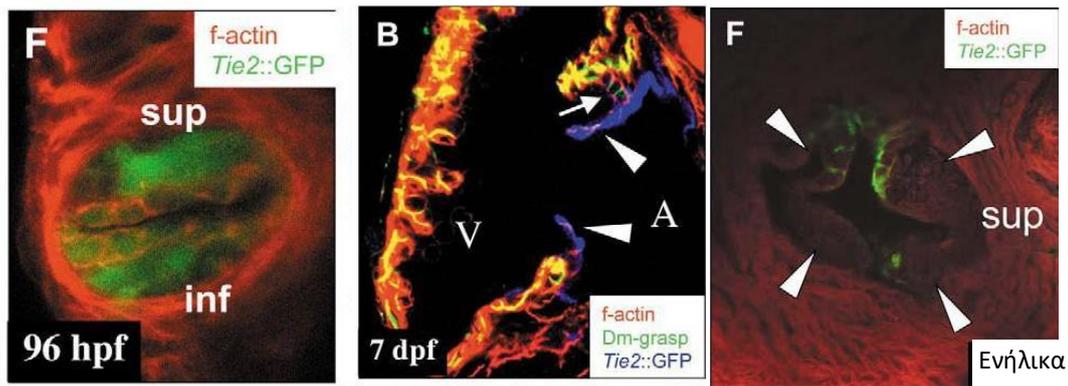
Παράλληλα με τη δημιουργία των θαλάμων, πραγματοποιείται και η μορφογένεση των κολποκοιλιακών βαλβίδων (Beis et al., 2005). Η μορφογένεσή τους ξεκινά με την ανάπτυξη ενός ενδοκαρδιακού επάρματος στην περιοχή του κολποκοιλιακού καναλιού. Τα ενδοκαρδιακά κύτταρα δέχονται σήματα από το κανάλι για να μεταπέσουν από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) και πολλαπλασιάζονται. Η διαφοροποίηση των ενδοκαρδιακών κυττάρων ξεκινά στις 36 hpf, οπότε τα παρακείμενα ενδοκαρδιακά κύτταρα του κολποκοιλιακού καναλιού γίνονται κυβοειδή και ξεκινούν να εκφράζουν το μόριο διακυτταρικής επικοινωνίας Dm-grasp (Beis et al., 2005). Μέχρι τις 55 hpf διατηρούν την επιθηλιακή τους οργάνωση καθώς εκφράζουν β-κατενίνη. Στις 60 ώρες μετά τη γονιμοποίηση τα κολποκοιλιακά ενδοθηλιακά κύτταρα υφίστανται μετάπτωση από επιθήλιο σε μεσέγχυμα (EMT). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι στα μυοκαρδιακά κύτταρα του κολποκοιλιακού ορίου αναστέλλεται η έκφραση του γονιδίου του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (vascular endothelial growth factor-*vegf*) από τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων NFATc 2/3/4 (Changetal, 2004). Στις 72 hpf η πάχυνση της κολποκοιλιακής βαλβίδας ξεκινά να φράζει τον αυλό του

κολποκοιλιακού καναλιού με συνέπεια να μην παρατηρείται πλέον παλινδρόμηση του αίματος. Μέχρι τις 96 ηρf και τα δύο ενδοκαρδιακά επάρματα (άνω και κάτω) έχουν σχηματιστεί (Εικ. 12). (Scherz et al., 2008).



Εικόνα 14: Στάδια ανάπτυξης των καρδιακών επαρμάτων των βαλβίδων (Πηγή : Stainier, 2001)

Έπειτα, σχηματίζονται από τα ενδοκαρδιακά επάρματα, οι 2 κολποκοιλιακές γλωχίνες της καρδιακής βαλβίδας, 7 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι βαλβιδικές γλωχίνες διατηρούν αυτή τη δομή έως τις 28 μέρες μετά τη γονιμοποίηση. Στα ενήλικα ψάρια, οι κολποκοιλιακές βαλβίδες αποτελούνται από τέσσερις γλωχίνες (Εικ. 13)(Beis et al., 2005)



Εικόνα 15: Εξέλιξη της κολποκοιλιακής βαλβίδας από τις 96 hpf έως την ενηλικίωση.
 Πηγή : (Beis et. al., 2005)

1.5.3 ΑΙΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΡΟΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΡΔΙΑΣ

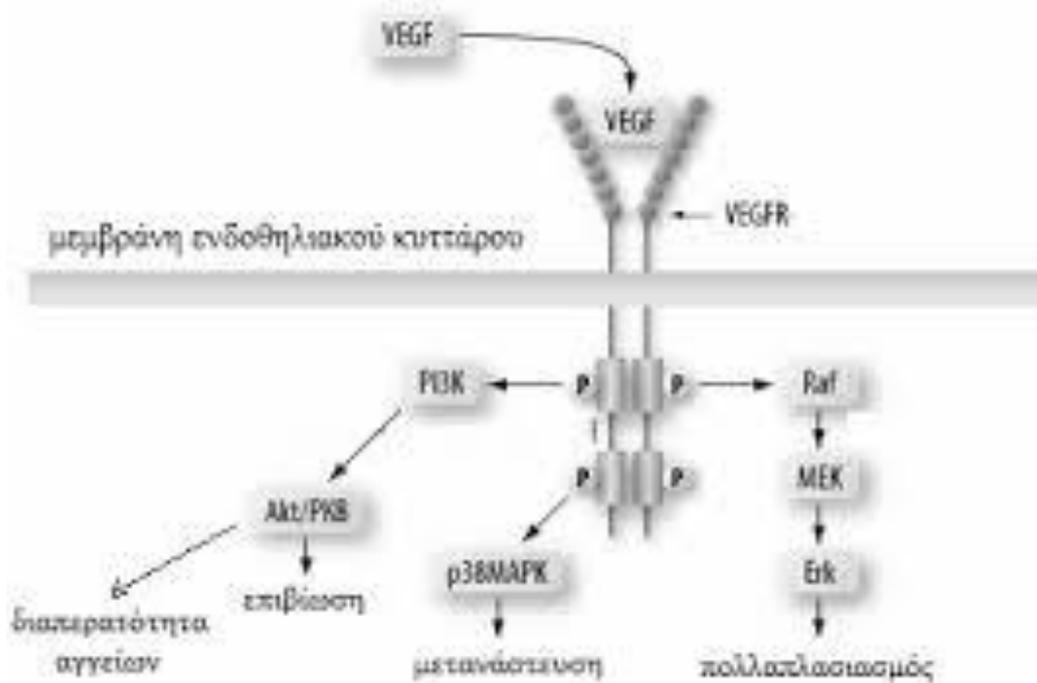
Η μορφογένεση της καρδιάς δεν εξαρτάται μόνο από το γονιδίωμα, αλλά και από τις αιμοδυναμικές ροές. Με τον όρο αιμοδυναμικές ροές εννοούμε α) τη δύναμη που ασκείται φυσιολογικά λόγω πίεσης στο τοίχωμα της καρδιάς και των αγγείων, β) τη φυσιολογική αντίσταση των κυττάρων που απαρτίζουν το τοίχωμα των αγγείων και γ) τη διατμητική τάση (shear stress), δηλαδή μία δύναμη τριβής που εκδηλώνουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων από τη ροή του αίματος. Η διατμητική τάση που προκαλείται από την αιμοδυναμική ροή, επάγει μηχανική επίδραση στο ενδοκάρδιο που μεταδίδει σήματα στο μυοκάρδιο. Καθώς η καρδιά αναπτύσσεται, η αιματική ροή είναι αμφίδρομη, αλλά καθώς δημιουργούνται οι βαλβιδικές γλωχίνες μεταξύ κόλπου και κοιλίας μετατρέπεται σε μονόδρομη (Scherz et al., 2008). Όπως έδειξε ο Vermot et al., 2009 με ανάλυση ποσοτικής απεικόνισης, το κλάσμα ανάδρομης ροής του αίματος (retrograde flow fraction, REF) είναι μεγαλύτερο στην περιοχή του κολποκοιλιακού καναλιού και συντελεί στη δημιουργία των βαλβίδων. Αυτό συμβαίνει διότι περιοχές με μικρότερες διατομές (cross section) εκτίθενται σε υψηλότερες αιμοδυναμικές δυνάμεις εξαιτίας των μεγαλύτερων ταχυτήτων που αναπτύσσονται (Scherz et al., 2008 & Liebling et al., 2006).

1.6 ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η αγγειογένεση (angiogenesis) είναι μια φυσιολογική διαδικασία που περιλαμβάνει την ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα και είναι διακριτή από τη διαδικασία εξ αρχής (*de novo*) σύνθεσης νέων αγγείων (vasculogenesis) από αγγειοβλάστες. Με τον όρο αγγειογένεση ορίζεται ο σχηματισμός δομών από ενδοθηλιακά κύτταρα, οι οποίες είναι σωληνοειδείς και αποτελούνται από λεία μυϊκά κύτταρα και ινοβλάστες

Η αγγειογένεση παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οργανισμών, αλλά και στην επούλωση τραυμάτων. Ωστόσο, εμπλέκεται και σε παθολογικές διαδικασίες, όπως η μετάπτωση όγκων από καλοήθεις σε κακοήθεις.

Όσον αφορά στη μοριακή βάση, οι κύριοι συντελεστές στην αγγειογένεση έχει βρεθεί ότι είναι τα μέλη της οικογένειας των ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (vascular endothelial growth factor – VEGF family), η αγγειοποιητίνη (Ang) και οι εφρίνες. Από αυτούς, οι VEGFs και τα συστήματα υποδοχέων τους εμπλέκονται στη σύνθεση των αγγείων από τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (Shibuya 2006). Ο κύριος παράγοντας είναι ο VEGF-A και προσδένεται στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης VEGFR-1 και VEGFR-2, ενώ σε μικρότερο βαθμό προσδένεται και ο VEGF-E (Εικ. 16) Από τους δύο υποδοχείς, αυτός που συμμετέχει με κυρίαρχο ρόλο στη μεταγωγή σήματος και επακόλουθη προαγωγή της αγγειογένεσης, είναι ο VEGFR-2.



Εικόνα 16: Υποδοχείς VEGF και τα κύρια σηματοδοτικά μονοπάτια για την αγγειογένεση. Διακρίνεται μεταξύ άλλων το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω VEGFR-2, το οποίο είναι το PLCγ-C-κινάση-MAP-κινάση, ενώ εκτός της αγγειογένεσης, από τους συγκεκριμένους υποδοχείς ρυθμίζονται και διεργασίες όπως λεμφαγγειογένεση, ενεργοποίηση μακροφάγων και μετανάστευση κυττάρων – ανατύπωση (Shibuya 2006).

Ο υποδοχέας κινάσης τυροσίνης VEGFR-2 (1356 αμινοξέα στον άνθρωπο, 1302 στο zebrafish) αποτελείται από 4 περιοχές: το εξωκυττάριο τμήμα (το οποίο συνδέεται με τον προσδέτη), το διαμεμβρανικό τμήμα, την περιοχή κινάσης τυροσίνης η οποία φωσφορυλιώνεται και το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο συμμετέχει στη ενδοκυττάρια μεταγωγή σήματος (Millauer et al., 1993). Είναι παρών κυρίως στα ενδοθηλιακά κύτταρα από τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ακόμα ανάπτυξης έως και τα ενήλικα, αλλά και σε πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα, τα οποία είναι πιθανόν να αποτελούν τα πρόδρομα κύτταρα των ενδοθηλιακών κατά την ενήλικη ζωή (Asahara et al., 1999,) ενώ σε χαμηλότερα επίπεδα ανιχνεύεται και σε νευρικά κύτταρα, οστεοβλάστες, κύτταρα παγκρέατος και πρόδρομα κύτταρα του αμφιβληστροειδούς. Ο υποδοχέας VEGFR-2 είναι ο κύριος μεταγωγέας σήματος, τόσο σε φυσιολογικές, όσο και σε παθολογικές καταστάσεις αγγειογένεσης. Σε φυσιολογικές καταστάσεις, είναι υπεύθυνος για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και τη μετάβαση των VEGFR-2 θετικών πρόδρομων ενδοθηλιακών κυττάρων σε

ενδοθηλιακά των αγγείων (Shalaby et al., 1995). Επιπλέον ο VEGFR-2 φαίνεται να έχει αυξημένη έκφραση στο αγγειακό δίκτυο των όγκων σε καρκινικές καταστάσεις. Για τη συνεχή παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, ο όγκος προάγει τη διαδικασία της αγγειογένεσης με κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι αυτό μέσω VEGFR-2, ο οποίος, και με τη συμβολή άλλων παραγόντων όπως οι μεταλλοπρωτεάσες, προάγει εν τέλει και τη μετάσταση. Για τους λόγους αυτούς, ένα μεγάλο μέρος της έρευνας για τη θεραπεία του καρκίνου είναι αφιερωμένο στην ανίχνευση μορίων αναστολέων ή και αντισωμάτων έναντι αυτού του υποδοχέα, με σκοπό την παραγωγή αντικαρκινικών φαρμάκων (Shibuya 2006).

1.7 ΒΑΡΙΑ ΑΛΥΣΙΔΑ ΤΗΣ ΜΥΟΣΙΝΗΣ - ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

ΣΥΣΤΟΛΗΣ

Η Amhc (atrial myosin heavy chain) και η Vmhc (ventricular myosin heavy chain) είναι πρωτεΐνες της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC), η κοιλιακή και η κοιλιακή, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης είναι οι κύριες πρωτεΐνες συστολής της καρδιάς. Η μυοσίνη αποτελείται από δύο πρωτεΐνες βαριάς αλυσίδας (MHC), δύο ελαφριάς αλυσίδας (MLC) και δύο ρυθμιστικές περιοχές ελαφράς αλυσίδας (MLC-2). Οι παραπάνω (Amhc ή MYH6 και Vmhc ή MYH7) αποτελούν τις δύο κύριες ισομορφές της .

Στον άνθρωπο, οι δύο μορφές της μυοσίνης εκφράζονται σε όλο τον καρδιακό σωλήνα στα αρχικά στάδια σχηματισμού της καρδιάς, πριν περιοριστεί τελικά η έκφρασή τους κυρίως στον κόλπο για το γονίδιο *myh6* και στην κοιλία στην περίπτωση του *myh7*. Τα δύο γονίδια βρίσκονται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 14 σε χωριστές περιοχές κατά μήκος του. Αν και τα δύο γονίδια εμφανίζουν εξαιρετικά υψηλή ομολογία έχουν διαφορετικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς μεταγραφής. Σε αρκετά μοντέλα υπερτροφικής μυοκαρδιοπάθειας η ύπαρξη των πρωτεϊνών της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MHC) έχειδειχθεί ότι αλλάζει ανεξάρτητα από τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των MHC, προτείνοντας ένα μετα-μεταγραφικό μηχανισμό που ελέγχει την έκφρασή τους ως απόκριση στην αλλαγή της αιμοδυναμικής ροής. Η μεταγραφή του γονιδίου *myh6* γίνεται μέσω ρυθμιστικών παραγόντων που προσδένονται στην περιοχή του υποκινητή. Παράγοντες, όπως ο Tbx5, δρώντας συνεργιστικά με τον Mef2 στον υποκινητή του *myh6* έχειδειχθεί στο zebrafish ότι ενεργοποιούν τη μεταγραφή του. Επιπλέον ρυθμιστικοί παράγοντες για το μεταγραφικό έλεγχο του *myh6* είναι οι GATA4, TEF1 (Gupta et al., 1997), οι SRF

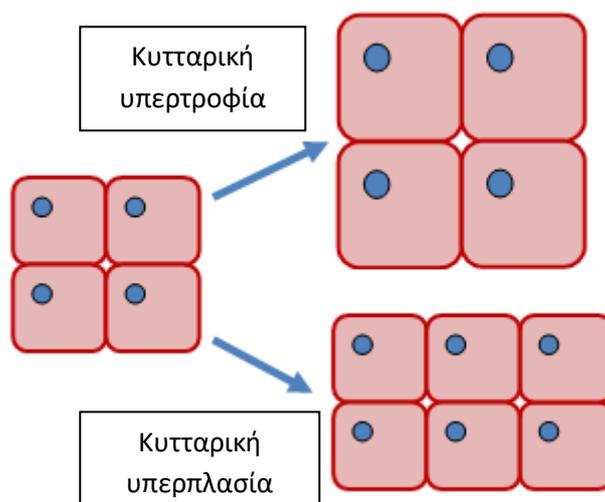
και οι TRs. Αναφέρονται επίσης πρωτεΐνες, οι PUR-πρωτεΐνες, οι οποίες φαίνεται να συμμετέχουν τόσο στη ρύθμιση της μεταγραφής και μετάφρασης της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί το *myh6* όσο και στον περιορισμό της έκφρασής του στα καρδιομυοκύτταρα, εμποδίζοντας την έκφρασή τους σε μη μυϊκά κύτταρα .

Η ομολογία του ανθρώπινου *amhc* (*myh6*) με τη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης στο ποντίκι είναι 98%. Για το ποντίκι, η πρωτεΐνη *myh6* είναι η ισομορφή της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης που εκφράζεται σε ενήλικα στάδια, ενώ η *myh7* εκφράζεται σε όλη την καρδιά κατά την εμβρυϊκή ζωή. Σε υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια στο ποντίκι υπάρχει επανεργοποίηση του εμβρυϊκού προγράμματος έκφρασης γονιδίων, όπως αύξηση της έκφρασης του *myh7*. Στο zebrafish η *amhc* εκφράζεται από το στάδιο των 19 σωματιών στον κόλπο και εμφανίζει 86% ομολογία με τη μυοσίνη βαριάς αλυσίδας στο ποντίκι και 82% με την ανθρώπινη (Molkentin et al., 1994).

1.8 ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑ ΚΑΙ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑ

Ο όρος υπερτροφία υποδηλώνει αύξηση του μεγέθους των επιμέρους μυϊκών κυττάρων χωρίς να αλλάζει ο συνολικός τους αριθμός, ενώ στην υπερπλασία εμφανίζεται πολλαπλασιασμός των μυοκυττάρων (Εικ. 17). Η υπερτροφική καρδιομυοπάθεια είναι μια επικρατούσα αιτία της καρδιακής ανεπάρκειας στους ενήλικες και η κύρια αιτία ξαφνικού καρδιακού θανάτου σε προφανώς υγιή νεαρά άτομα. Έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 14 γονίδια που προκαλούν υπερτροφική καρδιομυοπάθεια, κυρίως το υπεύθυνο γονίδιο για τη βαριά αλυσίδα β-μυοσίνης (*MYH7*) είτε το *MYBPC3*, το οποίο κωδικοποιεί την καρδιακή δεσμευτική πρωτεΐνη της μυοσίνης (Farrell et al., 2017). Άλλα γονίδια είναι τα *TNNT2*, *TNNI3*, *ACTC*, *TPM1*, *MYL3*, *MYL2*, *PRKAG2*, *GLA*, *LAMP2*, *PTPN11*, *RAF1*, *SOS1* (Konno et al., 2010) . Όταν οι ανθρώπινες καρδιές υποβάλλονται σε φυσιολογικό ή παθολογικό στρες, τα μεμονωμένα κοιλιακά καρδιομυοκύτταρα υφίστανται υπερτροφία για να αυξηθούν σε μέγεθος, με αποτέλεσμα μεγαλύτερη καρδιά με πάχυνση αριστερού κοιλιακού τοιχώματος. Η καρδιομεγαλία στα θηλαστικά συνήθως οδηγεί σε ανεπαρκή απόδοση και τελικά καρδιακή ανεπάρκεια. Οι τραυματισμένοι άνθρωποι καρδιακοί ιστοί διεγείρουν τους μοριακούς μηχανισμούς που παράγουν ινώδεις ουλώδεις ιστούς προκαλώντας επικίνδυνες συστολικές δυσλειτουργίες με στρες υπερφόρτωσης που τελικά οδηγούν σε καρδιακό θάνατο. Αν και η αναγέννηση των καρδιομυοκυττάρων συμβαίνει με κάποιο χαμηλό ρυθμό στην ανθρώπινη καρδιά, αυτή η αναγεννητική ικανότητα είναι δυστυχώς αναποτελεσματική και δεν συμβάλλει

στην επαρκή επισκευή του κατεστραμμένου καρδιακού ιστού, ούτε ανταποκρίνεται στις απαιτήσεις της τάσης υπερφόρτωσης με μια αποτελεσματικά αντισταθμισμένη καρδιά (Jean et al., 2012) . Αντίθετα, στο zebrafish υπάρχει μεγαλύτερη αναγεννητική ικανότητα και μετά από κάποιο τραύμα του μυοκαρδίου, αυτό αναγεννάται ιστολογικά και λειτουργικά πλήρως, μετά από 6 εβδομάδες περίπου (Poss, 2007).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση κυτταρικής υπερτροφίας και υπερπλασίας (Πηγή : <https://physiologicalresponsestotraining.weebly.com/muscle-hypertrophy.html>)

1.9 ΕΛΑΣΤΙΝΗ

Ο συνδετικός ιστός είναι ένα από τέσσερα βασικά είδη ζωικών ιστών και αποτελείται από φαινομενικά διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Το κύριο χαρακτηριστικό είναι ότι διαθέτουν άφθονο μεσοκυττάριο στρώμα, κάτι που δεν ισχύει σε όλους τους άλλους ιστούς και τα κύτταρα είναι διάσπαρτα μέσα του. Από λειτουργική άποψη ο ρόλος του συνδετικού ιστού είναι η στήριξη άλλων ιστών και η συμβολή του στην άμυνα του οργανισμού, στη μεταφορά και αποθήκευση ουσιών, αποκατάσταση βλαβών κλπ.

Ο συνδετικός ιστός εμφανίζει σημαντική δομική ετερογένεια, καθώς η αναλογία κυττάρων, ινών και θεμέλιας ουσίας ποικίλει από ιστό σε ιστό. Ο λόγος κύτταρα προς εξωκυττάρια ουσία διαχωρίζει τον συνδετικό ιστό σε χαλαρό και πυκνό. Ο χαλαρός συνδετικός ιστός περιέχει περισσότερα κύτταρα από ότι είναι κολλαγόνου και παρατηρείται στο βλεννογόνο και υποβλεννογόνο χιτώνα. Ο πυκνός περιέχει περισσότερες ίνες κολλαγόνου παρά κύτταρα. Όταν οι ίνες κολλαγόνου διατάσσονται

με σαφή προσανατολισμό (τένοντες, συνδέσμους) ο ιστός ονομάζεται πυκνός κανονικός συνδετικός ιστός. Όταν εμφανίζουν τυχαίο προσανατολισμό όπως στο χόριο του δέρματος, ο ιστός ονομάζεται πυκνός ακανόνιστος συνδετικός ιστός. Επιπλέον, στον ακανόνιστο συνδετικό ιστό κυριαρχούν οι δικτυωτές και οι ελαστικές ίνες.

(Kielty et al., 2002) (Kierszenbaum and Tres, 2011).

1.9.1 Ελαστικές ίνες

Οι ελαστικές ίνες διαθέτουν μεγάλη ελαστικότητα και μπορούν να διαταθούν στο 150% του συνήθους μήκους τους χωρίς να υποστούν ρήξη. Οι ελαστικές ίνες συντίθενται από την ινοβλάστη στο δέρμα και στους τένοντες και τα λεία μυϊκά κύτταρα στα μεγάλα αιμοφορα αγγεία και στο αναπνευστικό δέντρο. Η προελασίνη, το πρόδρομο μόριο της ελασίνης, εκκρίνεται ως τροποελασίνη. Στον εξωκυττάριο χώρο, η τροποελασίνη αλληλεπιδρά με τις ινιδίνες και τη φιβουλίνη 1 για την οργάνωση των ελαστικών ινών, οι οποίες συσσωρεύονται σχηματίζοντας δεσμίδες ελαστικών ινών. Η τροποελασίνη περιέχει ένα χαρακτηριστικό, αλλά ασύνηθες αμινοξύ: τη δεσμοσίνη. Δύο κατάλοιπα λυσίνης της τροποελασίνης οξειδώνονται από την οξειδάση της λυσίνης σχηματίζοντας ένα δακτύλιο δεσμοσίνης, που διασυνδέει δύο μόρια τροποελασίνης (Kierszenbaum and Tres, 2011). Οι ελαστικές ίνες δεν παρουσιάζουν περιοδικότητα και απαντούν σε περιοχές του σώματος που απαιτούν σημαντική ευκαμψία και ελαστικότητα (Εικ. 18) (Keely et al., 2002). Στην ελασίνη, τα δομικά στοιχεία τροποελασίνης υιοθετούν διαφορετικά σχήματα και είναι διαταγμένα τυχαία ως προς τον προσανατολισμό και τη μεταξύ τους προσκόλληση. Όταν η ελασίνη τεντώνεται, τα μόρια δεν τεντώνονται, αλλά τείνουν να ευθυγραμμίζονται προς την κατεύθυνση της έκτασης. Τα μόρια αντιστέκονται στο ίσιωμα, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η έκταση, τόσο μεγαλύτερη είναι η τάση. Όταν αφαιρεθεί το φορτίο έκτασης, τα μόρια της ελασίνης επαναφέρουν τον αρχικό προσανατολισμό και το σχήμα τους (Alexander and Garner, 1983).

Οι ελαστικές ίνες οργανώνονται στο μεσαίο στρώμα των μεγάλων ελαστικών αρτηριών ως διασυνδεδεμένο, τεχνητό δίκτυο. Κάθε στρώμα ελαστικών ινών έχει ένα σχετικό στρώμα περιφερικά προσανατολισμένων ελαστικών μυϊκών ινών και ινών κολλαγόνου και η σύνθετη δομή είναι γνωστή ως μια ελασματική μονάδα. Ο αριθμός των μονάδων καθορίζεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και σχετίζεται άμεσα με την τάση στο τοίχωμα, έτσι ώστε η μονάδα τάσης / ελασματοειδούς να είναι σταθερή στα είδη των θηλαστικών και σε όλο το αρτηριακό δέντρο. Σε μια εκφορτωμένη

αρτηρία, τα ελάσματα έχουν ελικοειδή μορφή. Καθώς η πίεση αυξάνεται, ισιώνουν και είναι κατά κανόνα ευθεία στις φυσιολογικές πιέσεις. Οι ίνες κολλαγόνου εμφανίζουν επίσης ελικοειδή μορφή σε μια μη συμπιεσμένη αρτηρία, αλλά σε αντίθεση με τα ελαστικά ελάσματα, λιγότερο από το 10% των ινών κολλαγόνου είναι ευθείες. Καθώς η πίεση αυξάνει πάνω από τις φυσιολογικές τιμές, περισσότερες ίνες κολλαγόνου γίνονται άκαμπτες και η ακαμψία τους περιορίζει την αρτηριακή διάταση. Η ολική ελασίνη κυμαίνεται από 58 έως 75% του ξηρού βάρους της απολιπανθείσας αρτηρίας (Armentano et al. 1991).



Εικόνα 18: Σχηματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής αρτηρίας. Παρατηρείται η κατανομή της ελαστίνης.

(Πηγή:<http://artemis.cslab.ece.ntua.gr:8080/jspui/bitstream/123456789/15893/1/DT2010-0310.pdf>)

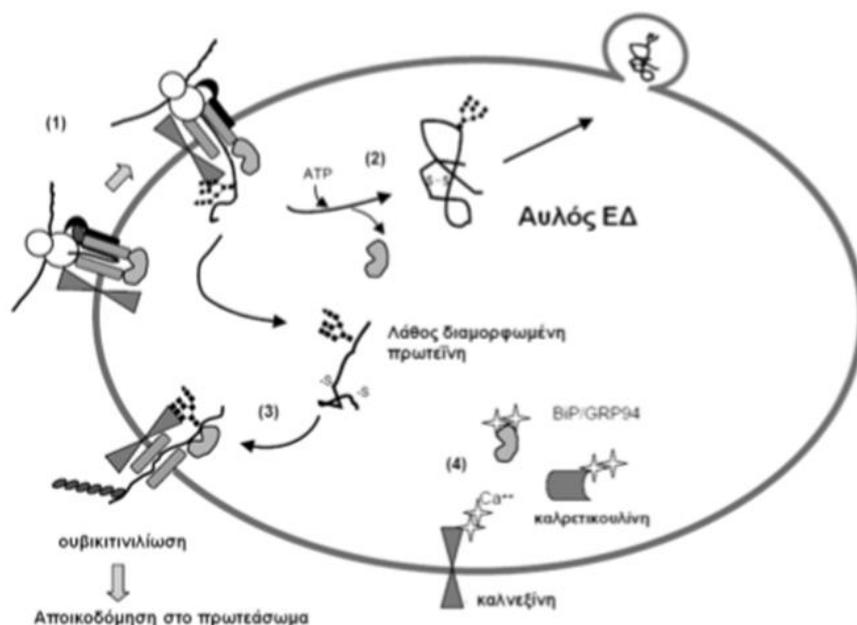
Οι ελαστικές ίνες συγκροτούνται από εξαιρετικά διατάσιμα δίκτυα διασυνδεδεμένων μορίων ελαστίνης, που παρέχουν τη δυνατότητα αποθήκευσης ελαστικής ενέργειας στους ιστούς. Η συμπεριφορά διάτασης των ελαστικών ινών προέρχεται σε μεγάλο βαθμό από τη διαμόρφωση τυχαίου σπειράματος που ξετυλίσσεται όταν τεντωθεί. Στα αιμοφόρα αγγεία, διαλυτά μόρια τροποελαστίνης εκκρίνονται από λεία μυϊκά κύτταρα και συντάσσονται σε ομοιοπολικά συνδεδεμένα φύλλα ελαστίνης που είναι εξαιρετικά υδρόφοβα. Τα μόρια ελαστίνης έχουν σχετικά μικρό μέτρο ελαστικότητας (δηλαδή δυσκαμψία) αλλά εξαιρετικά μεγάλη εκτασιμότητα, περίπου 1,1 MPa και 150% αντίστοιχα (Gosline et al., 2002). Στο

αορτικό τοίχωμα, η ελαστίνη καθορίζει τις μηχανικές ιδιότητες του ιστού σε χαμηλά και φυσιολογικά επίπεδα τάσεων (Sokolis et al., 2006). Στον αγγειακό ιστό, το ελαστικό πλέγμα όχι μόνον είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών παρά τις αιμοδυναμικές πιέσεις, αλλά επίσης καθορίζει τη ικανότητα των αγγείων για σύσπαση και χαλάρωση και είναι υπεύθυνο για την εξομάλυνση της πίεσης, την οποία η καρδιά δημιουργεί με ένα λιγότερο συνεχή τρόπο και ως εκ τούτου εξασφαλίζει την ομαλότερη ροή του αίματος (Bashur et al., 2012) Τέλος, το πλέγμα των ελαστικών ινών αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα μονοπατιών σηματοδότησης μέσω μηχανικής αγωγής σημάτων που εμπλέκονται στη μορφογένεση, την απόκριση σε τραύμα και τη φλεγμονή. Η σύνθεση των ελαστικών ινών στα αγγεία γίνεται από τους ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Αποτελούνται από τα πρωτεϊνικής φύσης ελαστικά μικροϊνίδια (γλυκοπρωτεΐνες, ινιδίνη, φμπουλίνη και υποδοχείς της ελαστίνης) και από άμορφη ελαστίνη. Τα ελαστικά μικροϊνίδια διατάσσονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν ένα ικρίωμα πάνω στο οποίο οργανώνεται η εναπόθεση άμορφης ελαστίνης. Η άμορφη ελαστίνη σχηματίζεται από τον πολυμερισμό της διαλυτής τροποελαστίνης ώστε να σχηματιστεί το αδιάλυτο πλέγμα ελαστίνης). Η τελική σύσταση των ελαστικών ινών είναι κατά 90% ελαστίνη, ενώ τα μικροϊνίδια συμπληρώνουν το υπόλοιπο 10% (Muiznieks and Keeley, 2012).

1.10 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Το ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) αποτελεί τη θέση σύνθεσης των περισσότερων συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης, αλλά και εκείνων που προορίζονται να εξέλθουν από το κύτταρο (Breckenridge et al., 2003, Rao et al., 2004, Schroder and Kaufman et al., 2005). Στο ενδοπλασματικό δίκτυο περιέχεται υψηλή συγκέντρωση Ca^{2+} λόγω της ενεργού μεταφοράς ιόντων ασβεστίου που συντελείται από το κυτταρόπλασμα μέσω της Ca^{2+} -ΑΤΡάσης (Hammadi et al., 2013). Στο ΕΔ επικρατεί ένα ισχυρό οξειδωτικό περιβάλλον, που συμμετέχει στη δημιουργία των δισουλφιδικών δεσμών όσο και στη σωστή αναδίπλωση των πρωτεϊνών (Εικ. 19). Για τη σωστή αναδίπλωση και μεταφορά των πρωτεϊνών στο ενδοπλασματικό δίκτυο συμβάλλει η ύπαρξη μεγάλου αριθμού πρωτεϊνών-συναδών (chaperone proteins), όπως η ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη πρωτεΐνη Grp78 (78 kDa glucose-regulated protein) ή η πρωτεΐνη που δεσμεύει ανοσοσφαιρίνη BiP (Binding immunoglobulin protein) και η ρυθμιζόμενη από τη γλυκόζη πρωτεΐνη Grp94 (94 kDa

glucose-regulated protein), που σταθεροποιούν τα ενδιάμεσα παράγωγα των αντιδράσεων αναδίπλωσης (Fewell et al. 2001; Gething, 1999; Ma and Hendershot, 2004).



Εικόνα 19: Λειτουργίες ΕΔ σε φυσιολογικές συνθήκες (Πηγή : <http://www.mednet.gr/archives/2019-2/pdf/151.pdf>)

Όπως προαναφέρθηκε, το ΕΔ είναι ένα απαραίτητο κυτταρικό οργανίδιο για την πρωτεϊνσύνθεση και την ωρίμανση των πρωτεϊνών, καθώς και περιοχή αποθήκευσης Ca²⁺. Η διαταραχή των λειτουργιών του ΕΔ μπορεί να προκληθεί από διακοπή της ομοιόστασης του Ca²⁺, αναστολή της γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών ή του σχηματισμού δισουλφιδικών δεσμών, υποξία και λοίμωξη από βακτήρια ή ιούς και μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση μη διαμορφωμένων ή λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών και αποτυχία του ΕΔ στην αντιμετώπιση του υπερβολικού πρωτεϊνικού φορτίου (Orrenius et al., 2003). Το αποτέλεσμα αυτών των φαινομένων είναι το στρες του ΕΔ, το οποίο ορίζεται ως μια ανισορροπία μεταξύ της κυτταρικής ζήτησης σε νεοσυντιθέμενες πρωτεΐνες και της χωρητικότητας του ΕΔ. Προκειμένου να μειώσουν το υπερβολικό πρωτεϊνικό φορτίο τα κύτταρα θέτουν σε λειτουργία την απόκριση σε μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες (Unfolded Protein Response, UPR), η οποία σηματοδοτεί την παροδική μείωση της μετάφρασης πρωτεϊνών, την αποικοδόμηση των λανθασμένα διαμορφωμένων πρωτεϊνών και την

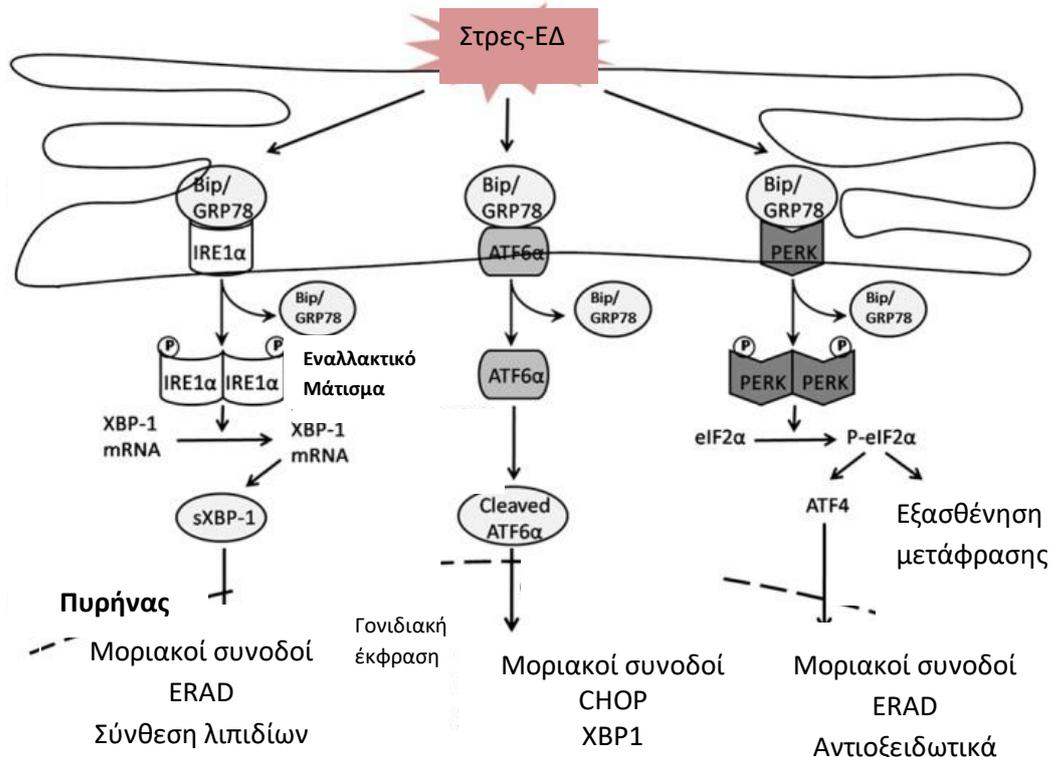
επαγωγή των επιπέδων των μοριακών συνοδών και ενζύμων αναδίπλωσης, έτσι ώστε να αυξηθεί η χωρητικότητα του ΕΔ για αναδίπλωση πρωτεϊνών και αποικοδόμηση. Ωστόσο, αν το στρες του ΕΔ δεν μπορεί να αντιμετωπιστεί, ενεργοποιούνται τα αποπτωτικά μονοπάτια στα προβληματικά κύτταρα (Rizzuto et al., 2004).

1.10.1 ΜΟΝΟΠΑΤΙΑ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΔ

Έχουν αναγνωρισθεί τρεις διαφορετικές κατηγορίες μονοπατιών μεταγωγής σήματος του στρες του ΕΔ. Κάθε κατηγορία ορίζει ένα ξεχωριστό μονοπάτι της UPR που διαμεσολαβείται από τους πρωτεϊνικούς υποδοχείς: η πρωτεΐνη 1 που απαιτεί ινοσιτόλη (Inositol-Requiring-Protein 1, IRE1), ο παράγοντας διέγερσης της μεταγραφής (Activating Transcription Factor-6, ATF6) και η τύπου PKR κινάση του ενδοπλασματικού δικτύου (PKR-like endoplasmic reticulum kinase, PERK). Σε κάθε κατηγορία έχουμε εμπλοκή της PERK (Εικ. 20). Η PERK φωσφορυλιώνει και απενεργοποιεί τον παράγοντα έναρξης της μετάφρασης των ευκαρυωτών (eukaryotic translation initiation factor-2, eIF2α) στη σερίνη 51 (Ser51). Χαμηλά επίπεδα ενεργού eIF2 έχουν ως αποτέλεσμα την καταστολή της μετάφρασης με συνέπεια τη μείωση των νεοσυντιθέμενων πρωτεϊνών (Marciniak and Ron, 2006).

Εκτός από τη μείωση της σύνθεσης των πρωτεϊνών που ανευρίσκονται στο ΕΔ, η φωσφορυλίωση του eIF2 μέσω της PERK συμβάλλει και στη μεταγραφική ενεργοποίηση του UPR. Το προφίλ έκφρασης σε κύτταρα χωρίς το γονίδιο PERK και κάτω από την επίδραση στρες του ΕΔ έδειξε την ελλιπή επαγωγή ποικίλων mRNAs που είναι υπεύθυνα για την επαγωγή του φυσιολογικού UPR. Παρόμοιο ελάττωμα στην έκφραση γονιδίων που επάγονται από το στρες του ΕΔ παρατηρήθηκε σε κύτταρα με μια μετάλλαξη σερίνης-αλανίνης (Ser51→Ala) στον eIF2α, η οποία αναστέλλει τη φωσφορυλίωση του eIF2α, αλλά δεν επιδρά με άλλο τρόπο στη λειτουργία του. Το UPR ανακουφίζει το ΕΔ από το στρες ασκώντας δράση σε τρία επίπεδα: α) αναστέλλοντας τη γενική πρωτεϊνοσύνθεση, β) επάγοντας την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν για τις μοριακές συνοδούς του ΕΔ με σκοπό την αύξηση της ικανότητας αναδίπλωσης του ΕΔ και την αποφυγή σχηματισμού τοξικών συσσωματωμάτων και γ) αυξάνοντας την έκφραση συστατικών της ERAD προκειμένου να αυξηθεί η απομάκρυνση των μη-αναδιπλωμένων πρωτεϊνών από το

ΕΔ. Με τον τρόπο αυτό το UPR επηρεάζει το μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπιδίων και αμινοξέων και τελικά την τύχη του ίδιου του κυττάρου (Εικ. 20)(Ushioda et al., 2008)



Εικόνα 20: Σηματοδοτικό μονοπάτι UPR ERAD : Αποικοδόμηση πρωτεΐνης που σχετίζεται με το ενδοπλασματικό δίκτυο (Wang et al., 2018)

1.10.2 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΔ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥΣ ΣΥΝΟΔΟΥΣ

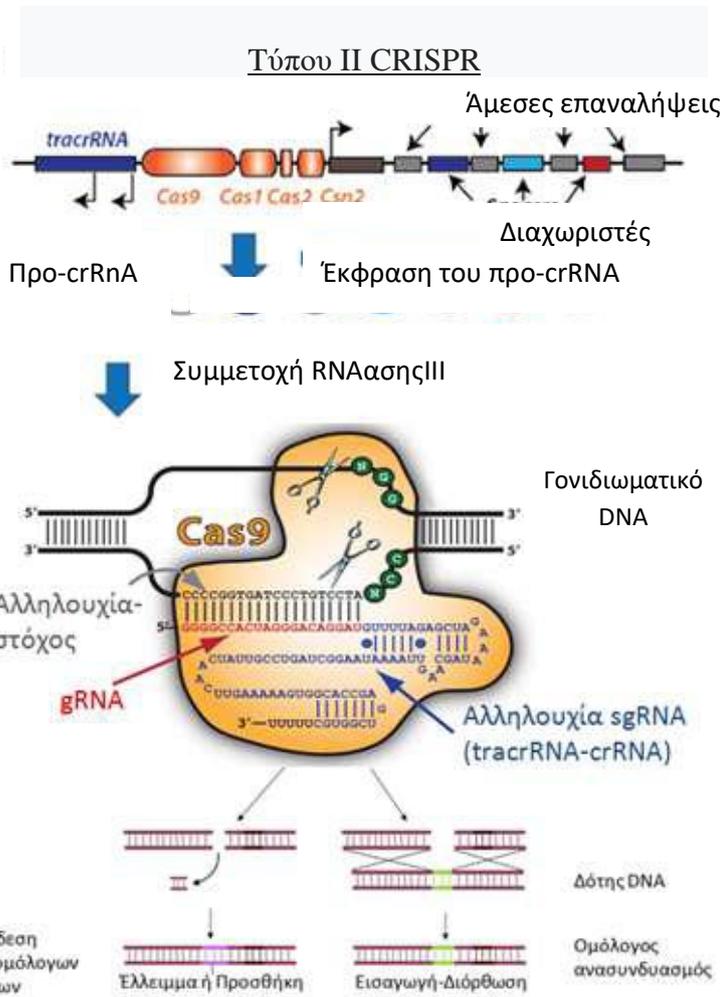
Οι αισθητήρες του στρες του ΕΔ, IRE1 και PERK είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς των οποίων η ενεργοποίηση μέσω ολιγομερισμού σχετίζεται με την εσφαλμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών στο ΕΔ. Τόσο ο υποδοχέας IRE1 όσο και ο PERK περιέχουν εξελικτικά σχετιζόμενους αισθητήρες μη αναδιπλωμένων πρωτεϊνών οι οποίοι μπορούν λειτουργικά να αντικαταστήσουν ο ένας τον άλλο και οι οποίοι εντοπίζονται στον αυλό του ΕΔ. Για τον τρόπο με τον οποίο αυτές οι περιοχές αναγνωρίζουν το φορτίο των προβληματικών πρωτεϊνών, έχουν προταθεί τρία μοντέλα. Το μοντέλο άμεσης αναγνώρισης προτείνει ότι οι μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες δεσμεύονται κατευθείαν στις περιοχές των IRE1 και PERK στον αυλό του

ΕΔ. Η πιθανότητα της δέσμευσης του πεπτιδίου στον IRE1 (και PERK) προτείνει ότι η δέσμευση αυτή οδηγεί στον ολιγομερισμό του. Ένα εναλλακτικό μοντέλο έμμεσης αναγνώρισης προτείνει ότι η δέσμευση του μοριακού συνοδού BiP, που βρίσκεται σε αφθονία στο ΕΔ, σταθεροποιεί τους IRE1 και PERK στην ανενεργή κατάσταση. Πράγματι, σε κατάσταση ηρεμίας και οι δύο υποδοχείς βρίσκονται σε σύμπλοκο που περιέχει η BiP. Το στρες του ΕΔ οδηγεί σε αποδέσμευση του BiP από τα σύμπλοκα αυτά προκειμένου να δεσμεύσει τις μη διαμορφωμένες πρωτεΐνες στο ΕΔ. Το μοντέλο αυτό όμως δεν εξηγεί εύκολα το πειραματικό εύρημα ότι τα αυξημένα επίπεδα του BiP δεν αναιρούν την ευαισθησία του UPR σε μικρές αλλαγές στα επίπεδα των μη διαμορφωμένων πρωτεϊνών. Επίσης, η δέσμευση του BiP δεν είναι απαραίτητη για τη ρύθμιση του IRE1. Ένα τρίτο μοντέλο, υβρίδιο των δύο προηγούμενων προτείνει ότι τόσο η αποδέσμευση της BiP όσο και η δέσμευση του πεπτιδίου προκαλούν την ενεργοποίηση των υποδοχέων. Για το λόγο αυτό, η BiP θεωρείται διαγνωστικός δείκτης του στρες του ΕΔ (Vitale et al.,2019).

1.11 Σύστημα στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης CRISPR-Cas9 **(Συστοιχίες τακτικά διατεταγμένων βραχειών παλινδρομικών** **επαναληπτικών αλληλουχιών/CRISPR συσχετιζόμενη** **πρωτεΐνη-9)**

Το σύστημα CRISPR αποτελεί την πιο σύγχρονη μέθοδο στοχευμένης γονιδιωματικής τροποποίησης (Feng et al., 2013)(Mali et al, 2013). Προέρχεται από το βακτήριο *S.pyrogenes*, όπου δρα ως αμυντικός μηχανισμός έναντι του ξένου DNA (ιικό ή πλασμιδιακό). Στα βακτήρια, το ενδογενές σύστημα CRISPR/Cas στοχοποιεί το ξένο DNA δημιουργώντας ένα μικρό συμπληρωματικό μονόκλωνο RNA (CRISPR RNA ή crRNA) μέσω του οποίου η νουκλεάση Cas 9 (CRISPR associated protein 9) εντοπίζει τη DNA αλληλουχία-στόχο. Η αλληλουχία-στόχος μπορεί να βρίσκεται εντός πλασμιδίου ή συγχωνευμένη στο βακτηριακό γονιδίωμα. Ακόμη, η αλληλουχία μπορεί να εντοπίζεται σε μία ή πολλαπλές θέσεις, οι οποίες, στο σύνολό τους, θα αποτελέσουν στόχο της Cas9. Ανεξάρτητα από την έλικα του DNA στην οποία θα προσδεθεί το crRNA, η Cas9 θα κόψει το δίκλωνο DNA (double strand break, DSB),

αποσιωπώντας τη συγκεκριμένη αλληλουχία (Blackburn et al., 2013). Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τρία διαφορετικά βακτηριακά συστήματα CRISPR, τα οποία ταξινομούνται ως τύπου I, II και III. Η τεχνολογία γονιδιωματικής τροποποίησης που χρησιμοποιείται σήμερα βασίζεται στον τύπο II και συνοπτικά ονομάζεται μέθοδος CRISPR. Το σύστημα CRISPR/Cas9 τύπου II αποτελείται από δύο διακριτά συστατικά, το RNA-οδηγό (guide RNA ή gRNA) και τη νουκλεάση Cas9. Το gRNA αποτελεί προϊόν συγχώνευσης των ενδογενών βακτηριακών crRNA και trans-διεγερτικού crRNA (tracrRNA) και διαθέτει την ειδικότητα στόχευσης του crRNA και την ικανότητα τροποποίησης του tracrRNA, συνδυασμένες σε ένα μετάγραφο. Όταν το gRNA και η Cas9 εκφραστούν σε ένα κύτταρο, η γονιδιωματική αλληλουχία-στόχος μπορεί να υποστεί μετατροπή (Auer and Del Bene, 2014). Βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία ενός τέτοιου συστήματος αποτελεί η ύπαρξη της σωστής αλληλουχίας PAM (protospacer adjacent motif) κοντά στη γονιδιωματική αλληλουχία-στόχο. Το σύστημα τύπου II περιορίζεται, μέχρι σήμερα, στη στόχευση αλληλουχιών τύπου N12-20NGG, όπου το NGG αποτελεί την αλληλουχία PAM. Η δέσμευση του συμπλέγματος gRNA/Cas9 στην αλληλουχία-στόχο, μέσω της συμπληρωματικότητας των νουκλεοτιδικών βάσεων, επιστρατεύει σε αυτήν την Cas9 ώστε να κόψει τη διπλή έλικα του DNA (Εικ. 21). Στη συνέχεια, η απόπειρα επιδιόρθωσης των βλαβών αυτών από τα κύτταρα μέσω της μη-ομόλογης σύνδεσης άκρων θα οδηγήσει σε σφάλματα προσθήκης ή αφαίρεσης νουκλεοτιδίων και κατά συνέπεια σε αλλαγές του πλαισίου ανάγνωσης ή και πρώιμα κωδικώνια λήξης της μετάφρασης, διαταράσσοντας έτσι το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου. Από τη στιγμή που το σύστημα εισαχθεί στα έμβρυα zebrafish προκαλεί αποκοπή της διπλής αλυσίδας του DNA στο σημείο που έχουμε επιλέξει και οδηγεί στη διαταραχή της αλληλουχίας του, μέσω των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Σε ορισμένα από τα κύτταρα (μερικά από τα οποία θα είναι και γαμέτες) το γονίδιο-στόχος θα μεταλλαχθεί, με αποτέλεσμα μεγαλώνοντας τα έμβρυα και στη συνέχεια ζευγαρώνοντάς τα μεταξύ τους, θα μπορέσουμε να παρατηρήσουμε το φαινόμενο που προκύπτει από την απενεργοποίηση του γονιδίου-στόχου και στα δύο χρωμοσώματα. Επίσης, το σύστημα CRISPR μας δίνει τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε το μεταλλαγμένο φαινόμενο και σε ορισμένα έμβρυα της πρώτης ήδη γενιάς, αυτής δηλαδή των εμβρύων που έχουν υποστεί μικροένεση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μεγάλη διεισδυτικότητα των CRISPR που σε ορισμένες περιπτώσεις αγγίζει το 80-90% (Gaurav et al., 2015).



Εικόνα 21 : Επισκόπηση του συστήματος CRISPR/Cas9 (Πηγή : <https://www.biocat.com/genomics/genome-engineering/crispr-cas9-smartnuclease-genome-engineering-system-vector-based>)

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Οι καρδιαγγειακές παθήσεις αποτελούν στην εποχή μας μία από τις πρώτες αιτίες θανάτου στον ανεπτυγμένο κόσμο. Επίσης, πολύ σημαντική είναι η συμβολή της αγγειογένεσης στην ανάπτυξη των καρκινικών όγκων. Καθίσταται λοιπόν αναγκαία η συμβολή της βασικής έρευνας ώστε να μελετηθούν καλύτερα οι μηχανισμοί των παθήσεων αυτών αλλά και να ανακαλυφθούν νέα φάρμακα που σχετίζονται με την αγγειογένεση. Τα τελευταία χρόνια σημαντικό ρόλο παίζει προς αυτές τις κατευθύνσεις το ζωϊκό πρότυπο μοντέλο Zebrafish.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή αρχικά παρουσιάζεται η παθολογία που αναπτύσσεται κατά την μετάλλαξη *myh6^{-/-}* σε ενήλικα Zebrafish με σκοπό την εύρεση των μηχανισμών που επάγονται για την αντιστάθμιση του υπολειπόμενου κόλπου και την εξομάλυνση των παθολογικών καταστάσεων.

Επιπρόσθετα, λόγω της πρόσφατης σχετικά χρήσης του zebrafish στον τομέα ανίχνευσης νέων αντι-αγγειογενετικών παραγόντων, εξετάστηκε (α) η αποτελεσματικότητα 60 μορίων-υποψηφίων αναστολέων της αγγειογένεσης μέσω του μονοπατιού VEGFR-2 και (β) η τοξικότητά τους.

Τέλος, με δεδομένο ότι η σωστή λειτουργία της καρδιάς επηρεάζει τη μορφογένεσή της, όπως βλέπουμε στο μοντέλο υπολειπόμενου κόλπου και αναδιαμόρφωσης της κοιλίας ή στην ανάπτυξη καρδιακών βαλβίδων, μελετήσαμε γονίδια τα οποία αποκρίνονται στις αλλαγές της διατμητικής τάσης. Στα πλαίσια αυτά, επιχειρήσαμε να δημιουργήσουμε μια διαγονιδιακή GFP:zebrafish σειρά που να ανταποκρίνεται στις αλλαγές της τάσης διάτμησης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΔΙΑΒΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ZEBRAFISH ΣΤΑ ΕΝΥΔΡΕΙΑ ΤΟΥ

ΙΙΒΕΑΑ

Οι εγκαταστάσεις για τα zebrafish, βρίσκονται στο υπόγειο του ΙΙΒΕΑΑ. Το πρώτο ενυδρείο, αποτελείται από 2 ξεχωριστά συστήματα και υποστηρίζει δοχεία ενός λίτρου και τριών λίτρων (Εικ. 22).



Εικόνα 22 : Το σύστημα 2 του αρχικού ενυδρείου, ομοίως και το σύστημα 1

Το δεύτερο ενυδρείο αποτελείται από 5 ξεχωριστά συστήματα. Τα 2 πρώτα υποστηρίζουν επίσης δοχεία ενός λίτρου και τριών λίτρων, αλλά τα συστήματα 3, 4, 5 αποτελούνται από δοχεία 5 λίτρων (Εικ. 23,24).



Εικόνα 23 : Συστήματα 1 και 2 του νέου ενυδρείου



Εικόνα 24 : Σύστημα 3 του νέου ενυδρείου, ομοίως και τα συστήματα 4 και 5

Οι συνθήκες διαβίωσης για τα ψάρια είναι ίδιες και στα 2 ενυδρεία αλλά και στα συνολικά 7 συστήματα. Πιο συγκεκριμένα :

Ο κύκλος φωτός-σκότους είναι 14 ώρες φως και 10 σκοτάδι (9:00 – 23:00 φως)

Η θερμοκρασία στα συστήματα κυμαίνεται από 27°C έως 28°C.

Το pH κυμαίνεται από 6,5 έως 7,7. Πάντως, είναι προτιμότερο να συντηρείται κοντά στα χαμηλά όρια γιατί στη μικρότερη τιμή του, η τοξική NH₃ μετατρέπεται σε NH₄⁺ κατά τη χημική ισορροπία :



Η αγωγιμότητα του νερού από 400 έως 700 μS.

Τα νιτρικά (< 2.5 mg/L) και τα νιτρώδη (≤ 0.025 mg/L).

Στα συστήματα το νερό επανακυκλοφορεί.

Σε κάθε μονόλιτρο δοχείο ιδανικά πρέπει να συντηρούνται 1 - 3 ψάρια, σε κάθε τρίλιτρο 3-10 ψάρια και στα δοχεία 5 λίτρων να συντηρούνται 4-16 ψάρια. Η διατήρηση των ψαριών σε πυκνότητες μικρότερες του 1 ψαριού/λίτρο θα προκαλέσει συνήθως προβλήματα λόγω υπερβολικής σίτισης. Επιπλέον, ευνοεί την ανάπτυξη των θηλυκών, σε αντίθεση με τις υψηλές πυκνότητες ψαριών που ευνοούν την ανάπτυξη αρσενικών ατόμων.

Όσον αφορά στις προνύμφες, σε μονόλιτρα δοχεία τοποθετούμε μέχρι 25, ενώ σε τρίλιτρα δοχεία τοποθετούμε μέχρι 40 προνύμφες. Για τις προνύμφες χρησιμοποιούμε νερό (egg water) με την εξής σύσταση :

4 L απιονισμένου νερού

1,2 γρ. Instant Ocean (άλας)

0,32 γρ. CaSO₄

3.2 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τα Zebrafish δεν έχουν ανάγκη εξωτερικής τροφής μέχρι και την 5^η ημέρα από τη γέννησή τους και αυτό λόγω της λεκίθου που φέρουν μέχρι εκείνη τη μέρα. Από την 5^η ημέρα και έπειτα ταΐζουμε το πρωί και το απόγευμα με ξηρή τροφή (την ZM000). Τα παραπάνω μέχρι την 25^η ημέρα περίπου, όπου αρχίζουμε να ταΐζουμε με καρκινοειδή (*Artemia salina*) και με ξηρή τροφή ZM100 τις αντίστοιχες ώρες. Σε ηλικία 2 μηνών δίνουμε τροφή ZM300 ή ZM400 (ZM-systems, UK).

3.2.1 ΠΡΩΙΝΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΜΕ *Artemia salina*

- Χρησιμοποιούνται επίσης για τροφή, κύστες *Artemia salina* που έχουν εκκολαφθεί μέσα σε 2 ημέρες (Εικ. 25)



Εικόνα 25: Τα 2 κωνικά δοχεία που χρησιμοποιούμε για την καλλιέργεια της *Artemia*

- Πριν το τάισμα αναδεύουμε έντονα την καλλιέργεια και στη συνέχεια ανοίγουμε τη στρόφιγγα στο κάτω μέρος του δοχείου για να απορρίψουμε τα κελύφη από τις εκκολαφθέντα κύστες που έχουν καθιζάνει.
- Απομακρύνουμε την παροχή αέρα από το δοχείο καλλιέργειας και περιμένουμε τουλάχιστον 10 λεπτά

- Μετά την παρέλευση του προαναφερθέντος χρόνου (ώστε να επιτευχθεί διαχωρισμός των ατόμων *Artemia* από τα κελύφη των κυστών) ανοίγουμε τη στρόφιγγα και διοχετεύουμε το υγρό της καλλιέργειας στο πλαστικό δοχείο, περνώντας το μέσα από το σουρωτήρι για να κρατήσουμε τα καρκινοειδή.
- Ρίχνουμε dH₂O στο σουρωτήρι για να ξεπλύνουμε τις γαρίδες και τις μεταφέρουμε στο πλαστικό κυλινδρικό δοχείο για τάισμα με τη βοήθεια της πλαστικής πιπέτας. Συμπληρώνουμε με dH₂O μέχρι αυτό να γεμίσει.
- Ξεπλύνουμε καλά με νερό βρύσης και με τη βούρτσα το κωνικό δοχείο καλλιέργειας και το σουρωτήρι και επιστρέφουμε το απορριφθέν φιλτραρισμένο νερό ξανά στον κώνο. Συμπληρώνουμε με dH₂O και προσθέτουμε αυγά *Artemia salina*, περίπου 1,5 καπάκι ενός σωληναρίου 50 ml. Τέλος επανατροφοδοτούμε με αέρα το σύστημα.
- Το τάισμα γίνεται ως εξής: Στα μονόλιτρα δοχεία χρησιμοποιούμε 4 ml για 3-4 δοχεία. Στα δοχεία με λίγα μικρά ψάρια χρησιμοποιούμε 2 ml, ενώ στα δοχεία με περισσότερα και μεγάλα ψάρια χρησιμοποιούμε 4 ml από την τροφή μας.

3.3 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Τα zebrafish όπως έχει προαναφερθεί, μπορεί να διασταυρώνονται ακόμη και 2 φορές την εβδομάδα και να δίνει το κάθε ζευγάρι εκατοντάδες αυγά κάθε φορά. Καταρχήν, πρέπει να γίνεται διαχωρισμός πριν την ημέρα της ζητούμενης ωοτοκίας, περίπου 3 ώρες μετά την μεσημβρινή διατροφή τους.

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι υπάρχουν 2 τρόποι διασταύρωσης των ψαριών ανάλογα με το πλήθος τους και τα ζευγάρια που θα χρησιμοποιήσουμε. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα ζευγάρι το οποίο το διαχωρίζουμε με πλέγμα. Συνήθως, τοποθετούμε το αρσενικό από κάτω και το θηλυκό από πάνω όπως φαίνεται στην εικ. 26. Ο άλλος τρόπος είναι να χρησιμοποιηθούν πολλά αρσενικά και θηλυκά που διαχωρίζονται πάλι με πλέγμα.



Εικόνα 26: Τοποθέτηση του πλέγματος κατά τη διάρκεια της νύχτας πριν τη διασταύρωση. Πάνω συνήθως τοποθετείται το θηλυκό και κάτω το αρσενικό.

Την επόμενη μέρα και μάλιστα λίγο μετά την έναρξη του φωτισμού, ενώνονται τα αρσενικά με τα θηλυκά και τοποθετούνται στην πάνω πλευρά του πλέγματος, ώστε να μη φαγωθούν τα αυγά από το αρσενικό μετά την ωοτοκία του θηλυκού (Εικ. 27).



Εικόνα 27: Κατά τη διασταύρωση τοποθετούμε πάνω από το πλέγμα το αρσενικό και το θηλυκό, ώστε το αρσενικό να μην μπορεί να τραφεί με τα αυγά του θηλυκού μετά την ωοτοκία.

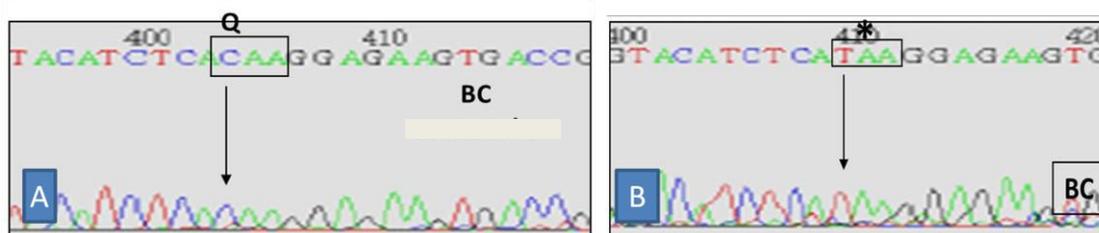
Έπειτα, αφήνονται για 1-2 ώρες για να επέλθει η ωοτοκία και η γονιμοποίηση των αυγών από το σπέρμα των αρσενικών (μέσα σε 15 – 20 λεπτά μετά την έξοδό τους από το θηλυκό έχει πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση). Τέλος, επιστρέφονται προσεκτικά τα ψάρια πίσω στις δεξαμενές όπου ανήκουν, και τα δοχεία που έχουν

αυγά, διηθούνται (και εκπλένονται με egg water) ώστε να ληφθούν τα αυγά μέσα σε τρυβλία petri, τα οποία με τη σειρά τους τοποθετούνται στον επωαστήρα στους 28°C (Μεταπτυχιακή εργασία Σαράντη Π., 2012).

3.4 ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΕΣ & ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαγονιδιακές σειρές :

Η μεταλλαγμένη σειρά BC (ή s459), που φέρει μετάλλαξη στο γονίδιο *myh6*, με υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας της μετάλλαξης. Στη συγκεκριμένη μετάλλαξη υπήρχε μία αλλαγή βάσης από A σε T που δημιουργεί πρώιμο κωδικόνιο λήξης στη θέση 316 της αμινοξικής αλληλουχίας του s459 μεταλλαγμένου εμβρύου (Εικ. 28). Αυτή η μετάλλαξη προκαλεί απώλεια της λειτουργικότητας της πρωτεΐνης και διακόπτει τη συστατική δραστηριότητα του κόλπου. Η μετάλλαξη επηρεάζει την κεφαλή της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης του κόλπου η οποία αλληλεπιδρά με την ακτίνη για να επιτευχθεί η συστολή των μυικών ινιδίων.



Εικόνα 28: Αλληλούχηση του DNA του γονιδίου *myh6* σε (A). Μη φορέα της μετάλλαξης από την οικογένεια BC (s459) (B). Μεταλλαγμένο έμβρυο από την οικογένεια BC(s459). Q: γλουταμίνη *:κωδικόνιο λήξης

Tg(kdrl:EGFP)^{s843} (kinase insert domain receptor like) : Τα διαγονιδιακά zebrafish kdrl:gfp εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη σε ενδοθηλιακά κύτταρα, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου kdrl (ή flk), το οποίο αποτελεί μεταγραφικό παράγοντα του ενδοθηλίου (Beis et al., 2005)

Tg(myf7:EGFP)^{twu34} (myosin light polypeptide 7, regulatory) : εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα του μυοκαρδίου. Το γονίδιο της πράσινης φθορίσουσας πρωτεΐνης είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του

γονιδίου *myl7*, το οποίο κωδικοποιεί την ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και της κοιλίας (Huang et al., 2003)

Tg(amhc:eGFP)^{s958} (atrial myosin heavy chain) : εκφράζουν την πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη στα κύτταρα του μυοκαρδίου του κόλπου, το γονίδιο της οποίας είναι κλωνοποιημένο με τον υποκινητή του γονιδίου *myh6*, το οποίο κωδικοποιεί τη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης στον κόλπο της καρδιάς (Berdougo et al., 2003).

3.5 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΤΑΛΛΑΓΜΕΝΩΝ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ ZEBRAFISH ΑΠΟ ΕΛΕΓΧΟ ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΕΤΑΛΛΑΞΗΓΕΝΕΣΗ

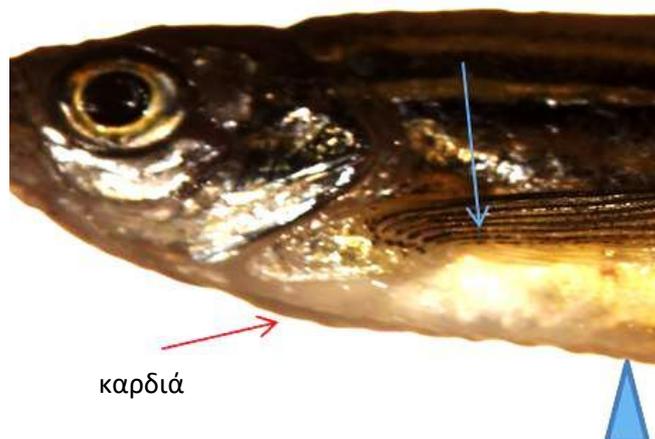
Η μετάλλαξη που μελετήθηκε στην εργασία αυτή στο γονίδιο *myh6* προήλθε από έναν ευρύ γενετικό έλεγχο, μετά την πρόκληση τυχαίας μεταλλαξιγένεσης που έγινε από τον Δρ. Μπέη και τους συνεργάτες του, στο Πανεπιστήμιο του Σαν Φρανσίσκο το 2005 για ανεύρεση μεταλλάξεων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των καρδιακών βαλβίδων. Για τη μεταλλαξιγένεση σε zebrafish χρησιμοποιήθηκε η χημική ουσία N-αιθυλο-Nιτροζουρία (ENU), η οποία είναι ευρέως αποδεκτή για πρόκληση τυχαίων σημειακών μεταλλάξεων στο γονιδίωμα του zebrafish. Είναι ένας αλκυλιωτικός παράγοντας που δρα στις βάσεις των νουκλεοτιδίων (συνήθως στις θυμίνες) προσφέροντας την αιθυλική ομάδα της. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μεταλλάξεις στο DNA και μάλιστα σε πιο μεγάλη συχνότητα από τις ακτίνες X που μπορεί να φτάσει και τις 12 φορές (Hitotsumachi et al., 1985) Έπειτα επιλέγονται οι F3 απόγονοι από τις F2 μεταλλαγμένες οικογένειες με βάση το φαινότυπο που μας ενδιαφέρει.

Από την εν λόγω μεταλλαξιγένεση ελέγχθηκαν 9076 έμβρυα από 2392 οικογένειες που υπέστησαν μεταλλαξιγένεση. Τα έμβρυα από διασταυρώσεις απογόνων αυτών των οικογενειών παρατηρούνται μεταξύ των 50-60 ωρών και 5-6 ημερών μετά τη γονιμοποίηση με κριτήριο την παλινδρόμηση αίματος μέσω της καρδιάς και την ελαττωματική μορφολογία της καρδιάς για την ανεύρεση ρυθμιστικών γονιδίων της καρδιακής ανάπτυξης.

Πιο συγκεκριμένα, βρέθηκαν 55 μεταλλάξεις, που αντιστοιχούν σε 48 διαφορετικά γονίδια, οι οποίες παρουσιάζουν ανωμαλίες σε διακριτά στάδια κατά το σχηματισμό και την ανάπτυξη της κολποκοιλιακής βαλβίδας. Η παλινδρόμηση αίματος χρησιμοποιήθηκε σαν δείκτης για τη διαταραχή στο σχηματισμό και τη λειτουργία της αναπτυσσόμενης καρδιάς.

3.6 ΕΚΤΟΜΗ ΚΑΡΔΙΑΣ ΑΠΟ ΕΝΗΛΙΚΟ ΚΑΙ ΝΕΑΡΟ ZEBRAFISH

Αρχικά για την αναισθητοποίηση του ενήλικου ψαριού το τοποθετούμε σε ένα δοχείο με παγωμένο νερό με ή χωρίς tricaine. Μετά από 5-10 λεπτά μεταφέρουμε το ψάρι από το δοχείο με το νερό σε ένα τρυβλίο με PBS. Με ένα χειρουργικό ψαλίδι ανοίγουμε το ψάρι με κάθετη κοιλιακή τομή έως τη γνάθο και αποκαλύπτεται ο περικαρδιακός ινώδης ασκός στον οποίο περιέχεται η καρδιά (Εικ. 29). Κόβουμε προσεκτικά με τις λαβίδες και ελέγχουμε την παρουσία των κοιλοτήτων της καρδιάς μέσα στο ψάρι και στη συνέχεια αποκόβοντας πρώτα την έξοδο του αορτικού βολβού από τη μία και την είσοδο του φλεβικού κόλπου από την άλλη, γίνεται εκτομή της καρδιάς.



Εικόνα 29: Σημείο τομής του ψαριού στο σημείο (τρίγωνο) κάτω από τα πλαϊνά πτερύγια για την ευκολότερη εκτομή της καρδιάς και την εκροή του αίματος στο PBS στο τρυβλίο. Κόκκινο βέλος: καρδιά, μπλε βέλος: πλαϊνό πτερύγιο (Μεγέθυνση X 20)

Σχετικά με τα νεαρά zebrafish, αναισθητοποιούνται με παγωμένο νερό για 3-4 λεπτά. Με ένα νυστέρι κόβουμε το ψάρι στο ύψος των θωρακικών πτερυγίων και αφήνουμε για 1-2 λεπτά το αίμα να απομακρυνθεί από το εσωτερικό της καρδιάς με ταυτόχρονη

πλύση με PBS. Στη συνέχεια μονιμοποιούμε το κομμένο σώμα σε 4% παραφορμαδεΰδη για 16 ώρες στους 4°C. Έπειτα, διανοίγουμε το ψάρι με λεπτές λαβίδες μέχρι την αποκάλυψη του περικαρδιακού ινώδους ασκού στον οποίο περιέχεται η καρδιά. Τελικά, απομακρύνουμε την καρδιά αποκόπτοντας τον αορτικό βολβό (Εικ. 30).



Εικόνα 30 : Απεικόνιση της καρδιάς μετά την διάνοιξη του θωρακικού τοιχώματος. Με λευκό βέλος ο αορτικός βολβός και με πράσινο η κοιλία.

3.7 ΕΓΚΛΕΙΣΗ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΤΟΜΩΝ

Οι καρδιές, μετά την αφαίρεσή τους, τοποθετούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων (PBS) και μονιμοποιούνται με παραφορμαδεΰδη (PFA, 4% v/v) για 16 ώρες στους 4°C. Η περαιτέρω επεξεργασία τους σχετίζεται με το αν προορίζονται για λήψη κρουτομών ή τομών παραφίνης.

A. Λήψη τομών με κρουτόμο

Για να προστατευθούν ευαίσθητοι επίτοποι που καταστρέφονται με την παραφινοποίηση, προτιμάται η λήψη κρουτομών. Μετά τη μονιμοποίηση, τα δείγματα εκπλένονται με PBS και στη συνέχεια διατηρούνται για 1-2 μέρες σε διάλυμα σουκρόζης 30% (w/v), η οποία λειτουργεί κρουπροστατευτικά. Έπειτα, τοποθετούνται σε ειδικές θήκες-μήτρες και εμποτίζονται με το ειδικό υλικό κρουπροστασίας για φύλαξη σε χαμηλές θερμοκρασίες (Optimal Cutting Temperature, OCT) και φυλάσσονται στους -80°C. Η μήτρα ιστού-OCT κόβεται στον κρουστάτη σε τομές 10-20 μm, οι οποίες τοποθετούνται σε ειδικές αντικειμενοφόρους πλάκες (cryofrost plus). Αφήνονται για 45' σε θερμοκρασία δωματίου και στη

συνέχεια φυλάσσονται στους -80°C . Πριν την εφαρμογή του ανοσοφθορισμού αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 2 ώρες. Οι τομές μονιμοποιούνται αφού εμβαπτιστούν σε ακετόνη (-20°C) για 5', στέγνωμα σε θερμοκρασία δωματίου 5-10' και εκπλύσεις με PBS.

B. Λήψη τομών με μικροτόμο

Μετά τη μονιμοποίηση και την έκπλυση με PBS, η καρδιά τοποθετείται σε διάλυμα αιθανόλης 70% (v/v) για 1-2 ημέρες. Ακολουθεί σταδιακή αφυδάτωση του ιστού με μια σειρά από διαδοχικές επνώσεις σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση της παραφίνης.

Η πορεία των επνώσεων είναι η εξής:

EtOH 70% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 85% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 95% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

EtOH 100% (x 2 φορές), RT, 30 λεπτά

Τα διαλύματα αιθανόλης παρασκευάζονται φρέσκα, ώστε να μην τροποποιείται η συγκέντρωση της αιθανόλης λόγω εξάτμισης.

Παράλληλα η λιωμένη παραφίνη διηθείται μέσα από χαρτί χρωματογραφίας Whatman 3M, ώστε να συγκρατηθούν τα αδιάλυτα τμήματα και σκουπίδια. Συγχρόνως προθερμαίνεται κατάλληλη ποσότητα ξυλενίου για το επόμενο στάδιο.

Ο αφυδατωμένος ιστός επνώζεται στη συνέχεια 2 φορές με 100% ξυλένιο, σε απαγωγό, για 20 λεπτά (RT).

Ακολουθεί επώαση με διάλυμα ξυλενίου / παραφίνης (1:1), στους 65°C για 45 λεπτά.

Τελικά ο ιστός εμβαπτίζεται σε 100% παραφίνη (x 3) στους 65°C και επνώζεται για 20 λεπτά ανά εμβάπτιση. Η τελευταία επώαση με την παραφίνη πραγματοποιείται στο δοχείο όπου θα παραμείνει για να σχηματιστεί το καλούπι ιστού-παραφίνης. Όσο η παραφίνη είναι ακόμα υγρή, διευθετείται ο ιστός στο κέντρο του δοχείου και αφήνεται μετά το τέλος της τελευταίας 20λεπτης επώασης να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου (O/N).

Τα καλούπια φυλλάσσονται στους 4°C, όπου διατηρούνται για αρκετό διάστημα

Για τη λήψη τομών ακολουθούνται τα εξής στάδια :

- Τοποθετούμε το καλούπι με τον ιστό στην ειδική υποδοχή του μικροτόμου παραφίνης.
- Ρυθμίζουμε το πάχος των τομών που θέλουμε να πάρουμε (5μm-15μm)
- Οι τομές αυτές τοποθετούνται αρχικά σε κρύο νερό. Στη συνέχεια, τις μεταφέρουμε με τη βοήθεια ενός πινέλου σε ένα υδατόλουτρο θερμοκρασίας 50°C, προκειμένου να ξετυλιχτούν και να τοποθετηθούν στις αντικειμενοφόρες πλάκες πολυλυσίνης.
- Οι τομές αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου (25° C) για 24 ώρες.

Για να πραγματοποιηθεί ο ανοσοφθορισμός, πρέπει πρώτα να γίνει η αποπαραφινοποίηση. Για την αποπαραφινοποίηση των ιστών οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές τοποθετούνται σε ένα γυάλινο δοχείο με ξυλένιο, όπου και παραμένουν για 30 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα οι ιστοί ενυδατώνονται σταδιακά με εμβάπτιση σε μια σειρά από διαδοχικές ελαττούμενες συγκεντρώσεις αιθανόλης (EtOH), ώστε να επιτραπεί στη συνέχεια η διείσδυση του υδατικού διαλύματος μέσα στους ιστούς.

Η πορεία των επωάσεων είναι η εξής:

EtOH 100 % RT, 10 λεπτά

EtOH 95 % RT, 10 λεπτά

EtOH 70 % RT, 10 λεπτά

EtOH 50 % (x 2 φορές), RT, 10 λεπτά

PBS 1X , RT, 10 λεπτά

3.8 ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής εργασίας, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία σε τομές από καρδιές νεαρών και ενήλικων ατόμων zebrafish.

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ικανότητα των ειδικών αντισωμάτων να εντοπίζουν και να συνδέονται με το αντίστοιχο αντιγόνο. Η σήμανση του αντισώματος με την κατάλληλη χημική ένωση-ιχνηθέτη καθιστά το σύμπλεγμα αντιγόνου-αντισώματος ορατό. Ανάλογα με τη φύση της ανοσοϊστοχημικής τεχνικής και το είδος του ιχνηθέτη που χρησιμοποιείται, η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου-αντισώματος ελέγχεται με κοινό, φθορισμού, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο ή συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης (confocal). Η πρώτη εφαρμογή της μεθόδου πραγματοποιήθηκε το 1941 από τον Albert Coons και τους συνεργάτες του (Coons et al., 1941).

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν το εξής:

- 10 λεπτά PFA 4% σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (50 μl σε κάθε τομή)
- 3 X 5 λεπτά εκπλύσεις με PBST
- 60 λεπτά επώαση με BSA 4% σε διαλύτη PBST (για κάλυψη των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος
- Νυχτερινή επώαση στους 4 °C του πρωτογενούς αντισώματος (σε κατάλληλη αραιώση με BSA 4%) και επικάλυψη των τομών με parafilm (δεν επιτρέπει την εξάτμιση του διαλύματος αντίσωμα-BSA 4%)
- Αφαίρεση του πρωτογενούς αντισώματος και 3 X 5 εκπλύσεις με PBST
- Επώαση για 2 ώρες του δευτερογενούς αντισώματος (αναγνωρίζει τη βαριά αλυσίδα του πρώτου αντισώματος με εξειδίκευση στον οργανισμό που έχει παρασκευαστεί το πρωτογενές αντίσωμα και είναι συζευγμένο με φθορίζουσα χρωστική) σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και με προστασία από το φως.
- 3 X 5 λεπτά εκπλύσεις με PBST
- Κάλυψη των τομών με υγρό μέσο προστασίας φθορισμού
- Τοποθέτηση καλυπτρίδας και στεγανοποίηση με βερνίκι

Για την οπτικοποίηση των ορίων των κυττάρων στο μυοκάρδιο χρησιμοποιήσαμε το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της λεκτίνης του σιταριού (WGA) σε αραιώση 1:100. Το συγκεκριμένο πρωτογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με δευτερογενές αντίσωμα που φέρει κόκκινη φθορίζουσα ουσία (abcam ab20528). Για την παρατήρηση των

ινιδίων της F-ακτίνης χρησιμοποιήσαμε φαλοϊδίνη συζευγμένη με την κόκκινη φθορίζουσα χημική ένωση ροδαμίνη (invitrogen, Nr R415) σε αραιώση 1:500. Η φαλοϊδίνη είναι ένα διπεπτιδίο, είναι τοξίνη και απομονώνεται από το μανιτάρι *Amanita phalloides*. Για την οπτικοποίηση των πυρήνων των κυττάρων του μυοκαρδίου χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα Mef-2c σε αραιώση 1:100 (Santa cruz biotechnology sc-313). Ο Mef-2c είναι μεταγραφικός παράγοντας που παίζει ρόλο στην καρδιακή μορφογένεση και στη μυογένεση. Για τον υπολογισμό των καρδιομυοκυττάρων σε πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιήσαμε διπλή χρώση PCNA-MEF2c (mouse PCNA 1:200 Sigma-Aldrich P88250). Επώασαμε τις κρουτομές για 10 λεπτά με 10% SDS ξεπλύνουμε με PBS 3x5 λεπτά και στη συνέχεια επώασαμε με 4% (w/v) διάλυμα BSA για 1 ώρα (Wang and Poss, 2016). Επιπλέον, ως δευτερογενή αντισώματα χρησιμοποιήσαμε τα : anti-rabbit Alexa Fluor 633 σε αραιώση 1:250 (invitrogen, Nr A-20170) και anti-mouse Alexa Fluor 488 σε αραιώση 1:500 (invitrogen, NrA-10235). Τελικός σκοπός είναι να γίνει η παρατήρηση των παραπάνω τομών σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal Leica TCS SP5 II).

3.9 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΜΑ ΚΑΤΑ WESTERN

Ο διαχωρισμός και η αναγνώριση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία θειϊκού δωδεκακυλικού νατρίου (SDS), ακολουθώντας τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970).

ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Τοποθέτηση της απομονωμένης κοιλίας σε παγωμένο ρυθμιστικό διάλυμα RIPA 100 μl. Προσθήκη 1 μl NaF (αναστολέας φωσφατασών Ser/Thr) και 1 μl αναστολέα πρωτεασών ανά 100 μl RIPA . Ομογενοποίηση αρχικά με ειδικό γουδοχέρι και φιλτράρισμα με βελόνες 23G και 27G έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως ο ιστός.
- Το ομογενοποίημα αφήνεται για 15 min στους 4°C.
- Φυγοκέντρηση στις 13.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C. Απόρριψη ιζήματος και μεταφορά σε νέο σωληνάριο.

ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΙΒΑΞΗΣ

Πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) : 2,5ml N,N-methylenebisacrylamide (Bis) - 3ml Tris-HCl pH: 8,8 - 38μl SDS 20% - 1,9ml dH₂O - 36μl 10% APS - 5μl TEMED

Πήκτωμα επιστίβαξης (stacking gel) : 660 μl 5ml N,N-methylenebisacrylamide (Bis) – 630 μl Tris-HCl pH: 6,8 – 25 μl SDS 20% - 3,6 ml dH₂O – 25 μl 10% APS – 5 μl TEMED

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΦΟΡΤΩΣΗ ΤΟΥΣ ΣΤΟ GEL

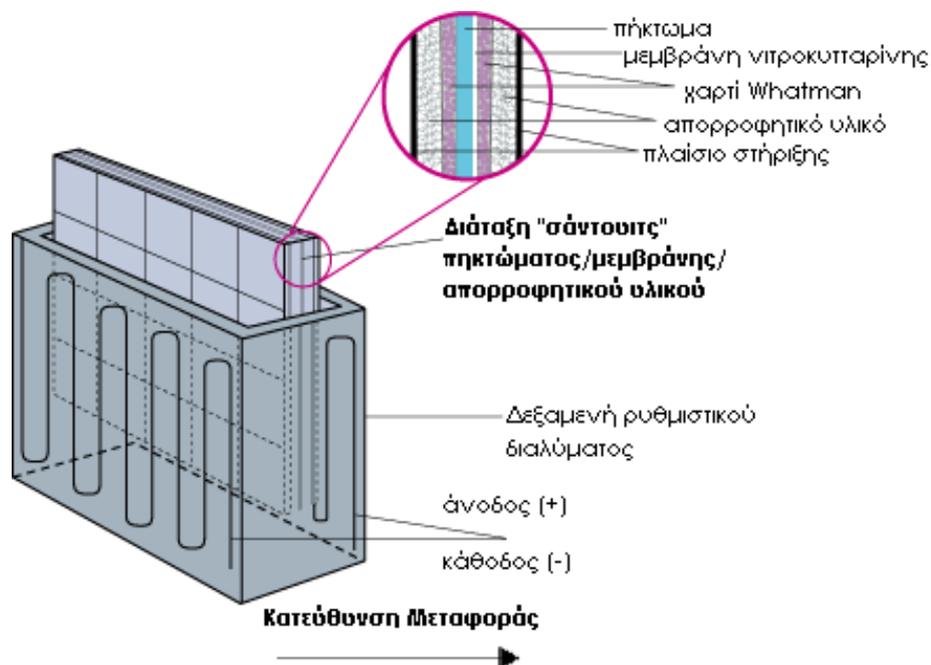
- Προσθήκη 6x χρωστικής φορτώματος (loading dye)/δείγμα (περιέχει β-μερκαπταθανόλη για τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών) και θέρμανσή τους για 5 λεπτά στους 70°C για να αποδιαταχθούν οι πρωτεΐνες.
- Φόρτωση του δείκτη (ladder) και των δειγμάτων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10%.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Τρέξιμο του πηκτώματος στα 90V για 2,5 ώρες μέσα σε συσκευή που περιέχει διάλυμα ειδικό για την ηλεκτροφόρηση (running buffer). Οι αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες (λόγω του SDS) κινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο και διαχωρίζονται σύμφωνα με το μοριακό τους βάρος μέσα στο πορώδες πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΑΠΟ ΤΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

- Η τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτρομεταφοράς γίνεται ανάμεσα σε δύο σφουγγαράκια που ανάμεσα τους έχουν δύο διηθητικά χαρτιά Whatman και ανάμεσα τους βρίσκεται η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης προσανατολισμένη στο θετικό πόλο και το πήκτωμα στον αρνητικό (Εικ. 31). Όλα είναι εμβαπτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer). Η επαφή μεταξύ του πηκτώματος και της μεμβράνης πρέπει να είναι άμεση χωρίς την παρεμβολή φυσαλίδων που παρεμποδίζουν τη διέλευση του ηλεκτρικού ρεύματος.
- Προσθήκη διαλύματος μεταφοράς στη συσκευή (η οποία βρίσκεται μέσα σε πάγο) και μεταφορά στα 300 mA για 90 λεπτά (ο χρόνος διαφέρει ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που πρόκειται να μεταφερθούν).



Εικόνα 31 : Διαδικασία μεταφοράς πρωτεϊνών από πηκτή πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

ΟΠΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΤΗΝ ΜΕΜΒΡΑΝΗ

Για την επιβεβαίωση της επιτυχούς μεταφοράς των πρωτεϊνών στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνεται χρώση (για 3 λεπτά) με Ponceau Red το οποίο βάφει όλες τις πρωτεΐνες

- Εκπλύσεις με dH₂O για 5 λεπτά
- Εκπλύσεις με TBST 1x για 5 λεπτά

ΕΠΩΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΜΒΡΑΝΗΣ ΜΕ ΓΑΛΑ

Για την αποφυγή μη ειδικής πρόσδεσης των αντισωμάτων γίνεται επώαση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση) σε 5% (w/v) γάλα σε TBST 1x.

ΕΠΩΑΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- Αφαίρεση του παραπάνω διαλύματος και τοποθέτηση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης σε γάλα 5% (w/v) το οποίο περιέχει την προτεινόμενη από την εταιρία παρασκευής αραιώση του πρωτογενούς αντισώματος, νυχτερινή επώαση στους 4°C.
- 3 εκπλύσεις με TBST 1x σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση) X 15 min

ΕΠΩΑΣΗ ΤΟΥ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΟΥΣ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

- Επώαση της μεμβράνης με γάλα 5% το οποίο περιέχει την προτεινόμενη από την εταιρία παρασκευής αραιώση του δευτερογενούς αντισώματος για 90 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση)
- 3 εκπλύσεις με TBST 1x σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση) X 15 min

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

- Προσθήκη 1ml του διαλύματος ενισχυμένης χημειοφωταύγειας για 3,5 λεπτά στο σκοτάδι.

Εμφάνιση φωτογραφικού φιλμ σε σκοτεινό θάλαμο (ο χρόνος εμφάνισης ποικίλλει ανάλογα με την πρωτεΐνη που ανιχνεύεται).

ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΥ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΟΣ

Για να ποσοτικοποιηθεί η πρωτεΐνη που υπάρχει σε κάθε ζώνη, γίνεται πρώτα αφαίρεση του πρώτου αντισώματος της μεμβράνης και έπειτα επώαση με αντίσωμα ειδικό για ένα ενδογενές υπόστρωμα όπως π.χ. ακτίνη:

- Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα για αφαίρεση του πρώτου αντισώματος για 10 λεπτά στους 60°C (σε απαγωγό)
- 5 εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBST 1x σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση)
- Επώαση της μεμβράνης για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (με συνεχή ανάδευση) σε 5% (w/v) γάλακτος σε TBST 1x.

- Επώαση της μεμβράνης σε γάλα 5% (w/v) που περιέχει την προτεινόμενη από την εταιρία παρασκευής αραίωση του αντισώματος, O/N στους 4°C

Για τα πειράματα της παρούσας διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντισώματα και υλικά : αντι-P-eif2a (Cell Signaling # 9721) σε αραίωση 1:300, αντι-BiP (Cell Signaling # 3177) και αντι-β-ακτίνη (Abcam # ab8227) σε αραίωση 1:1000. Χρησιμοποιήθηκαν δευτερογενή αντισώματα συζευγμένα με υπεροξειδάση (Dako) σε αραίωση 1:5000. Η ανίχνευση των ανοσοδραστικών ζωνών έγινε με το Supersignal West Femto (Thermo scientific). Οι σχετικές ποσότητες πρωτεΐνης αξιολογήθηκαν με ανάλυση πυκνομετρίας χρησιμοποιώντας το λογισμικό Image J. Χρησιμοποιήσαμε 3 ανεξάρτητα δείγματα για κάθε ομάδα και β-ακτίνη για την κανονικοποίηση.

Διαλύματα

RIPA διάλυμα (Radio Immuno Precipitation Assay buffer): 150 mM NaCl & 1.0% NP-40 0.5% sodium deoxycholate & 0.1% SDS & 50 mM Tris, pH 8.0

Διάλυμα γλυκίνης 10x: 1 λίτρο dH₂O - 30,2 gr Tris base & 144 gr γλυκίνης

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x: 100 mL διάλυμα μεταφοράς 10x - 10 mL SDS 10% - 890 mL dH₂O

Διάλυμα μεταφοράς 1x: 100ml 10x διάλυμα μεταφοράς & 200ml μεθανόλης και μέχρι το 1 Lt dH₂O.

Διάλυμα αφαίρεσης αντισωμάτων: Για 1000 ml: 15 gr γλυκίνης, 1 gr SDS, 10 mL Tween 20, pH 2.2, συμπλήρωση έως τα 1000 ml με απεσταγμένο νερό.

TBS 10x: Για 1Lt: 60 gr Tris- HCl & 87,5 gr NaCl & 14 gr Tris – Base

TBST: Για 1 L: 100 ml TBS 10x & 900 ml dH₂O & 1ml Tween20

3.10 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΟ ZEBRAFISH

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής (Jing, L., 2012) :

- Το έμβρυο τοποθετείται σε σωλήνα erpendorf
- Αφαιρείται όλη η ποσότητα νερού
- Προστίθενται 50μl διαλύματος λύσης και 1μl πρωτεΐνης K (10 mg/ml)
- Το erpendorf επωάζεται στους 55°C για 3ώρες, στους 98°C για 10 λεπτά και έπειτα στους 4°C για 10 λεπτά.

3.11 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΟΥΡΕΣ ZEBRAFISH

- ✓ Τοποθετούμε τα ψάρια σε δοχείο με διάλυμα αναισθητοποίησης (tricaine).
- ✓ Κόβουμε την ουρά
- ✓ Τοποθετούμε την ουρά σε διάλυμα λύσης 100 μl
- ✓ Επωάζουμε για 10 min στους 98°C
- ✓ Επωάζουμε για 5 min στους 4°C
- ✓ Προσθέτουμε πρωτεΐνη K 10 λ
- ✓ Επωάζουμε O/N στους 55°C
- ✓ Επωάζουμε για 10 min στους 98°C
- ✓ Επωάζουμε για 5 min στους 4°C

3.12 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΙΧΝΗΘΕΤΩΝ ΚΑΙ IN SITU ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Η τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης (ISH) αποτελεί μέθοδο μελέτης της έκφρασης γονιδίων και στηρίζεται στη δημιουργία ενός αντινοσηματικού ιχνηθέτη RNA σημασμένου με διγοξιγενίνη σε κάθε νουκλεοτίδιο που περιέχει ως βάση την ουρακίλη. Το προϊόν που προκύπτει εισάγεται σε κατάλληλο φορέα κλωνοποίησης και πραγματοποιείται μετασχηματισμός σε επιδεκτικά βακτηριακά κύτταρα, που χρησιμοποιούνται για στερεή καλλιέργεια παρουσία αντιβιοτικού. Οι σωστοί κλώνοι ακολούθως υποβάλλονται σε πέψη και αποτελούν το εκμαγείο για μεταγραφή ώστε να προκύψουν ανάλογα με τον προσανατολισμό ένωσης του προϊόντος της PCR στον πλασμιδιακό φορέα, δύο RNA σημασμένα με διγοξιγενίνη, από τα οποία το ένα θα έχει προσανατολισμό 5'→3' (νοηματικός ιχνηθέτης) και το άλλο 3'→5' (αντινοσηματικός ιχνηθέτης). Ο πρώτος χρησιμοποιείται ως μάρτυρας για τον έλεγχο της επιτυχίας της δοκιμασίας και της πιστοποίησης της ορθότητας του αποτελέσματος αυτής. Στη συνέχεια έμβρυα 48 hpf μονιμοποιούνται και υφίστανται κατάλληλη κατεργασία ώστε να εξαφανιστούν οι χρωματιστές κηλίδες (επιτυγχάνεται με επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 40 λεπτά και διάλυμα 3% H₂O₂/0.5% KOH) (Thisse, C. and Thisse, B., 2008). Έπειτα, εισάγονται σε αυτά οι ιχνηθέτες χρησιμοποιώντας συνθήκες που ευνοούν την ειδική υβριδοποίηση σε συμπληρωματικές αλληλουχίες mRNA στον ιστό ή τους ιστούς που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Μετά από εκπλύσεις απομακρύνονται οι ιχνηθέτες και τα υβρίδια ανιχνεύονται με ανοσοϊστοχημεία χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της διγοξιγενίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση και ένα χρωμογόνο υπόστρωμα.

Απομόνωση DNA από έμβρυο zebrafish

***In vitro* μεταγραφή για τη δημιουργία νοηματικού και αντινοσηματικού ιχνηθέτη.**

Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε σωληνάρια και η σύσταση για κάθε δείγμα ήταν η εξής:

Ευθύγραμμο DNA 7μl

Μίγμα T7 RNA πολυμεράσης 2μl

10x ρυθμιστικό διάλυμα μεταγραφής 2μl

Διάλυμα RNA-ιχνηθέτη 2μl

Αναστολέας RNAσών 1μl

Απιονισμένο νερό 6μl

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 2 ώρες σε επωαστικό θάλαμο στου 37°C Μετά την προσθήκη σε κάθε δείγμα 1μl TURBO DNAασης, τα δείγματα τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε επωαστικό θάλαμο στου 37°C. Οι ιχνηθέτες αποθηκεύθηκαν στους -20°C.

ΜΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Μονιμοποίηση εμβρύων (που έχουμε βγάλει από το χόριο) με 4% (v/v) παραφορμαλδεΐδη για 12ώρες στους 4°C

2 εκπλύσεις με PBS 1x σε θερμοκρασία δωματίου

2 εκπλύσεις με 100% MeOH

Φύλαξη των δειγμάτων στους -20°C

ΕΝΥΔΑΤΩΣΗ

ΠΡΟ-ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Βύθιση των εμβρύων σε 500μl preHYB+ για 3,5 ώρες στους 68°C

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Αφαίρεση της περισσότερης ποσότητας preHYB+ χωρίς τα έμβρυα να έρθουν σε επαφή με τον αέρα

Βύθιση των εμβρύων σε προθερμασμένο HYB+ που περιέχει 20-100 ng RNA ιχνηθέτη

Επώαση τους 68°C O/N

ΑΦΑΙΡΕΣΗ ΤΟΥ ΙΧΝΗΘΕΤΗ

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ

Επώαση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με PBT που περιέχει αντιδραστήριο (0,2% BSA & 2% ορού προβάτου) (blocking solution)

Προ-απορρόφηση του AP Fab fragment (anti-dioxigenin) σε ορού προβάτου για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Φυγοκέντρηση, απόρριψη ιζήματος και αραιώση 1/10 σε blocking solution

Βύθιση των δειγμάτων σε 0,5ml AP Fab σε blocking solution για 16 ώρες στους 4°C

4 ξεπλύματα των 25 λεπτών με PBS

3 ξεπλύματα των 5 λεπτών με διάλυμα χρώσης

Κατά τη διάρκεια του 3^{ου} ξεπλύματος μεταφορά των δειγμάτων σε 12 ή 24 well-plate.

Βύθιση των δειγμάτων σε 0,5 ml με 200μl NBT/BCIP ανά 10ml διάλυμα χρώσης (φιλτράρισμα πριν την χρήση γιατί δημιουργούνται σκόνες) και επώαση για 30 λεπτά έως 16 ώρες σε σκοτάδι.

Ξέπλυμα με PBS

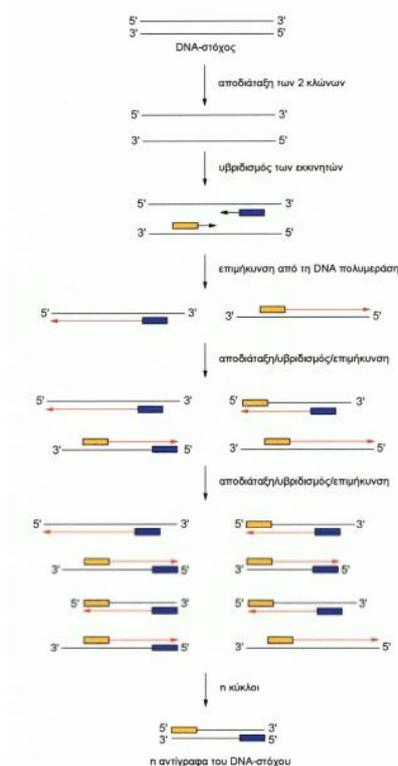
Καθαρισμός με γλυκερόλη

Μονιμοποίηση με 4%PFA για να σταματήσει η χρώση.

3.13 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) αναπτύχθηκε από τον Kary B. Mullis στη δεκαετία του 1980 και άρχισε να χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές μετά την αυτοματοποίησή της. Η τεχνική βασίζεται στη θερμοανθεκτικότητα της Taq DNA πολυμεράσης, ενός ενζύμου που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Με την PCR, επιτυγχάνεται ο εκθετικός πολλαπλασιασμός (από 10^6 - 10^9 φορές) ενός συγκεκριμένου τμήματος γονιδίου υπό την προϋπόθεση ότι είναι γνωστή η αλληλουχία του. Το γνωστό τμήμα της αλληλουχίας χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ένα για κάθε κλώνο της διπλής έλικας, που ονομάζονται εκκινητές (primers). Οι εκκινητές είναι μικρές αλληλουχίες νουκλεοτιδίων συμπληρωματικές με τα δύο απέναντι άκρα (5' και 3' άκρα) της περιοχής DNA που θα πολλαπλασιαστεί. Με βάση τα δύο αυτά μόρια η Taq DNA πολυμεράση ξεκινά την in vitro αντιγραφή και σύνθεση του DNA (Mullis et al, 1987). Η PCR περιλαμβάνει 20-40 επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών βασικών σταδίων: αποδιάταξη του DNA (denaturation), υβριδισμός των εκκινητών (annealing) και επιμήκυνση των δύο αλυσίδων (extension) (Εικ. 32). Στο πρώτο στάδιο γίνεται αποδιάταξη του δίκλωνου DNA σε υψηλή θερμοκρασία (συνήθως στους 95°C). Ακόλουθη μείωση της θερμοκρασίας (συνήθως στους 55-65°C) επιτρέπει στους εκκινητές να

υβριδοποιηθούν στη συμπληρωματική περιοχή του κάθε κλώνου του DNA. Η περιοχή σύνδεσης των εκκινητών αποτελεί το σημείο εκκίνησης για την Taq DNA πολυμεράση, η οποία αντιγράφει κάθε κλώνο προσθέτοντας τα συμπληρωματικά δεοξυνουκλεοτίδια με κατεύθυνση από το 5' στο 3' άκρο. Η αντιγραφή αυτή γίνεται στους 72-75°C, τη βέλτιστη θερμοκρασία δραστηριότητας του ενζύμου (Εικ. 32) (Alberts et al., 1994).



Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση της PCR. Με κόκκινο βέλος συμβολίζεται ο νέος κλώνος που συντίθεται σε κάθε νέο κύκλο.

Τα συστατικά και οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι οι ακόλουθοι:

Στόχος-μήτρα DNA (template): Η ποσότητα που χρησιμοποιείται για μία αντίδραση κυμαίνεται από 10-500 ng, ανάλογα με το αν ο στόχος DNA βρίσκεται σε πολλά ή λίγα αντίγραφα μέσα στο γονιδίωμα. Όταν η ποσότητα του DNA είναι μεγάλη (>1000 ng), υπάρχει πιθανότητα να ενισχυθούν προϊόντα-αλληλουχίες που δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο (non specific amplification). Επιπλέον, θα πρέπει, το DNA να μην είναι αποδομημένο (degraded) στην περιοχή του στόχου, ώστε να υπάρχει η δυνατότητα να πολλαπλασιαστεί αυτή η περιοχή και ταυτόχρονα να είναι υψηλής

καθαρότητας απουσία φαινολών, πολυσακχαριτών, EDTA ή άλλων χημικών που μπορούν να έχουν ανασταλτική επίδραση στην αντίδραση.

Εκκινητές (primers): Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές αντιπαράλληλης κατεύθυνσης, συμπληρωματικοί για κάθε μία αλυσίδα σε ποσότητα 10-50 pmol ανάλογα με τον όγκο και τις συνθήκες της αντίδρασης. Όταν η συγκέντρωση είναι πολύ υψηλή αυξάνεται η πιθανότητα να δημιουργηθούν μη ομόλογοι υβριδισμοί μεταξύ εκκινητή και DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία DNA τμημάτων που δεν αντιστοιχούν στα αναμενόμενα προϊόντα.

Συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου (Mg^{+2}): Από τη συγκέντρωση των ιόντων Mg εξαρτάται η εξειδίκευση της αντίδρασης. Συνήθως χρησιμοποιούνται συγκεντρώσεις μεταξύ 1-5 mM διαλύματος $MgSO_4$ ή $MgCl_2$. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία-στόχο του DNA. Αντίθετα, η πολύ χαμηλή συγκέντρωση μειώνει την απόδοση της αντίδρασης, διότι τα Mg^{+2} λειτουργούν ως συνένζυμο στη δράση της πολυμεράσης.

Δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs): Τα τέσσερα δεοξυνουκλεοτίδια dATP, dCTP, dGTP, dTTP είναι απαραίτητα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Είναι σημαντικό τα δεοξυνουκλεοτίδια να βρίσκονται σε ίση συγκέντρωση μεταξύ τους, ώστε να μη γίνονται λάθη κατά την αντιγραφή του στόχου DNA. Η συγκέντρωσή τους πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-200 μM .

Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης (10X buffer): Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιείται συνήθως σε τελική συγκέντρωση 1X και έχει σκοπό τη δημιουργία ιοντικού περιβάλλοντος το οποίο να διευκολύνει τόσο τη σταθεροποίηση των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο όσο και τη δράση της πολυμεράσης.

Πολυμεράση (polymerase): Το ένζυμο πολυμερισμού που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο είναι η θερμοανθεκτική Taq DNA πολυμεράση. Το προαναφερόμενο ένζυμο δρα στους 68-72°C και δεν καταστρέφεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης. Η συγκέντρωσή του στην αντίδραση εξαρτάται τόσο από τον όγκο της αντίδρασης όσο και την ίδια την εφαρμογή. Θα πρέπει όμως να τονιστεί ότι η πολύ υψηλή συγκέντρωση ενζύμου δρα ανασταλτικά.

Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Τα γραμμικά μόρια DNA μετακινούνται σε πήκτωμα αγαρόζης υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου με ταχύτητα ανάλογη του μεγέθους τους. Η πυκνότητα του πηκτώματος καθώς και η εφαρμοζόμενη τάση πεδίου (volts/cm πηκτώματος)

ρυθμίζονται με βάση τα μεγέθη των μορίων που θα διαχωριστούν. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τους παρακάτω παράγοντες :

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά και δίκλινα DNA κινούνται με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του δεκαδικού λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους.
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίζουμε μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

<i>% Αγαρόζης στο πήκτωμα</i>	<i>Καλός διαχωρισμός γραμμικών DNA (Kb)</i>
0,3	60 - 5
0,6	20 - 1
0,7	10 - 0,9
0,8	7 - 0,5
0,9	6 - 0,4
1,2	4 - 0,2
2,0	3 - 0,1

- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους δεν έχουν την ίδια ηλεκτροφορητική κινητικότητα σε πηκτώματα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I.

- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (μικρή ένταση) η κινητικότητα των γραμμικών DNA είναι ανάλογη της εφαρμοζόμενης τάσης. Μεγαλύτερη αύξηση της τάσης σηματοδοτεί αύξηση της κινητικότητας των μεγάλων τμημάτων DNA με διαφορετικό συντελεστή για το καθένα. Γι' αυτό το λόγο μειώνονται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης καθώς αυξάνεται η εφαρμοζόμενη τάση (Sambrook et al., 1989).

Η διαδικασία παρασκευής έχει ως εξής:

1. Προσθήκη 1,0 g (1%) αγαρόζης σε 100 ml διαλύματος 1X TAE (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA, pH 8) που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Η τήξη της αγαρόζης πραγματοποιείται με βρασμό για περίπου 2 λεπτά σε φούρνο μικροκυμάτων ισχύος 800 Watt. Στη συνέχεια αφήνεται μερικά λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Το διάλυμα της αγαρόζης τοποθετείται με προσοχή στη μήτρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης, ώστε να σχηματιστεί το πήκτωμα.
3. Εφαρμόζεται η κατάλληλη χτένα για το σχηματισμό των οπών φόρτωσης.

4. Το πήκτωμα σταθεροποιείται και μετά τη βύθισή του σε διάλυμα 1X TAE και αφαιρείται η χτένα.

5. Σε κάθε οπή τοποθετείται ποσότητα δείγματος που έχει αναμειχθεί με διάλυμα χρωστικής για την καταβύθισή του. Στην πρώτη οπή φόρτωσης τοποθετείται κατάλληλος δείκτης μοριακού βάρους.

6. Τα ηλεκτρόδια συνδέονται στους υποδοχείς της συσκευής και ρυθμίζεται η τάση στα 80 V.

7. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα τοποθετείται σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να μπορούν να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν.

3.14 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΑΡΔΙΑ ZEBRAFISH ΚΑΙ

ΑΝΑΛΥΣΗ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΜΕ RT-PCR

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης απομονώθηκε ολικό RNA από καρδιακό ιστό και αποτιμήθηκε η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR)

3.14.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΙΣΤΟΥΣ

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιείται με τη χρήση φαινόλης και βασίζεται στην εξής αρχή: οι πρωτεΐνες φέρουν υδρόφοβες περιοχές στις οποίες δεσμεύεται η φαινόλη με αποτέλεσμα την αποδιάταξη και διαλυτοποίηση τους. Τα νουκλεϊκά οξέα, τα οποία φέρουν λιγότερες υδρόφοβες ομάδες, δεν επηρεάζονται και παραμένουν στην υδατική φάση. Η διαδικασία απομόνωσης είναι η εξής (Bird, 2005):

- Απομονωμένες καρδιές zebrafish (με τον τρόπο που έχει αναφερθεί παραπάνω) μεταφέρονται σε αποστειρωμένα πλαστικά σωληνάρια τύπου erpendorf 1,5 ml τα οποία περιέχουν 0,5 ml διαλύματος φαινόλης με pH < 4,5 και ψύχονται σε υγρό άζωτο ώστε να μην έχουμε αλλοίωση των επιπέδων του RNA.
- Έπειτα αφού ξεπαγώσουμε την καρδιά την ομογενοποιούμε. Αρχικά χρησιμοποιούμε πλαστικού τύπου γουδοχέρι για να κονιορτοποιηθεί ο ιστός και στη συνέχεια χρησιμοποιούμε βελόνες 23G, 27G και 30G για την καλύτερη ομογενοποίηση. Αφήνουμε για 5 λεπτά σε RT τα δείγματά μας.
- Σε κάθε σωλήνα προστίθεται υποπενταπλάσιος όγκος χλωροφορμίου σε σχέση με τον όγκο της φαινόλης. Ακολουθεί ανάδευση σε αναδευτήρα τύπου Vortex για

15 sec, επώαση στον πάγο για 15 λεπτά και φυγοκέντρηση για 15- 20 min στους 4°C στις 13.000 στροφές. Σε αυτό το στάδιο γίνεται διαχωρισμός πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.

- Η υδατική φάση, η οποία περιέχει τα νουκλεϊκά οξέα, απομακρύνεται και μεταφέρεται σε σωληνάκι το οποίο περιέχει διπλάσιο όγκο ισοπροπανόλης σε σχέση με αυτόν του χλωροφορμίου. Σε αυτό το στάδιο γίνεται καταβύθιση του RNA. Τα δείγματα επωάζονται για 20 λεπτά στους 4°C και φυγοκεντρούνται ακολούθως για 20 λεπτά στους 4°C στις 13.000 στροφές.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα πλένεται με 1ml διαλύματος 75% αιθανόλης σε DEPC-H₂O. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C στις 13.000 στροφές.
- Έπειτα, το υπερκείμενο διάλυμα αιθανόλης αφαιρείται και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και διαλύεται σε 20 - 30 μl νερού που δεν περιέχει RNAσες και DNAσες.
- Στα δείγματα προστίθεται 1μl TurboDNase I και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Η Dnase I σπενεργοποιείται στους 75 °C για 10 λεπτά.
- Τα δείγματα φωτομετρούνται με χρήση νανοφωτόμετρου για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής τους σε RNA.

Η καθαρότητα του δείγματος από προσμίξεις πρωτεϊνών ελέγχεται με τη φωτομέτρηση στα 280 nm και ικανοποιητικά καθαρό δείγμα θεωρείται αυτό για το οποίο ισχύει η σχέση $OD\ 260\ nm / OD\ 280\ nm = 1,6-2$. Επειδή το RNA είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη δράση RNAσών, χρησιμοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας αποστειρωμένα γυαλικά και σωληνάρια.

3.14.2 ANΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗ (REVERSE TRANSCRIPTION)

Η αντίστροφη μεταγραφάση ανακαλύφθηκε το 1970 από τον Howard Tenim και ταυτόχρονα και ανεξάρτητα, από τον David Baltimore. Για την ανακάλυψή τους μοιράστηκαν το Νόμπελ Ιατρικής το 1975.

Κατά την αντίστροφη μεταγραφή, το RNA μεταγράφεται σε cDNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Το RNA επωάζεται παρουσία ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών (random primers), τα οποία αποτελούν τα πρωταρχικά τμήματα και προσδένονται στο 3' άκρο του RNA. Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει ένα συμπληρωματικό μόριο DNA με αποτέλεσμα τη δημιουργία υβριδικών

μορίων RNA:cDNA. Αυτά αποδιατάσσονται σε υψηλή θερμοκρασία και με τη δράση του ενζύμου συντίθενται δίκλινα μόρια DNA. Συγκεκριμένα:

- Σε σωληνάκι τύπου erpendorf, προστίθενται :
 - 1 µg RNA
 - 2 µl διαλύματος τυχαίων εκκινητών συγκέντρωσης 3 µg/µl
 - ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 7 µl
- Το δείγμα εισάγεται στη συσκευή PCR και επωάζεται για 5 min στους 75°C.
- Παράλληλα ετοιμάζεται σε άλλο σωλήνα erpendorf το εξής διάλυμα:
 - 5 µl 5x Ρυθμιστικό διάλυμα αντίστροφης μεταγραφάσης
 - 4 µl dNTPs 5mM
 - 2 µl DTT 100mM
 - 1 µl αντίστροφη μεταγραφάση
 - 1 µl διαλύματος με αναστολείς ριβονουκλεασών
- Το διάλυμα αυτό προστίθεται στο δείγμα μετά το τέλος της επώασης για 5 λεπτά, στους 75°C και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 20 µl.

Το ακριβές πρόγραμμα της αντίστροφης μεταγραφής είναι το παρακάτω:

- 75°C για 5 min
- 23°C για 10 min
- 42°C για 45 min
- 95°C για 10 min

3.14.3 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΧΡΟΝΟ (REAL TIME PCR)

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η παρακολούθηση της αντίδρασης PCR σε πραγματικό χρόνο (Jing, 2011). Στη συγκεκριμένη μέθοδο ένα ειδικό ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής ιχνηθετείται στο 5' άκρο του με ένα φθορίζον μόριο-ανταποκριτή (reporter molecule) και στο 3' άκρο του με ένα μόριο-αποσβέστη (quencher molecule). Όταν κατά την PCR οι εκκινητές συνδέονται με την αλληλουχία-στόχο, τότε το ολιγονουκλεοτίδιο-ανιχνευτής καταστρέφεται από την DNA πολυμεράση, λόγω της ταυτόχρονης δράσης της ως 5-εξωνουκλεάσης. Μέσω της δράσης αυτής απομακρύνεται το φθορίζον μόριο-ανταποκριτής από το μόριο-αποσβέστη με αποτέλεσμα την παρουσία σήματος φθορισμού, το οποίο και αυξάνεται ανάλογα με την αρχική ποσότητα του DNA στο δείγμα. Υπάρχουν αρκετές διαφορετικές προσεγγίσεις για τον προσδιορισμό της ποσότητας του προϊόντος της PCR που υπάρχει στο τέλος κάθε κύκλου, αλλά όλες βασίζονται στην ανίχνευση μιας

φθορίζουσας ετικέτας (tag), η οποία συνδέεται σε κάθε μόριο που συντίθεται. Στα πειράματά μας χρησιμοποιήσαμε ως φθορίζουσα ετικέτα την SYBRGreen η οποία εισχωρεί στις αύλακες του δίκλωνου DNA.

Η οργανολογία που χρησιμοποιήσαμε ήταν αυτή της Applied Biosystem 7000. Στο μηχάνημα αυτό η εκτέλεση της αντίδρασης PCR γίνεται σε ειδικές πλάκες (MicroAmpOptical 96-well Reaction Plate) και ο παραγόμενος φθορισμός από κάθε αντίδραση παρακολουθείται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Εκτός από το πλεονέκτημα της σημαντικής μείωσης του χρόνου για την ολοκλήρωση της αντίδρασης, η τεχνολογία αυτή επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των αρχικών DNA-στόχων, μέσω υπολογισμού του κύκλου εκείνου όπου πρωτοεμφανίζεται ανιχνεύσιμο προϊόν (Ct, threshold cycle). Οι συνθήκες για την αντίδραση PCR ήταν 2 λεπτά στους 50°C, 5 λεπτά στους 95°C και ακολούθησε PCR δύο σταδίων για 40 κύκλους, που αποτελούνται από 15 s στους 95°C και 1 λεπτό στους 60°C. Τα δεδομένα PCR σε πραγματικό χρόνο μετατράπηκαν σε γραμμικά δεδομένα με υπολογισμό τιμών $2^{-\Delta Ct}$. Σαν γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το 18S γιατί δεν επηρεάζεται από την μεταλλαγή και έχει επιλεγεί και σε παρόμοιες ερευνητικές εργασίες που σχετίζονται με την υπερτροφία (Sun et al., 2009)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να ανιχνεύσουμε τα επίπεδα mRNA σημαντικών γονιδίων που εμπλέκονται στο μηχανισμό της μεγαλοκαρδίας. Οι εκκινητές για τα γονίδια που μελετήθηκαν αναγράφονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα (Πίν. 2).

gene	Fw primer	Rev primer
nppa	5'-aagcaaaagcttgctctgg	5'-actgtatccgcatattgcagc
nppb	5'-cattcccgtagtcggccttc	5'-cttcaatattgcccgcctttac
18s	5'-cacttgctccctctaagaagttgca	5'-ctgctcttcagctcgggttt

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη

3.15 ΠΕΨΗ DNA ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα βακτηριακής προέλευσης που έχουν τη δυνατότητα να διασπούν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις, αφού

αναγνωρίσουν μικρού μεγέθους χαρακτηριστικές αλληλουχίες. Για το λόγο αυτό παρομοιάζονται με «μοριακά ψαλίδια».

Η φυσιολογική λειτουργία των περιοριστικών ενδονουκλεασών είναι η προστασία των βακτηρίων από παθογόνους οργανισμούς, κυρίως βακτηριοφάγους. Οι ενδονουκλεάσες των βακτηρίων διασπούν τις αλληλουχίες DNA του «εισβολέα». Το DNA του βακτηρίου προστατεύεται από τη δράση τους μεθυλιώνοντας το DNA του στις θέσεις ανγνώρισης των ενδονουκλεασών του με τη βοήθεια ειδικών μεθυλτραφερασών. Η τροποποίηση του DNA με την προσθήκη μεθυλομάδων εμποδίζει την πέψη του από τις ενδονουκλεάσες.

Η περιγραφή του συστήματος περιοριστικών ενδονουκλεασών ενζύμων τροποποίησης του DNA σαν αμυντικού μηχανισμού των βακτηρίων έγινε το 1965 από τον Werner Arber, εργασία για την οποία τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1978. (Arber W., 1965).

Μια μονάδα (U, unit) περιοριστικής ενδονουκλεάσης είναι η ποσότητα εκείνη του ενζύμου που οδηγεί σε πλήρη πέψη 1 μg καθαρού DNA σε 60' κάτω από τις συνιστώμενες συνθήκες επώασης.

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διαφέρουν ως προς τις βέλτιστες συνθήκες δράσης τους:

- Τη θερμοκρασία επώασης
- Το χρόνο επώασης
- Τη σύσταση του διαλύματος επώασης

Διαλύματα επώασης : Τα διαλύματα επώασης περιέχουν συνήθως MgCl₂, NaCl ή KCl, Tris-HCl, 2-μερκαπτοαιθανόλη (2-ME) ή Δι-Θειο-Θειτρόλη (DTT) και αλβουμίνη ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA). Ένα δισθενές κατιόν, συνήθως Mg⁺⁺, είναι απαραίτητο για την ενζυμική δραστηριότητα. Οι δισουλφιδικοί παράγοντες (2-ME ή DTT) χρησιμοποιούνται προκειμένου να σταθεροποιήσουν το ένζυμο ενώ το Tris-HCl προκειμένου να διατηρήσει τις βέλτιστες συνθήκες pH για τη δράση του ενζύμου.

Τα απαραίτητα υλικά για την προετοιμασία της αντίδρασης είναι:

- Δείγμα DNA διαλυμένο σε H₂O
- 10X διάλυμα επώασης
- Περιοριστική ενδονουκλεάση
- H₂O

Για την προετοιμασία αντίδρασης πέψης τελικού όγκου 20 μl ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

1. Η διαδικασία πραγματοποιείται διατηρώντας την ενδονουκλεάση και το διάλυμα επώασης σε πάγο. Τοποθετούμε τις παρακάτω ποσότητες αντιδραστηρίων σε σωληνάρια πολυπροτυλενίου (τύπου erpendorf):
 - χ μl DNA (διαλυμένο σε H₂O ή TE)
 - 2 μl 10X διαλύματος επώασης
 - 18-χ μl H₂O
2. Προσθέτουμε περιοριστική ενδονουκλεάση (1-5U/μg DNA). Ο όγκος του διαλύματος της περιοριστικής ενδονουκλεάσης δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, επειδή η γλυκερόλη που περιέχεται στο διάλυμα αποθήκευσης του ενζύμου μπορεί να προκαλέσει αναστολή της αντίδρασης.
3. Αναδεύουμε και τοποθετούμε το δείγμα στο υδατόλουτρο ή σε μηχανήμα PCR, ώστε να επωαστεί στις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας για το κατάλληλο χρονικό διάστημα (συνήα 1 ώρα στους 37°C).
4. Διακόπτουμε την αντίδραση. Αυτό μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους:
 - Δεσμεύοντας τα κατιόντα Mg⁺⁺ με την προσθήκη διαλύματος 0.5μl EDTA 0.5M. Η μέθοδος αυτή δεν προτιμάται όταν το DNA θα χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω ενζυμικές αντιδράσεις.
 - Απενεργοποιώντας το περιοριστικό ένζυμο με θέρμανση στους 65°C για 10'. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να απαιτηθεί η θέρμανση στους 75°C για 15'.
 - Καθαρίζοντας το DNA από το μείγμα της αντίδρασης με φαινόλη και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
5. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολουθεί ηλεκτροφόρηση σε αγαρόζη και μελέτη των χαρακτηριστικών θραυσμάτων που παράχθηκαν. (Bloch et al., 2001)

3.16 ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΛΙΓΑΣΗΣ

Το ένζυμο T4 DNA λιγάση χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή ανασυνδυσμένου DNA για τη συνένωση δύο τμημάτων δίκλωνου DNA. Καταλύει το σχηματισμό ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού μεταξύ της 3'-OH ομάδας στο άκρο της μιας αλυσίδας και της 5'-φωσφορικής ομάδας στο άκρο της άλλης αλυσίδας. Συγκεκριμένα, η λιγάση χρησιμοποιήθηκε για την εισαγωγή ξένου DNA στο DNA-φορέα κατά την κατασκευή ανασυνδυσμένων πλασμιδίων (Sambrook et al., 1989). Πριν την αντίδραση, πλασμίδιο και ξένο DNA διασπάστηκαν με τα ίδια

περιοριστικά ένζυμα ώστε να δημιουργηθούν κολλώδη άκρα. Οι αντιδράσεις λιγάσης έγιναν σε τελικό όγκο 20-30 μl που περιείχε 40 mM Tris-HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP, 40-60 ng πλασμιδίου και την κατάλληλη ποσότητα ξένου DNA. Το ίδιο μίγμα αντίδρασης απουσία ξένου DNA χρησιμοποιήθηκε ενδεικτικά για να διαπιστωθεί το ποσοστό του πλασμιδίου που επανακτά την κυκλική δομή του με τη βοήθεια της λιγάσης χωρίς την ενσωμάτωση του ξένου DNA. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει στους 16°C για 15 ώρες. Ακολούθησε θέρμανση στους 65°C για 10 min για την απενεργοποίηση του ενζύμου.

Οι αναλογίες πλασμιδίου:ξένου DNA που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 1:3 ή 1:5 ή 1:7. Η ποσότητα του ξένου DNA υπολογίστηκε με βάση τον τύπο:

$$\text{ng (ξένου DNA)} = \frac{\text{ng (πλασμιδίου-φορέα)} \times \text{bp (ξένου DNA)}}{\text{bp (πλασμιδίου-φορέα)}} \times \text{μοριακή αναλογία} \left(\frac{\text{ξένο DNA}}{\text{φορέας}} \right)$$

Η ενσωμάτωση του ξένου DNA στο φορέα ελέγχθηκε μέσω μετασχηματισμού δεκτικών κυττάρων *E.coli* με το προϊόν της αντίδρασης (Stryer L., 1997).

3.17 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ E. coli

Οι μέθοδοι για το μετασχηματισμό βακτηρίων στηρίζονται στις παρατηρήσεις των Mandel και Higa (Mandel και Higa, 1970) το 1970, οι οποίοι έδειξαν ότι βακτήρια που είχαν υποστεί κατεργασία με παγωμένο διάλυμα CaCl₂ και, στη συνέχεια, είχαν θερμανθεί για σύντομο χρονικό διάστημα, ήταν ικανά να επιμολυνθούν με DNA που υπήρχε στον βακτηριοφάγο λ. Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε, στη συνέχεια, και για το μετασχηματισμό βακτηρίων με πλασμιδιακό DNA (Cohen et al., 1972). Προκειμένου να γίνουν τα βακτήρια δεκτικά, απαιτείται συγκεκριμένη επεξεργασία που περιλαμβάνει την προσθήκη αλάτων και απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές στα βακτηριακά κύτταρα, γεγονότα που επηρεάζουν τη δομή και τη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, επιτρέποντας στα μόρια του DNA να περάσουν.

3.18 ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η διαδικασία που εφαρμόστηκε για το μετασχηματισμό των κυττάρων σε φορείς ανασυνδυασμένων πλασμιδιακών μορίων είναι η ακόλουθη (Sharma et al., 2017):

1. Τοποθέτηση των επιδεκτικών κυττάρων στον πάγο μέχρι τη χρησιμοποίησή τους.
2. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο (erpendorf) προστίθενται 2-10 μl από το προϊόν της αντίδρασης της λιγάσης και 100 μl από τα κύτταρα.
3. Ήπια ανάδευση και επώαση για 30 min στον πάγο.
4. Ακολουθεί θερμικό σοκ στους 42 °C για 45 sec.
5. Επώαση για 2 min στον πάγο.
6. Προσθήκη 900 μl θρεπτικού διαλύματος LB.
7. Επώαση στους 37 °C με ισχυρή ανακίνηση για 1 ώρα.
8. Φυγοκέντρηση στις 5000 στροφές για 2 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου
9. Επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων με την ποσότητα του διαλύματος που έχει απομείνει και άπλωμα του διαλύματος σε τρυβλία LB-agar αμπικιλίνης, τα οποία έχουν ήδη στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και αποστειρωθεί με υπεριώδη ακτινοβολία.
10. Επώαση για 12-18 ώρες σε κλίβανο στους 37 °C.
11. Λήψη των «θετικών» αποικιών που έχουν αναπτυχθεί για περαιτέρω ανάλυση

3.19 ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ

1. Τοποθετείται το καλούπι πυκνότητας 2% σε αγαρόζη για ενυδάτωση κάτω από τις βρύσες στο σύστημα.
2. Κόβεται η άκρη της βελόνας σε ιδανικό σημείο.

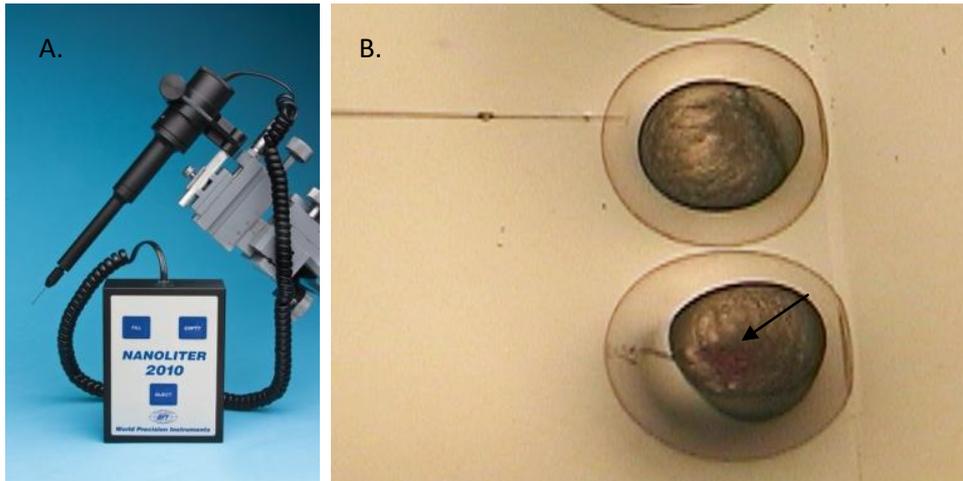
Καλό σημείο είναι εκεί που αρχίζει και παχαίνει η βελόνα και παρατηρούνται δύο τοιχώματα. Τίθεται το στερεοσκόπιο στην 30 μεγέθυνση →σε αυτή φαίνονται τα αυγά.

3. Ξεσφίγγεται το στόμιο του (μαύρο βιδωτό καπάκι). Τα λαστιχάκια συνήθως βρίσκονται μέσα.

Η σειρά που θα μπούν από πάνω προς τα κάτω είναι:

- μαύρο (με τις μικρές τρύπες)
 - λευκό (με την μικρή τρύπα προς τα πάνω)
 - μαύρο (με τις δύο μεγάλες τρύπες)
4. Πιέζεται το κουμπί του EMPTY μέχρι να κατέβει ολόκληρη η μεταλλική βελόνα και ακουστεί ο χαρακτηριστικός θόρυβος.
 5. Τοποθετούμε το πρώτο μαύρο λαστιχάκι μέχρι λίγο πιο κάτω από το σημείο που ξεκινά ο βραχίονας.
 6. Πιέζεται το κουμπί FILL μέχρις ότου έρθει το λαστιχάκι μέχρι πάνω.
 7. Γεμίζεται η βελόνα με ειδικό λάδι.
 8. Τοποθετείται στο μηχάνημα το λευκό λαστιχάκι με τη μεγάλη τρύπα προς τα κάτω.
 9. Εφαρμόζεται στη βελόνα (γυάλινη) το περιστρεφόμενο στόμιο και κατόπιν τοποθετείται και το μαύρο λαστιχάκι με τις μεγάλες τρύπες επάνω στη γυάλινη βελόνα.
 10. Εφαρμόζεται η βελόνα στο μηχάνημα.
 11. Σε ένα τρυβλίο τοποθετείται parafilm και τοποθετείται μια σταγόνα από το δείγμα
 12. Εμπλουτίζεται η βελόνα με το δείγμα κρατώντας συνέχεια πατημένο το FILL
 13. Επιστρέφεται ο βραχίονας στην ανώτερη θέση.
 14. Ρυθμίζεται ο όγκος έκχυσης στα 4,6 nl
 15. Διενέργεια μικροενέσεων στο στάδιο του ζυγωτού έως και το στάδιο των 2 κυττάρων (Τοποθετείται η βελόνα μέσα στο χόριο και προς την πλευρά που είναι ο ζωικός πόλος)

Στις επιτυχημένες μικροενέσεις παραμένει μια κόκκινη σταγόνα μέσα στο χόριο (Εικ. 33). Στις μη επιτυχημένες η χρωστική διαχέεται σχεδόν αμέσως και γίνεται από κίτρινη έως μη ορατή.



Εικόνα 33 : A. Το μηχάνημα με το οποίο πραγματοποιούνται οι μικροενέσεις B. Τα αυγά την ώρα που πραγματοποιούνται οι μικροενέσεις, απεικονίζεται η βελόνα και με το βέλος υποδεικνύεται μια πετυχημένη διαδικασία

3.20 ΣΥΣΤΗΜΑ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΕΝΕΣΗΣ CRISPR-CAS9

Το πρώτο βήμα για τη δημιουργία μιας CRISPR είναι ο προσδιορισμός της κατάλληλης αλληλουχίας-στόχου στο γονίδιο ενδιαφέροντος. Τα κριτήρια με τα οποία θα επιλεγεί αυτή η αλληλουχία είναι η θέση της σε σχέση με την κατάλληλη αλληλουχία PAM, η θέση της στο γονίδιο και η μοναδικότητα τους στο γονιδίωμα. Όπως προαναφέρθηκε, η ύπαρξη της αλληλουχίας NGG πλησίον της αλληλουχίας-στόχου αποτελεί βασική προϋπόθεση για τη λειτουργία του συστήματος. Η αλληλουχία-στόχος στο γονίδιο που μας ενδιαφέρει καθορίζει και το σημείο στο οποίο η πρωτεΐνη του γονιδίου αυτού θα παρεκκλίνει από τη φυσιολογική. Η μοναδικότητα των αλληλουχιών-στόχων στο γονιδίωμα αφορά στην αποφυγή παράπλευρων επιδράσεων των CRISPRs εκτός των επιθυμητών. Για να εξασφαλίσουμε την ειδικότητα της γονιδιωματικής τροποποίησης που επιχειρούμε να επιφέρουμε πρέπει η CRISPR που θα σχεδιάσουμε να μην μπορεί να δεσμευτεί πλησίον της αντίστοιχης αλληλουχίας PAM σε κανένα άλλο σημείο του γονιδιώματος, ή έστω σε καμία άλλη κωδικοποιούσα περιοχή. Για το σχεδιασμό CRISPRs που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια χρησιμοποιείται το λογισμικό ZiFit Targeter Version

4.2. Εφόσον επιτευχθεί επιλογή της κατάλληλης αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται ο σχεδιασμός των συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων, που μεταγραφόμενα στον κατάλληλο φορέα θα δώσουν το gRNA της επιθυμητής CRISPR. Θα παραχθεί το gRNA και το RNA της Cas9 και το μίγμα αυτών θα εισαχθεί σε έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου με μικροένεση. Επομένως, αφού το σύστημα εισαχθεί στα έμβρυα zebrafish όπως προαναφέρθηκε θα προκαλέσει τις DSB τομές στο γονίδιο-στόχο και θα οδηγήσει στη διαταραχή της αλληλουχίας του μέσω των μηχανισμών επιδιόρθωσης. Ορισμένα από τα κύτταρα στα οποία το γονίδιο-στόχος θα μεταλλαχθεί, θα είναι γαμέτες με αποτέλεσμα, μεγαλώνοντας τα έμβρυα και στη συνέχεια διασταυρώνοντας τα με έμβρυα άγριου τύπου, να μπορέσουμε να παρατηρήσουμε το φαινότυπο που προκύπτει από την απενεργοποίηση του γονιδίου-στόχου στην F0 γενιά (το σύστημα CRISPR μας δίνει τη δυνατότητα να παρατηρήσουμε το μεταλλαγμένο φαινότυπο και σε ορισμένα έμβρυα που έχουν υποστεί μικροένεση, γεγονός που οφείλεται στη μεγάλη διεισδυτικότητα των CRISPRs) αλλά και να δημιουργήσουμε ετερόζυγα zebrafish με μία μόνο τύπου μετάλλαξη στο επιθυμητό γονίδιο.

Σχεδιασμός και υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων

- Σχεδιάστηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια:

5' TAGGAGCAGTCGGGCACTGGTTCG 3',

5' TCGTCAGCCCGTGACCAAGCCAAA 3'

- **Υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων:**

Η αντίδραση που πραγματοποιήθηκε ήταν η εξής:

Ολιγονουκλεοτίδιο 1 (100μM) 2μl

Ολιγονουκλεοτίδιο 2 (100μM) 2μl

NEBbuffer 3.1 2μl

ddH₂O 14μl

Το δείγμα τοποθετήθηκε στους 95 °C για 5λεπτά και ακολούθως αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να φτάσει σε θερμοκρασία 25-30 °C σε heat block. Τέλος το δείγμα τοποθετήθηκε στους 4 °C.

Τοποθέτηση ολιγονουκλεοτιδίων σε φορέα κλωνοποίησης

Παρασκευάστηκε το διάλυμα που αποτελείται από :

Δίκλιωνα ολιγονουκλεοτιδία 1μl

T7-gRNA πλασμίδιο (400ng) 1 μl

NEB 3.1 10X 1μl

T4 διάλυμα λιγάσης 10X 1μl

BsmBI 0,5μl

BglII 0,3μl

Sall 0,3μl

T4 DNA λιγάση 0,5μl

ddH₂O 4,4μl

Το παραπάνω διάλυμα τοποθετήθηκε στις εξής θερμοκρασίες :

1. 3X (37 °C για 20λεπτά, 16 °C για 15 λεπτά) 37 °C
2. 37 °C για 10 λεπτά.
3. 55 °C για 15 λεπτά.
4. 80 °C για 15λεπτά.

Έπειτα από τη δημιουργία του πλασμιδίου με τα επιθυμητά ολιγονουκλεοτίδια, το εισάγουμε σε κύτταρα DH5α και πραγματοποιούμε διαγνωστική πέψη με το περιοριστικό ένζυμο BglII. Τέλος, με το περιοριστικό ένζυμο BAmHI μετατρέπουμε το πλασμίδιο σε ευθύγραμμο για να πραγματοποιηθεί η *in vitro* μεταγραφή.

Μικροένεση του μείγματος gRNA της CRISPR και του mRNA της Cas9

Το μείγμα του gRNA της CRISPR και του mRNA της Cas9 εισάγεται στα έμβρυα zebrafish στο στάδιο του ενός κυττάρου μέσω μικροένεσης.

Το μείγμα είναι το εξής:

gRNA-CRISPR 100ng/μl

mRNA Cas9 150ng/μl

KCL 120 mM

Hepes pH 7.0 20 mM

1μl φαινόλης προστέθηκε σε 4μl του παραπάνω μείγματος

Έλεγχος μετάλλαξης εξωνίου 2

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εκκινητές για να πραγματοποιηθεί PCR και να σταλεί το προϊόν για αλληλούχιση.

fkbp5_exon2_fw TGCATGCACATTTGAGCTTGT
fkbp5_exon2_re GGAGCGCAGTGTCTTTTGG

θερμοκρασία επιμήκυνσης 60°C

3.21 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΠΟΥ ΕΜΠΕΡΙΕΧΕΙ ΤΗΝ SSRE

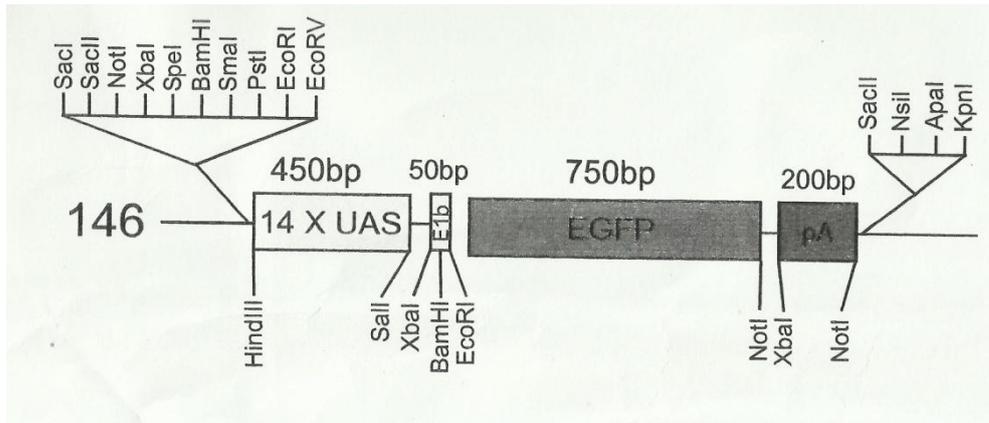
ΔΟΜΗ

Ο σκοπός είναι να δημιουργηθεί η παρακάτω δομή που εμπεριέχει το συνθετικό υποκινητή, το μέρος του υποκινητή που εμπεριέχει το TATA box, το γονίδιο αναφοράς που είναι το eGFP και η απαραίτητη poly A δομή για την τελική πρωτεΐνη (Εικ. 34).



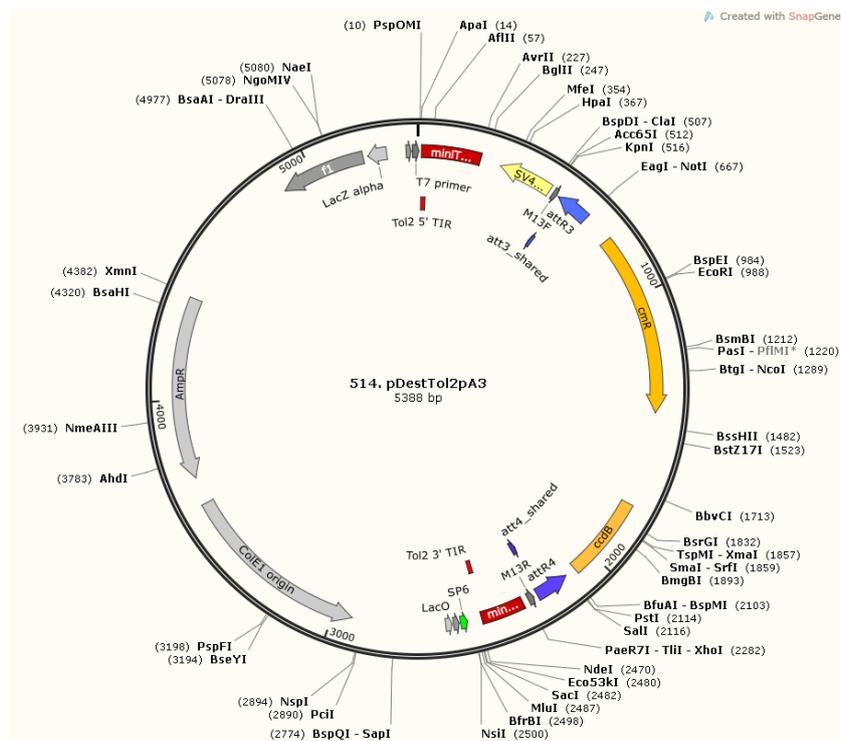
Εικόνα 34: Απεικόνιση της δομής που δημιουργήθηκε για να αποκρίνεται στην αλλαγή της διατμητικής τάσης : αποτελείται από 8 επαναλήψεις αλληλουχιών, (οι οποίες αποτελούν θέσεις όπου δεσμεύονται μεταγραφικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με την απόκριση στην αλλαγή της διατμητικής τάσης), το μέρος του υποκινητή που εμπεριέχει το TATA box, το γονίδιο αναφοράς που είναι το eGFP και η απαραίτητη poly A δομή για την τελική πρωτεΐνη. Επιπλέον έχουν προστεθεί στοιχεία του συστήματος Tol2 για αύξηση της απόδοσης της διαγένεσης.

Η SSRE δομή θα εισαχθεί στο παρακάτω πλασμίδιο (Εικ. 35)



Εικόνα 35: απεικόνιση του πλασμιδίου το οποίο χρησιμοποιήθηκε σαν βάση για τη δημιουργία των SSRE.

Όμως για να βελτιώσουμε το ποσοστό διαγένεσης θα χρησιμοποιήσουμε το σύστημα tol2 μεταθεσών. Τα tol2 άκρα θα τα εξάγουμε από το εξής πλασμίδιο : (Εικ. 36)



Εικόνα 36 : απεικόνιση πλασμιδίου από το οποίο εξήχθησαν τα tol2 άκρα

Για να απομονωθεί το 5' tol2 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι έφεραν στα άκρα τους και τις αλληλουχίες για τα περιοριστικά ένζυμα SpeI και PstI με σκοπό να μπορούν να εισαχθούν στο 146 πλασμίδιο στο 5'. Αυτό πραγματοποιήθηκε με αντίδραση λιγάσης αφότου πριν απομονώθηκε με PCR το 5' tol2.

Κατά αντίστοιχο τρόπο για το 3' tol2 χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές οι οποίοι έφεραν στα άκρα τους και τις αλληλουχίες για τα περιοριστικά ένζυμα ApaI και KpnI με σκοπό να εισαχθούν στο 146 πλασμίδιο στο 3'. Έπειτα με PCR και αντίδραση λιγάσης πραγματοποιήθηκε η ενσωμάτωση στο 146 πλασμίδιο.

Για να ολοκληρωθεί η δημιουργία του τελικού πλασμιδίου για κάθε ένα από τα 3 SSRE έγινε αποκοπή στο 146 πλασμίδιο της περιοχής 14X UAS και προστέθηκαν τα παρακάτω ολιγονουκλεοτίδια που φέρουν τις κατάλληλες αλληλουχίες για κάθε SSRE (όπως έχουν προκύψει από τη βιοπληροφορική ανάλυση). Για να επιτευχθεί η αντικατάσταση, στα ολιγονουκλεοτίδια ενσωματώθηκαν άκρα για τα περιοριστικά ένζυμα PstI και Sall και πραγματοποιήθηκε αντίδραση λιγάσης .

SSRE1 ολιγονουκλεοτίδιο1:

TAAGCACTGCAGMACACACAGTMACACACAGTMACACACAGTMACACACAGTM
ACACACAGTMACACACAGTMACACACAGTMACACACAGTGTCGACTAAGC

ολιγονουκλεοτίδιο2:

GCTTAGTCGACACTGTGTGKACTGTGTGKACTGTGTGKACTGTGTGKACT
GTGTGKACTGTGTGKACTGTGTGKACTGTGTGKCTGCAGTGCTTA

SSRE2 ολιγονουκλεοτίδιο 1

TAAGCACTGCAGGGGGGAAACTGGGGGAAACTGGGGGAAACTGGGGGAAACT
GGGGGAAACTGGGGGAAACTGGGGGAAACTGGGGGAAAGTGTTCGACTAAGC

ολιγονουκλεοτίδιο2

GCTTAGTCGACACTTTCCCCAGTTTCCCCAGTTTCCCCAGTTTCCCCAGT
TTCCCCAGTTTCCCCAGTTTCCCCAGTTTCCCCCTGCAGTGCTTA

SSRE3 ολιγονουκλεοτίδιο1

TAAGCACTGCAGCAGCRGATGCAGCRGATGCAGCRGATGCAGCRGATGCAGC
RGATGCAGCRGATGCAGCRGATGCAGCRGATGGTGTCTGACTAAGC

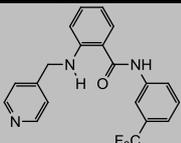
ολιγονουκλεοτίδιο2

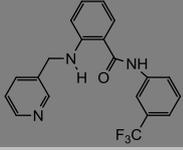
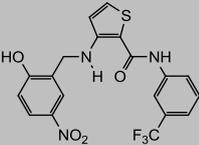
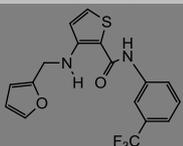
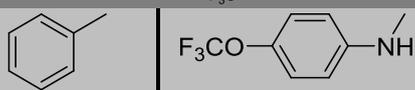
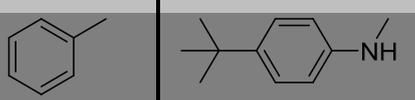
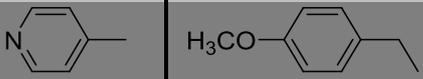
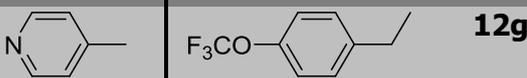
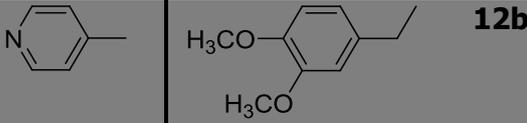
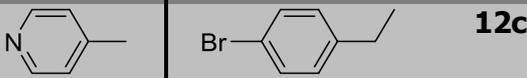
GCTTAGTCGACACCATCYGCTGCATCYGCTGCATCYGCTGCATCYGCTGCATCY
GCTGCATCYGCTGCATCYGCTGCATCYGCTGCTGCAGTGCTTA

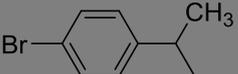
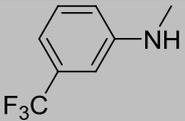
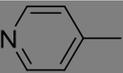
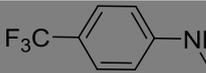
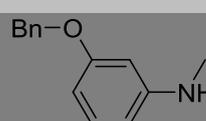
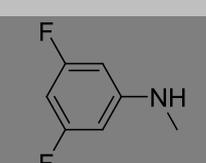
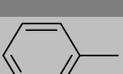
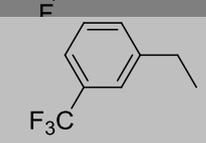
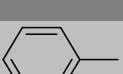
3.22 ΧΗΜΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ – ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

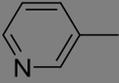
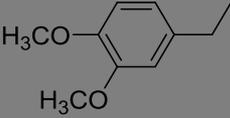
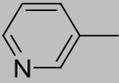
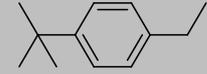
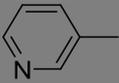
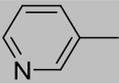
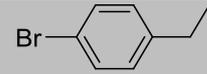
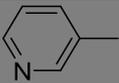
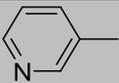
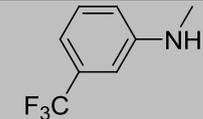
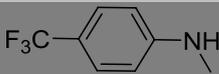
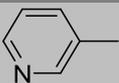
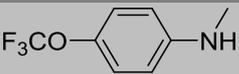
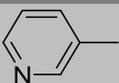
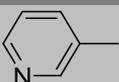
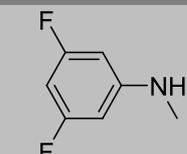
Σκοπός του χημικού γενετικού ελέγχου, όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, είναι η ανίχνευση μορίων αναστολέων ή επαγωγέων μιας φυσιολογικής διαδικασίας σε ένα οργανισμό – πρότυπο και η πιθανή εύρεση νέων φαρμακολογικών ουσιών. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε έλεγχος 64 μορίων, τα οποία είναι πιθανοί αναστολείς του μονοπατιού VEGFR2 της αγγειογένεσης στο zebrafish. Το μόριο AAL993 ανήκει στις ανθρανιλαμίνες (AAL), είναι ήδη γνωστός αναστολέας του μονοπατιού VEGFR2 και θα λειτουργήσει ως θετικός μάρτυρας, ενώ τα υπόλοιπα 63 είναι επίσης οργανικά μόρια που έχουν συντεθεί με βάση τη δομή του AAL993, αλλά με διάφορες τροποποιήσεις στις πλευρικές τους ομάδες. Η σύνθεση των μορίων έγινε από την ερευνητική ομάδα του Δρ Διονύσιου Βουρλούμη στο Εργαστήριο Χημικής Βιολογίας του Ινστιτούτου Φυτικοχημείας του εθνικού κέντρου ερευνών «Δημόκριτος» (Πίνακας 3).

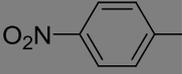
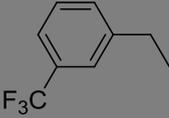
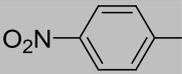
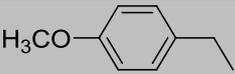
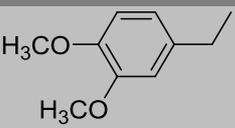
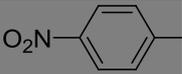
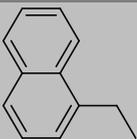
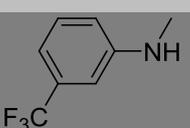
Πίνακας 3: Η δομή των μορίων που χρησιμοποιήθηκαν σαν αναστολείς του VEGFR2

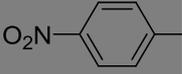
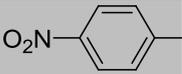
R1	R2	ΚΩΔΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
		AAL993

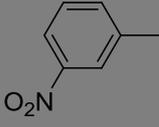
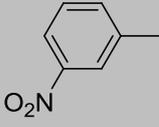
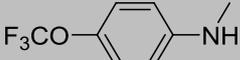
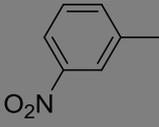
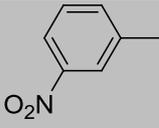
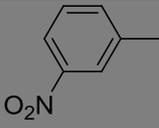
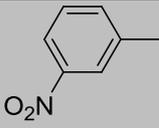
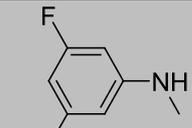
	1
	2
	3
	N.D.
	N.D.
	12f
	12e
	12g
	12b
	12h
	12a
	12c

		12d
		12i
		12n
		12j
		12k
		12o
		N.D.
		12m
		12l
		11f
		11e
		11g

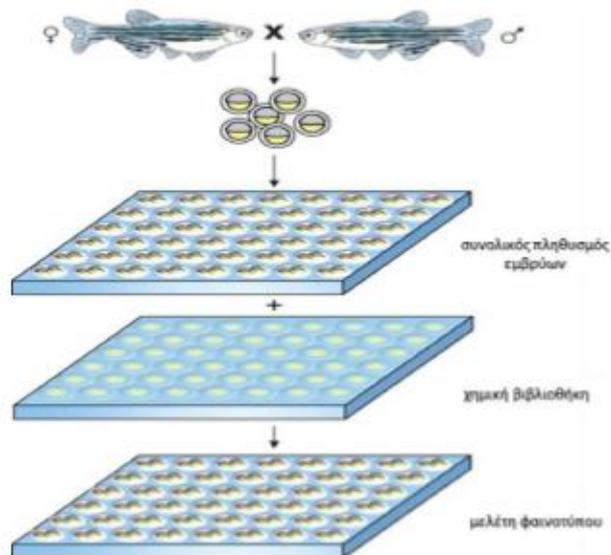
		11b
		11h
		11a
		11c
		11d
		11i
		11n
		11j
		11k
		11o
		11m
		11l

		14f
		14e
		14g
		14b
		14h
		14a
		14c
		14d
		14i
		14n
		14j
		14k

		14o
		14m
		14l
		13f
		13e
		13g
		13b
		13h
		13a
		13c
		13d
		13i

	 13n
	 13j
	 13k
	 13o
	 13m
	 13l

Στο πρώτο στάδιο του χημικού γενετικού ελέγχου, τα μόρια με τα οποία επωάστηκαν τα αγρίου τύπου έμβρυα zebrafish, επιχειρήθηκε έλεγχος της τοξικότητάς τους με τη μέτρηση της συγκέντρωσης στην οποία πεθαίνει το 50% των πειραματοζώων (LC₅₀ – Lethal concentration in 50% of animals). Ο συγκεκριμένος δείκτης χρησιμοποιείται ευρέως σε τοξικολογικούς ελέγχους φαρμάκων, χημικών μορίων ή και δειγμάτων από το περιβάλλον και αποτελεί μια χρήσιμη παράμετρο για την επιτρεπόμενη έκθεση σε έναν παράγοντα ή για τον προσδιορισμό της μέγιστης επιτρεπτής δόσης ενός φαρμάκου(Εικ. 37).



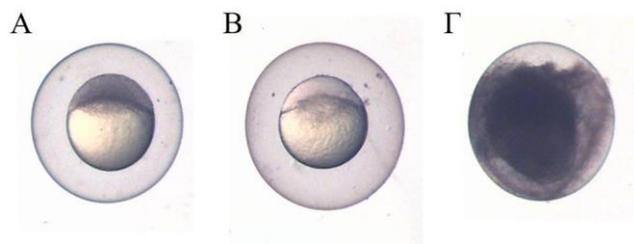
Εικόνα 37: Σχηματική απεικόνιση ενός χημικού γενετικού ελέγχου. Ενήλικα ψάρια διασταυρώνονται παράγοντας εκατοντάδες έμβρυα. Τα έμβρυα διατάσσονται σε φρεάτια πλάκας μικροτιτλοδότησης. Τα μόρια από μία χημική βιβλιοθήκη προστίθενται στο ειδικό νερό για τα αυγά σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Τα έμβρυα αναπτύσσονται και ελέγχονται για τους πιθανούς φαινοτύπους που έχουν αναπτύξει.– ανατύπωση (Xu and Zou, 2010).

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος τοξικότητας και κατόπιν έλεγχος αναστολής της αγγειογένεσης, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου φθορισμού και της διαγονιδιακής σειράς **Tg:kdr1:EGFP**.

Η διαδικασία έχει ως εξής:

1. Λήψη εμβρύων από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά **Tg:kdr1:EGFP** zebrafish (διαχωρισμός γονιμοποιημένων και απόρριψη μη γονιμοποιημένων αυγών) (Εικ. 38).
2. Προσθήκη στις 4hpf ή στις 22hpf μετά την αφαίρεση του χορίου με προσθήκη 150μl προνάσης σε τρυβλίο των 25 ml EW
3. Προσθήκη σε αυτά των μορίων σε διάφορες συγκεντρώσεις 1μM – 100μM (αρχικό stock διαλυμένο σε απόλυτη αιθανόλη ή DMSO 10mM και μετέπειτα αραιώση σε EW). Τοποθέτηση των εμβρύων σε πλάκες με 12 φρεάτια (12-well plates).

4. Εκτός από τα δείγματα των μορίων, χρησιμοποιούμε ως θετικό μάρτυρα την αντίστοιχη συγκέντρωση του μορίου AAL993 και ως αρνητικό μάρτυρα την αντίστοιχη συγκέντρωση αιθανόλης ή DMSO σε EW.
5. Διατήρηση των πλακών σε επωαστικό θάλαμο στους 28°C και α) για τον έλεγχο της τοξικότητας, παρατήρηση και καταγραφή της φυσιολογικής κατάστασης των εμβρύων και ειδικότερα καταγραφή της ύπαρξης ή όχι της κυκλοφορίας του αίματος στις 48 και 72 hpf β) για τον έλεγχο της καταστολής της αγγειογένεσης λήψη φωτογραφιών των εμβρύων με στερεοσκόπιο φθορισμού στις 50hpf.
6. Για τη στατιστική μελέτη μετρήθηκε το μήκος των 10 ISVs που βρίσκονται στην άκρη της επέκτασης της λεκίθου (yolk extension). Τα μόρια που επέδειξαν αναστολή της αγγειογένεσης επωάστηκαν για το ίδιο διάστημα (22-50 hpf) σε συγκέντρωση 10μM. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των ISVs είναι το ImageJ.
7. Επιπλέον, διερευνήθηκε αν η δράση των μορίων είναι αντιστρεπτή, αν δηλαδή μετά την απομάκρυνσή τους από το διάλυμα παύει η αγγειοκατασταλτική τους δράση και αποκαθίσταται η αγγειογένεση. Η διαδικασία είναι η εξής:
 - Λήψη εμβρύων από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά **Tg:kdr1:EGFP** zebrafish (διαχωρισμός γονιμοποιημένων και απόρριψη μη γονιμοποιημένων αυγών).



Εικόνα 38: Διαχωρισμός γονιμοποιημένων – μη γονιμοποιημένων αυγών στις 4 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στα γονιμοποιημένα αυγά παρατηρείται το συνεχώς διαιρούμενο κυτταρόπλασμα που περιορίζεται σε μία στενή δισκοειδή μάζα πάνω από τη λέκίθο (στάδιο σφαίρας) (A), ενώ στα μη γονιμοποιημένα αυγά η συγκεκριμένη περιοχή είναι διανυγής (B). Τα νεκρά αυγά διακρίνονται εύκολα καθώς είναι μαυρισμένα στο εσωτερικό τους (Γ). Τα μη γονιμοποιημένα και τα νεκρά αυγά απομακρύνονται με πιπέτα Pasteur.

- Τοποθέτηση των διαλυμάτων των μορίων στις 20 hpf και επώαση μέχρι τις 50 hpf.
- Λήψη φωτογραφιών των εμβρύων με στερεοσκόπιο φθορισμού στις 50 hpf
- Αντικατάσταση των διαλυμάτων των μορίων με EW, επώαση μέχρι τις 72 hpf
- Λήψη φωτογραφιών των εμβρύων με στερεοσκόπιο φθορισμού στις 72 hpf

Τέλος, εξετάστηκε η βιοενεργότητα των μορίων κατά τη διάρκεια της επώασης, ακολουθώντας την εξής διαδικασία:

- Λήψη εμβρύων από αγρίου τύπου και διαγονιδιακά **Tg:kdrl:EGFP** zebrafish (διαχωρισμός γονιμοποιημένων και απόρριψη μη γονιμοποιημένων αυγών).
 - Τοποθέτηση των διαλυμάτων των μορίων στις 20 hpf και επώαση μέχρι τις 50 hpf.
 - Τοποθέτηση των διαλυμάτων των μορίων στις 20 hpf και επώαση μέχρι τις 50 hpf.
 - Λήψη φωτογραφιών των εμβρύων με στερεοσκόπιο φθορισμού στις 50 hpf
 - Επαναπροσθήκη φρέσκων διαλυμάτων των μορίων στις 50 hpf και επώαση μέχρι τις 72 hpf.
 - Λήψη φωτογραφιών των εμβρύων με στερεοσκόπιο φθορισμού στις 72 hpf
- Σε όλα τα παραπάνω πειράματα πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητες επαναλήψεις για την μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

3.23 ΦΑΙΝΥΛΕΦΡΙΝΗ

Χρησιμοποιήθηκε φαινυλεφρίνη, R-phenylephrine hydrochloride (Sigma-Aldrich), με μοριακό βάρος 203,67 η διάλυση της ουσίας έγινε σε DMSO και στη συνέχεια στο νερό για τα αυγά.. Για περαιτέρω χρήση έγινε διάλυση 100 φορές σε νερό για τα αυγά, τελική συγκέντρωση 100 μM. Το νέο αραιωμένο διάλυμα προθερμαίνεται στους 28°C πριν προστεθεί στο τρυβλίο με τα έμβρυα, στις 48 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Η φαινυλεφρίνη είναι ένας εξαιρετικά εκλεκτικός αγωνιστής για α1-αδρενεργικούς υποδοχείς που βρίσκονται στους λείους μυϊκούς μύες του ανθρώπου αλλά και του ποντικίου και δεν επιδρά στους β αδρενεργικούς υποδοχείς των

καρδιακών μυικών κυττάρων. Χρησιμοποιείται ως μυδριατικό και αυξάνει την αρτηριακή πίεση μέσω αύξησης του τόνου των αγγείων. Αυξάνει τη δυνατότητα εξώθησης του αίματος από την κοιλία και προκαλεί μείωση του περικαρδιακού οιδήματος (Baker et al., 2008).

3.24 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑΣ (ΚΣ)

Για τη μέτρηση του καρδιακού παλμού των εμβρύων ελέγχου και των εκτεθειμένων σε φαρμακολογικές ουσίες χρησιμοποιήθηκε στερεοσκόπιο Nikon SMZ1000 με κάμερα Imaging source DFK22BUC03 για λήψη βίντεο για χρονικό διάστημα 10 δευτερολέπτων με συχνότητα λήψης εικόνων υψηλής ανάλυσης 30 λήψεις το δευτερόλεπτο. Έμβρυα 75 ωρών μετά τη γονιμοποίηση, από τρία ανεξάρτητα πειράματα, αναισθητοποιήθηκαν σε 0.04g/ml αναισθητικό μέσο (tricaine) και τοποθετήθηκαν σε τρυβλίο σε πλάγια θέση στο στερεοσκόπιο, ώστε να μπορεί να καταγραφεί με βίντεο η καρδιακή λειτουργία. Η ανάλυση του βίντεο έγινε με το HeartRate (κατασκευασμένο από τον Π.Τσακανίκα / Μονάδα Βιοαπεικόνισης, ΙΙΒΕΑΑ , ένα πρόγραμμα μέτρησης καρδιακού παλμού σε έμβρυα zebrafish μετά από λήψη βίντεο σε στερεοσκόπιο). Η λειτουργία του βασίζεται στην ανίχνευση της κυρίαρχης συχνότητας σε μία ακολουθία εικόνων (βίντεο). Η ανάλυση αυτή κατέστη δυνατή εφόσον δεν υπάρχει αρρυθμία στη συσταλτικότητα και δεν απαιτείται μέτρηση παλμών στο λεπτό. Πριν την έναρξη λήψης βίντεο μετρείται η θερμοκρασία δωματίου και του νερού για τα αυγά στο τρυβλίο και αφήνονται όλα τα έμβρυα ώστε να φτάσουν στη ίδια θερμοκρασία εκτός της συσκευής εκκόλαψης. Κατά τη διάρκεια λήψης βίντεο μετρείται ο χρόνος έκθεσης στη θερμοκρασία δωματίου (περίπου 30 λεπτά).

3.25 ΑΝΑΛΟΓΙΑ ΚΟΙΛΙΑΚΗΣ ΠΕΡΙΟΧΗΣ ΠΡΟΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟ

ΜΗΚΟΥΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

Οι απομονωμένες καρδιές απεικονίστηκαν με μια ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Leica DFC350FX προσαρτημένη σε ένα μικροσκόπιο C-DSS230 της Nikon. Το λογισμικό ImageJ χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της περιοχής της κοιλίας σε εικονοστοιχεία (pixels). Ο αριθμός των εικονοστοιχείων ανά mm υπολογίστηκε για να μετατρέψει την περιοχή της κοιλίας σε mm². Για να προσδιοριστεί ο λόγος της

κοιλιακής περιοχής ως προς το μήκος του σώματος, η περιοχή κοιλίας σε mm^2 διαιρέθηκε με το μήκος σώματος (σε mm). Το μήκος του σώματος μετρήθηκε από την άκρη του στόματος μέχρι τη σύνδεση σώματος-ουράς.

3.26 ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ, ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Χρησιμοποιήσαμε το ImageJ για να αναλύσουμε τις εικόνες που ελήφθησαν από το συνεστιακό μικροσκόπιο και να καθορίσουμε το μέγεθος των κυττάρων. Προκειμένου να υπολογιστεί η πυκνότητα των κυττάρων, χρησιμοποιήσαμε το λογισμικό Imaris (Bitplane) για να επιτύχουμε την τρισδιάστατη ανασυγκρότηση των εικόνων με τη χρώση με Mef2 που σηματοδοτεί τον πυρήνα των καρδιομυοκυττάρων. Στη συνέχεια επιλέξαμε την επιλογή "surpass the surface". Στο κατάλληλο κατώφλι, σημάναμε τους πυρήνες των κυττάρων έτσι ώστε το πρόγραμμα να υπολογίζει αυτόματα τον αριθμό τους. Στη συνέχεια υπολογίσαμε τη συνολική επιφάνεια του μυοκαρδίου σε κάθε z-stack (mm^2). Τέλος, μετατράπηκε ο αριθμός των κυττάρων σε αυτή την επιφάνεια, σε κυτταρική πυκνότητα (κύτταρα / mm^2). Υπολογίσαμε τον πολλαπλασιασμό των καρδιομυοκυττάρων χρησιμοποιώντας την αναλογία PCNA + MEF2 + / συνολική MEF2 + (Sun et al., 2009, Kikuchi et al., 2011).

3.27 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Για την παρατήρηση των εμβρύων χρησιμοποιήθηκαν τα στερεοσκόπια Nikon SMZ800, Leica MZ75, Leica EZ4D, το στερεοσκόπιο φθορισμού Nikon WD70 και το οπτικό μικροσκόπιο Zeiss HBO 100.

Για τη λήψη φωτογραφιών σε οπτικό στερεοσκόπιο χρησιμοποιήθηκαν οι κάμερες Digital camera Sony Leica DFC350-FX και η ενσωματωμένη κάμερα στο στερεοσκόπιο Leica EZ4D. Η τελευταία χρησιμοποιήθηκε και για λήψη φωτογραφιών φθορισμού και η επεξεργασία τους έγινε με το πρόγραμμα LAS V3.8.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

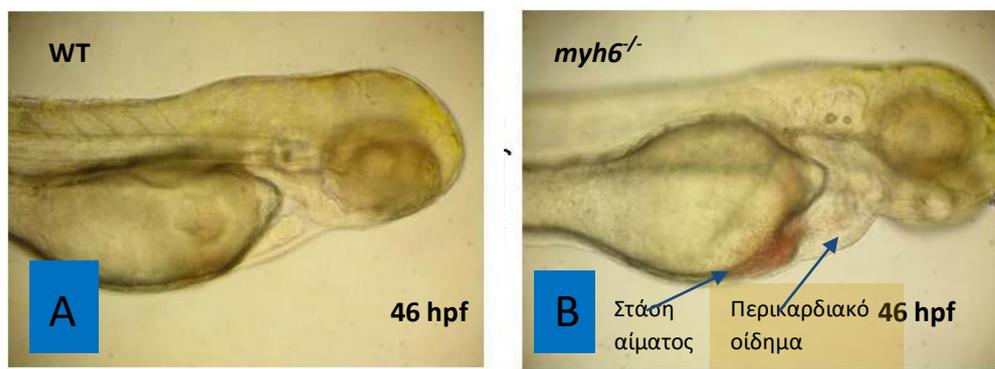
4A Η ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ *myh6*^{-/-} ΣΤΑ ΕΝΗΛΙΚΑ

ZEBRAFISH

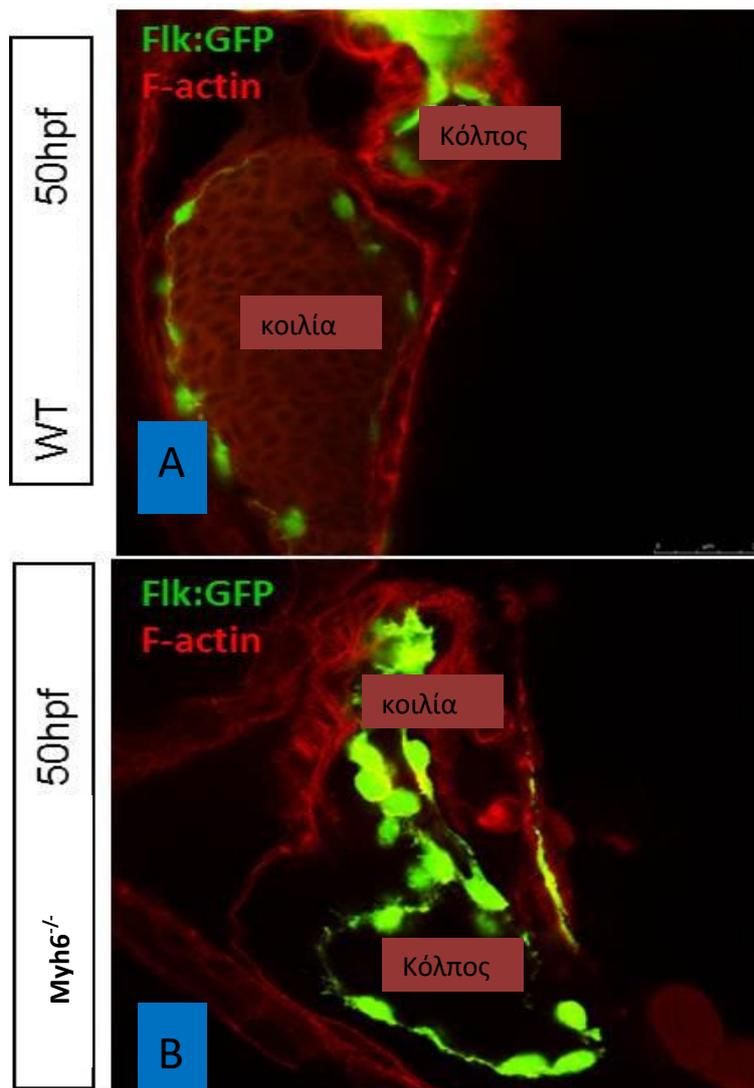
4.1A ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ

Τα μεταλλαγμένα έμβρυα εμφανίζουν μειωμένη συσταλτικότητα του κόλπου, η οποία διαπιστώνεται με την παρατήρηση σε απλό στερεοσκόπιο στις 48 ώρες περίπου, μετά τη γονιμοποίηση. Στα χαρακτηριστικά του φαινοτύπου των μεταλλαγμένων εμβρύων περιλαμβάνονται, επίσης, η δημιουργία περικαρδιακού οιδήματος (Εικ. 41, 42), το οποίο γίνεται μεγαλύτερο από την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και συμπιέζει την καρδιά.

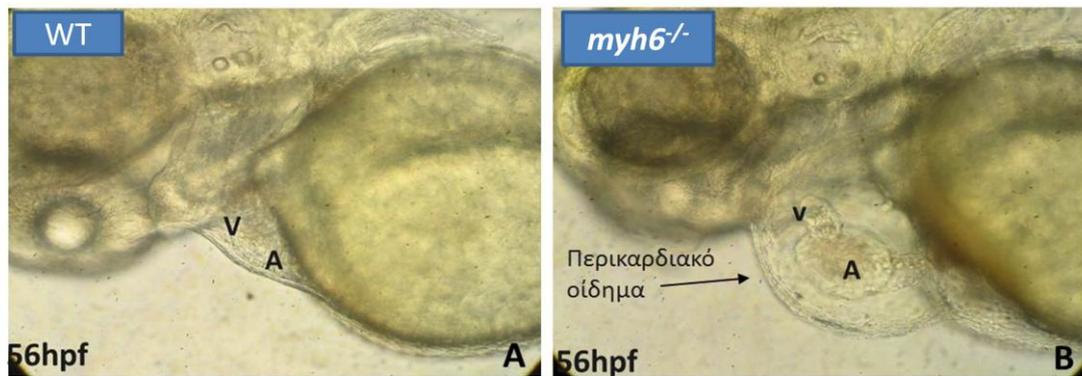
Εμφανίζεται, επίσης, σταδιακή μείωση της αιματικής ροής μέσω των δύο κοιλοτήτων της καρδιάς και στάση του αίματος στον κόλπο ή στο φλεβώδη κόλπο (sinus venosus) από την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Η στάση του αίματος στον κόλπο σε συνδυασμό με την έλλειψη συστολής, προκαλεί διάτασή του και περαιτέρω μείωση της κυκλοφορίας με χρονοεξαρτώμενο πρότυπο (Εικ. 39). Επίσης, παρατηρείται και αποσύνδεση του ενδοκαρδίου από το μυοκάρδιο (Εικ. 40, 44).



Εικόνα 39: Α. Φυσιολογικό και Β. μεταλλαγμένο έμβρυο *myh6*^{-/-} στις 46 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Παρατηρούνται η στάση του αίματος και το περικαρδιακό οίδημα που αρχίζει να σχηματίζεται στο μεταλλαγμένο έμβρυο (μεγέθυνση X20)

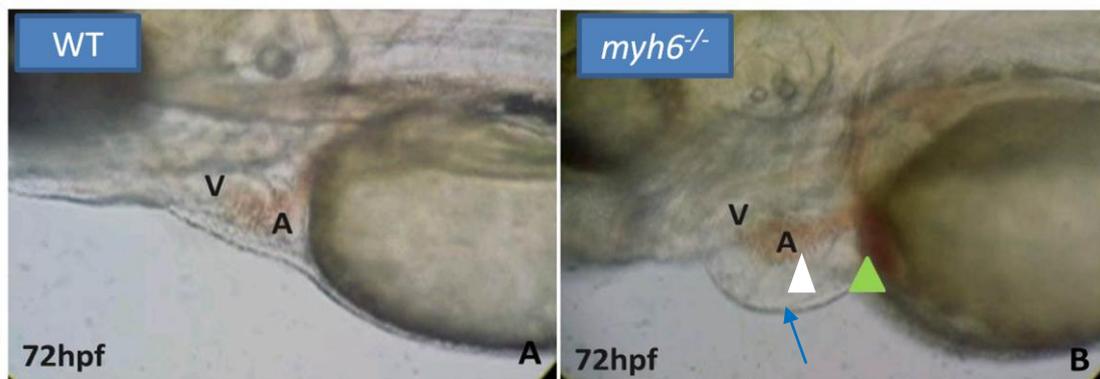


Εικόνα 40: Α. Φυσιολογικό και Β. μεταλλαγμένο έμβryo *myh6*^{-/-} στις 50 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Παρατηρείται η αποσύνδεση του ενδοκαρδίου (πράσινο χρώμα) από το μυοκάρδιο (κόκκινο χρώμα) V:κοιλία, A: κόλπος (μεγέθυνση X100)



Εικόνα 41. Α. Φυσιολογικό και Β. μεταλλαγμένο έμβρυο *myh6*^{-/-} στις 56 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Βέλος: περικαρδιακό οίδημα, V:κοιλία, A: κόλπος (μεγέθυνση X20)

Η συσταλτικότητα της κοιλίας υποστηρίζει την αιματική κυκλοφορία μέχρι την 4^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση, οπότε και στην πλειοψηφία τους τα μεταλλαγμένα έμβρυα πεθαίνουν σε ποσοστό 65%, λόγω ανεπαρκούς καρδιακής παροχής. Η εμφάνιση αυτών των φαινοτυπικών ανωμαλιών επηρεάζει μόνο την ανάπτυξη της καρδιάς ενώ στα αρχικά τουλάχιστον στάδια αφήνουν το υπόλοιπο έμβρυο ανεπηρέαστο (Εικ. 43).

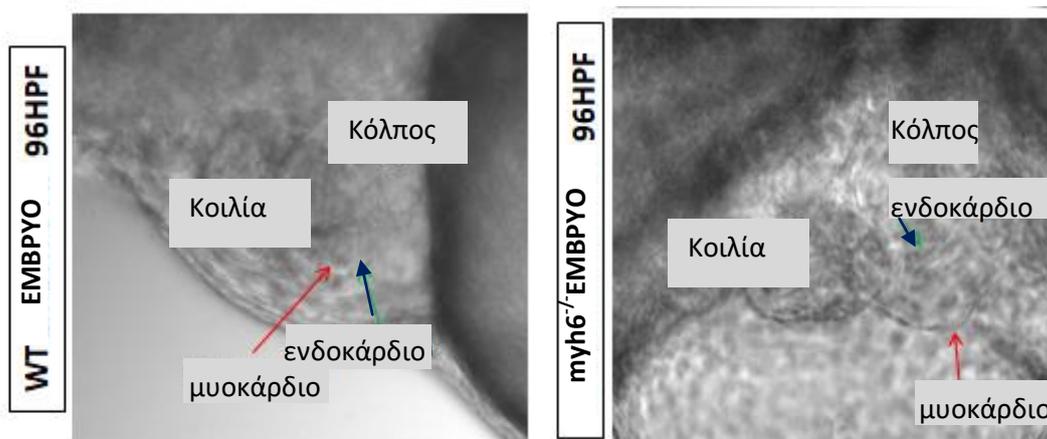


Εικόνα 42. Α. Φυσιολογικό και μεταλλαγμένο έμβρυο *B. myh6^{-/-}* στις 72 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Βέλος: περικαρδιακό οίδημα, Μπλε βέλος: διάταση του κόλπου, Κεφαλή βέλους (πράσινη): στάση αίματος στο φλεβώδη κόλπο, Κεφαλή βέλους (άσπρη): στάση αίματος στον κόλπο, V:κοιλία, A:κόλπος.

Μέχρι και τις 72 ώρες, το έμβρυο αναπτύσσεται φυσιολογικά και μπορεί να παρατηρηθεί και να μελετηθεί για αρκετές ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, αφού και τα έμβρυα με έλλειψη κυκλοφορίας, διατηρούνται στη ζωή λόγω παθητικής διάχυσης οξυγόνου από το υδάτινο διάλυμα στο οποίο αναπτύσσονται και η οποία μπορεί να συμβεί λόγω του μικρού τους μεγέθους (Kalogirou et al., 2014).



Εικόνα 43: Τα μεταλλαγμένα έμβρυα (56 hpf) σε σχέση με αυτά του αγρίου τύπου δεν εμφανίζουν διαφορές εκτός από την καθυστερημένη ανάπτυξη και τα προβλήματα στην καρδιά (μεγέθυνση X20).

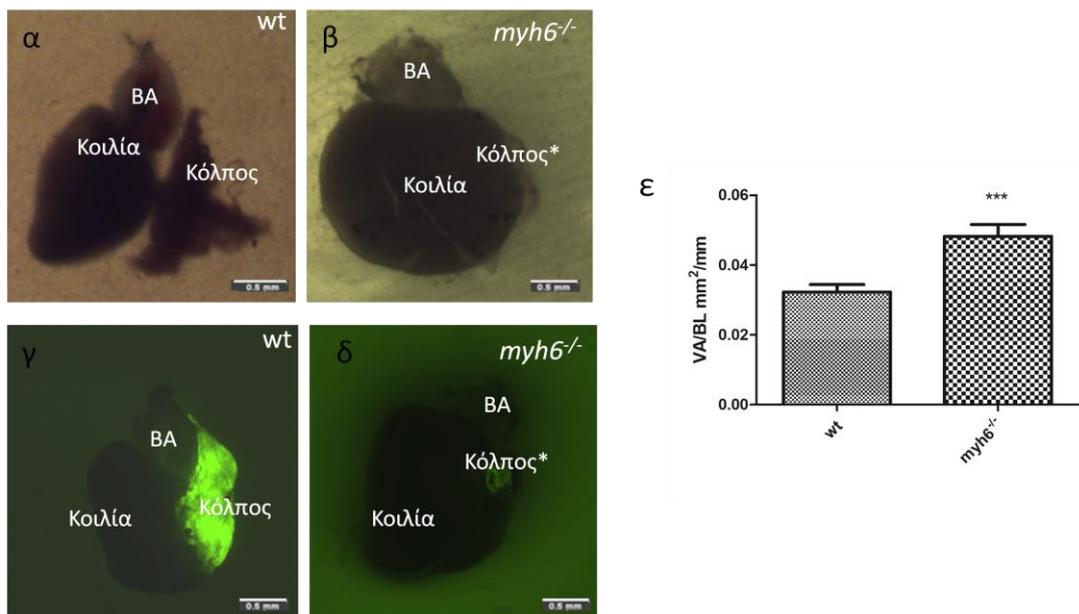


Εικόνα 44: Α. Φυσιολογικό και Β. μεταλλαγμένο έμβρυο *myh6^{-/-}* στις 96 ώρες μετά την γονιμοποίηση. Παρατηρείται η αποσύνδεση του ενδοκαρδίου (μπλεβέλος) από το μυοκάρδιο (κόκκινο βέλος) μεγέθυνση X100).

4.2Α ΥΠΟΠΛΑΣΤΙΚΟΣ ΚΟΛΠΟΣ ΚΑΙ ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗ ΚΟΙΛΙΑ ΣΤΑ

MYH6^{-/-} ZEBRAFISH

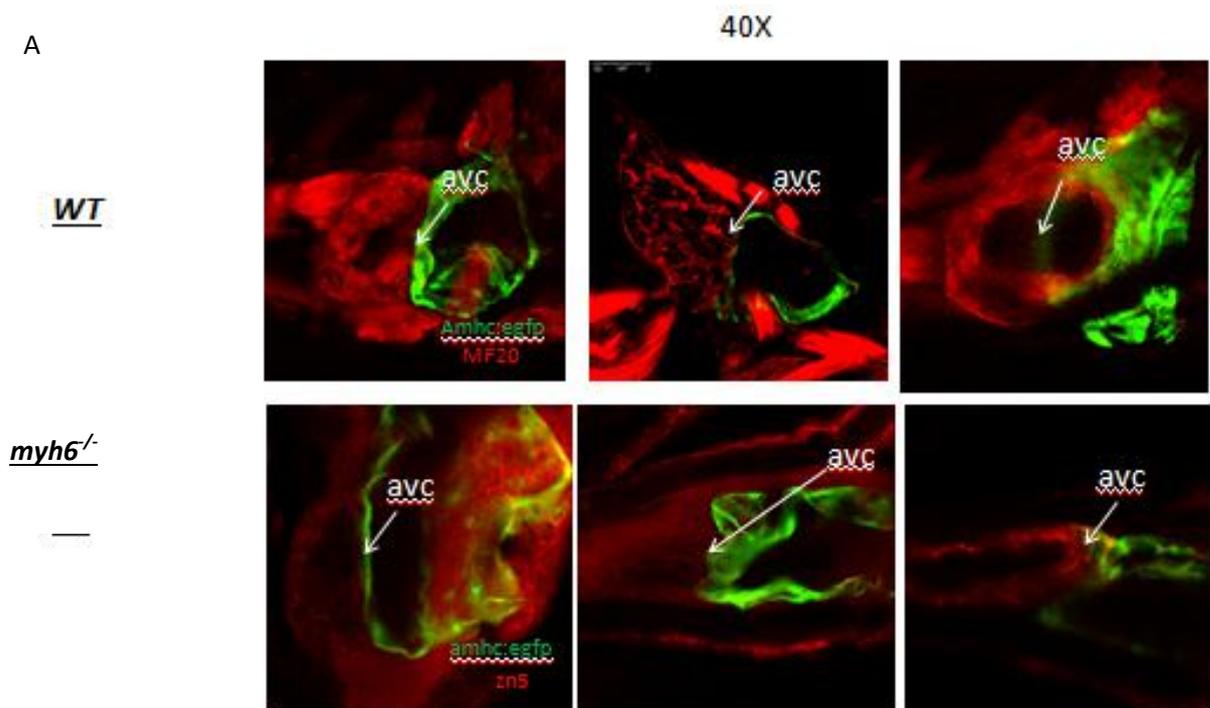
Η μεταλλαγμένη σειρά *myh6^{s459}* φέρει ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης στη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και χαρακτηρίζεται από ασθενή κολπική συστολή (Kalogiourou et al., 2014). Ωστόσο, ένα περίπου 40% των εμβρύων που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη σε ομοζυγωτία, επιβιώνουν έχοντας μόνο ένα λειτουργικό θάλαμο: την κοιλία. Οι κοιλίες εμφανίζονται μεγαλύτερες και περισσότερο στρογγυλές (Εικ. 45α, β). Οι κόλποι των ενηλίκων ψαριών είναι σημαντικά υποπλαστικοί με λίγα εναπομείνοντα κύτταρα, όπως υποδηλώνεται με τη διαγονιδιακή σειρά που σημαίνει τα κύτταρα του κόλπου, Tg (*amhc: eGFP*)^{s958} (Εικ. 45γ, δ). Η αναλογία της κοιλίας / σωματικού μήκους στα αγρίου τύπου είναι 0,032 mm² / mm, ενώ των *myh6^{-/-}* 0,048 mm² / mm, και συνεπώς υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του μεγέθους της ($p < 0,05$, $n = 11$ αγρίου τύπου $n = 10$ *myh6^{-/-}*) (Εικ. 45ε).

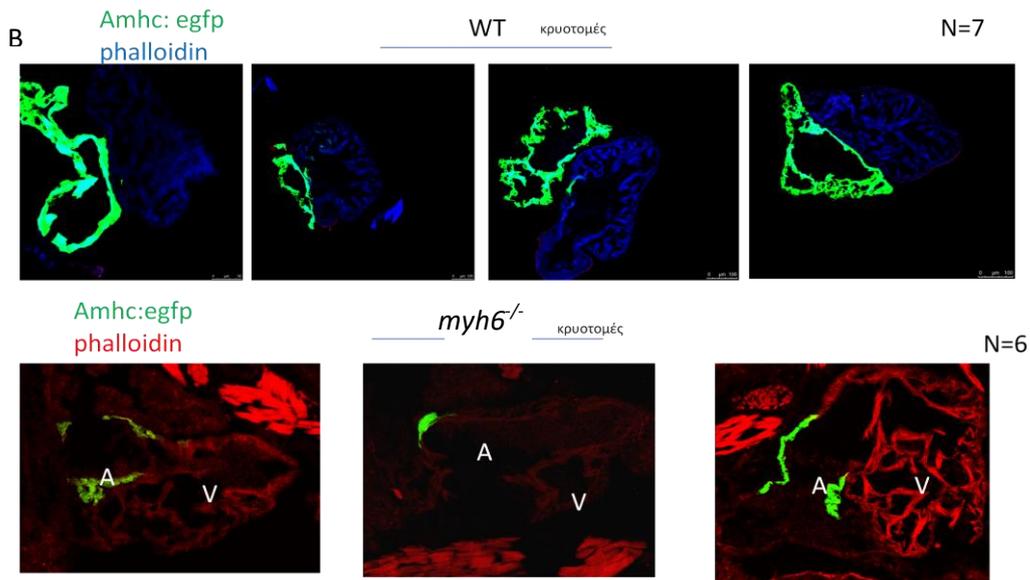


Εικόνα 45: (α) Καρδιά ενηλίκου zebrafish αγρίου τύπου και (β) *myh6^{-/-}* όπου στα μεταλλαγμένα παρατηρείται ο υποπλαστικός κόλπος και η μεγαλύτερη κοιλία. Ο υποπλαστικός κόλπος φαίνεται καλύτερα στις διαγονιδιακές καρδιές *amhc:egfp* (δ) σε σχέση με την αντίστοιχη του αγρίου τύπου (γ). Η κοιλία στα *myh6^{-/-}* ψάρια είναι πολύ

μεγαλύτερη με στατιστική σημαντικότητα ($p=0,0003$) (ε). BA: Αρτηριακός βολβός (Bulbus Arteriosus)

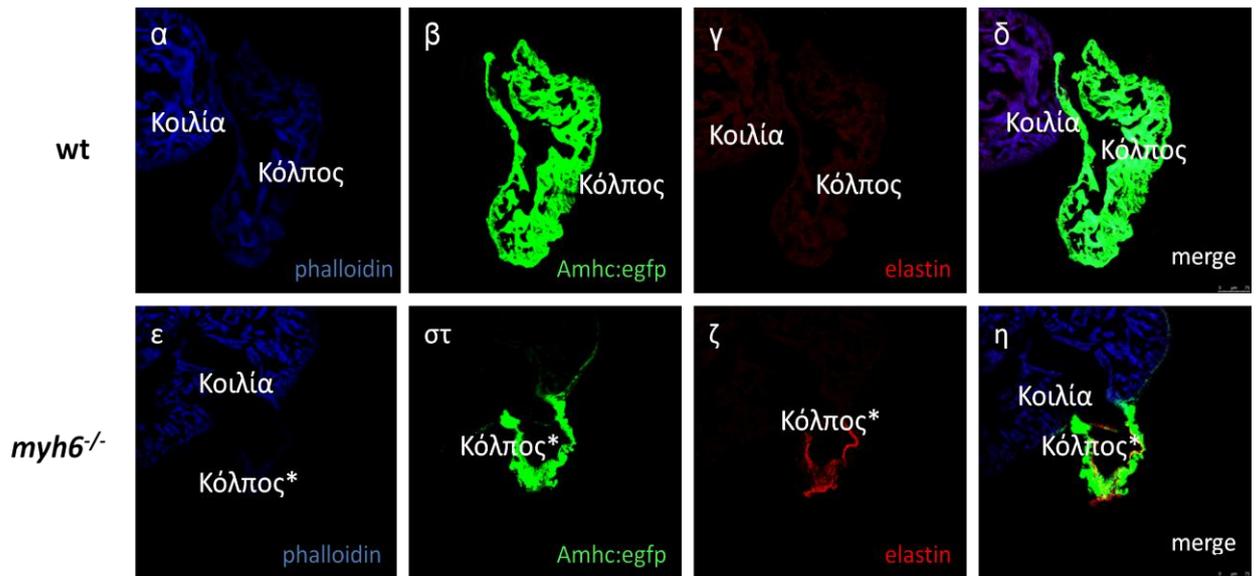
Για να διαπιστώσουμε αν τα καρδιομυοκύτταρα της κοιλίας έχουν κολπικά χαρακτηριστικά (και άρα να διαπιστώσουμε αν υπάρχει μετανάστευση κολπικών κυττάρων προς την κοιλία ή αυτά εκφυλίζονται), πραγματοποιήθηκαν κρουτομές σε έμβρυα 5 ημερών αλλά και σε προνύμφες 30 ημερών των *myh6*^{-/-} ψαριών. Σε έμβρυα *myh6*^{-/-} 5 ημερών δεν υπάρχουν κύτταρα του κόλπου στην κοιλία (Εικ. 46A). Στα *myh6*^{-/-} ψάρια 30 ημερών φαίνεται πως και πάλι δεν υπάρχουν κύτταρα του κόλπου στην κοιλία και ο κόλπος ήδη έχει αρχίσει να γίνεται υποπλαστικός (Εικ. 46B). Αν δεν είχε αρχίσει να εκφυλίζεται θα έπρεπε να υπάρχει συνεχές πράσινο χρώμα όπως φαίνεται στα αγρίου τύπου ψάρια.





Εικόνα 46 : A. Στα έμβρυα *myh6*^{-/-} 5 ημερών δεν παρατηρούνται κύτταρα με κολπικά χαρακτηριστικά στην κοιλία. B. Στις προνύμφες 30 ημερών που φέρουν τη μετάλλαξη δεν παρατηρούνται κύτταρα με κολπικά χαρακτηριστικά στην κοιλία, ενώ ήδη, τα κύτταρα του κόλπου έχουν αρχίσει να χάνονται. Χρησιμοποιήθηκε η διαγονιδιακή σειρά *amhc:egfp* που σημαίνει τα κύτταρα του κόλπου, το *zn5* αντίσωμα που σημαίνει τα καρδιομυοκύτταρα όπως και η φαλλοϊδίνη και το MF20 αντίσωμα. AVC: κολποκοιλιακό κανάλι A: κόλπος V: κοιλία

Προκειμένου να μελετηθούν τα χαρακτηριστικά των κολπικών καρδιομυοκυττάρων που έχουν σημανθεί με το διαγονίδιο Tg (*amhc:eGFP*)^{s958} και το πώς διατηρείται η παροχή αίματος απευθείας στην κοιλία, χρησιμοποιήσαμε αντίσωμα έναντι της ελαστίνης-2. Στους κόλπους των νεαρών ψαριών αγρίου τύπου 6 εβδομάδων δεν παρατηρείται χρώση ελαστίνης (Εικ. 47α-δ), αλλά ανιχνεύσαμε σημαντική εναπόθεση ελαστίνης που πλαισιώνει τα υπολείμματα κολπικών κυττάρων που συνεχίζουν να εκφράζουν το διαγονίδιο Tg (*amhc:eGFP*)^{s958} των *myh6*^{-/-} (Εικ. 47ε-η)(N=12 αγρίου τύπου, N=9 *myh6*^{-/-}).

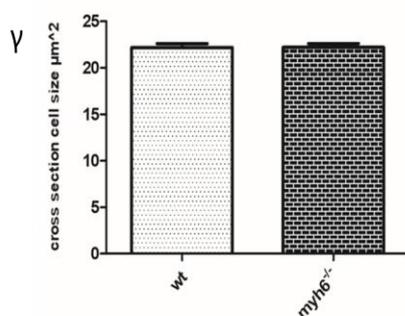
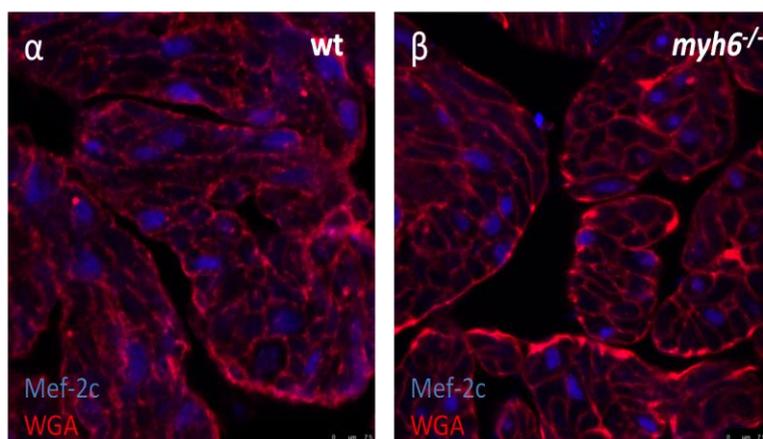


Εικόνα 47: Απεικονίζονται καρδιές από ψάρια αγρίου τύπου (α-δ) και μεταλλαγμένα (ε-η) ηλικίας 6 εβδομάδων. Στον κόλπο των μεταλλαγμένων ψαριών υπάρχει εναπόθεση ελαστίνης κάτι που δεν παρατηρείται στους αντίστοιχους κόλπους των αγρίου τύπου ψαριών. N=12 WT, 9 *myh6*^{-/-}

4.3Α Η ΚΟΙΛΙΑ ΤΩΝ *myh6*^{-/-} ΨΑΡΙΩΝ ΔΙΕΥΡΥΝΕΤΑΙ ΛΟΓΩ ΥΠΕΡΠΛΑΣΙΑΣ

Στη συνέχεια επιδιώξαμε να εντοπίσουμε με ποιο μηχανισμό πραγματοποιείται η κοιλιακή αναδιαμόρφωση των *myh6*^{-/-} zebrafish και ειδικότερα να διακρίνουμε αν οφείλεται στην υπερπλασία ή την υπερτροφία με βάση την εκτίμηση του μεγέθους των κυττάρων, την κυτταρική πυκνότητα και το πολλαπλασιαστικό δυναμικό των καρδιομυοκυττάρων. Μετρήσαμε το μέγεθος των κυττάρων με το αντίσωμα έναντι της λεκτίνης του σίτου (WGA) σε κρυστομές πάχους 10 μm. Παράλληλα, ο αριθμός των κυττάρων υπολογίστηκε μετρώντας τους πυρήνες των καρδιομυοκυττάρων που σημαίνονται με το αντίσωμα έναντι του MEF-2c. Είναι σαφές ότι σε σύγκριση με καρδιομυοκύτταρα ενήλικων θηλαστικών που είναι σε μεγάλο ποσοστό διπύρρηνα (Li F et al., 1997) (Olivetti G. et al., 1996), τα καρδιομυοκύτταρα στο zebrafish είναι μονοπύρρηνα (Wills et al., 2008, Foglia et al., 2016, Hirose et al., 2019) (Εικόνα 47). Δεν ανιχνεύσαμε στατιστικά σημαντική διαφορά στις μετρήσεις μεγέθους κυττάρων που έγιναν σε >250 καρδιομυοκύτταρα

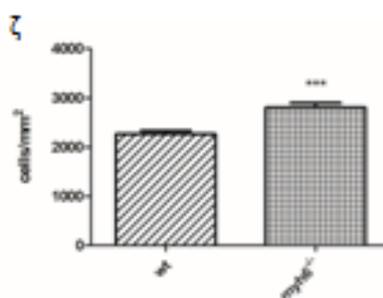
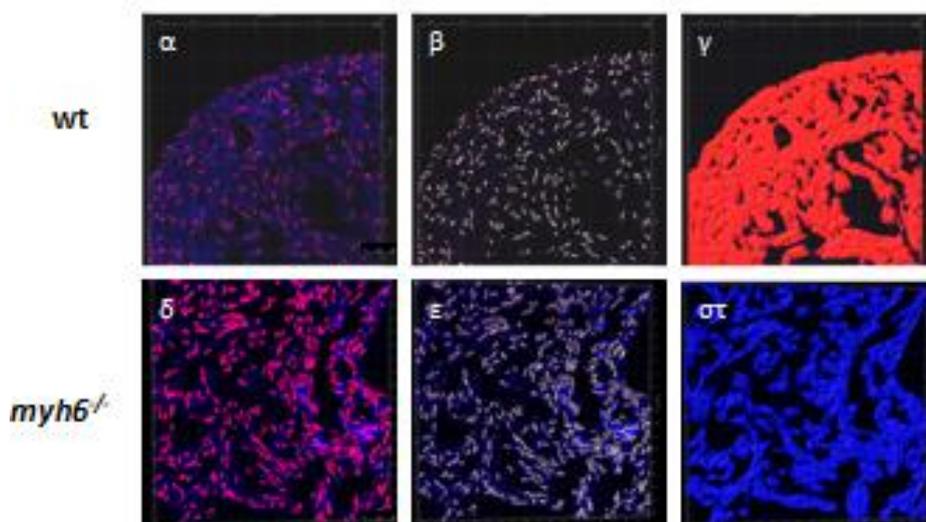
αγρίου τύπου (Εικ. 48α) και *myh6*^{-/-} ψαριών (Εικ. 48β) (αγρίου τύπου = $22,20 \pm 0,4289 \mu\text{m}^2$ *myh6*^{-/-} = $22,22 \pm 0,386 \mu\text{m}^2$, Εικ. 48γ). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι η κοιλιακή αναδιαμόρφωση των *myh6*^{-/-} ψαριών δεν οφείλεται σε υπερτροφική απόκριση.



Εικόνα 48: Απεικόνιση κρυτομών 10 μm από καρδιές ενήλικου αγρίου τύπου zebrafish (α) και *myh6*^{-/-} (β). Με μπλε απεικονίζεται το αντίσωμα έναντι της Mef-2c πρωτεΐνης που χρωματίζει τους πυρήνες των καρδιομυοκυττάρων και με κόκκινο το αντίσωμα έναντι της WGA πρωτεΐνης που σημαίνει την εξωτερική μεμβράνη και άρα τα όρια του κυττάρου. Έπειτα από μέτρηση του μεγέθους >250 κυττάρων σε κάθε κατηγορία και στατιστική ανάλυση βρέθηκε πως έχουν ουσιαστικά το ίδιο μέγεθος και κατά συνέπεια δεν υπάρχει υπερτροφία. N=18 WT, 15 *myh6*^{-/-}

Στη συνέχεια ερευνήσαμε την πιθανότητα υπερπλασίας που συμβάλλει στη μεγέθυνση της κοιλίας, εξετάζοντας την πυκνότητα των κοιλιακών κυττάρων (κύτταρα/mm²) των ενήλικων αγρίου τύπου και *myh6*^{-/-} ψαριών. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι τα καρδιομυοκύτταρα του zebrafish είναι μονοπύρρηνα, κάθε απεικονιζόμενος πυρήνας θεωρήθηκε πως αντιστοιχεί σε ένα κύτταρο. Οι πυρήνες

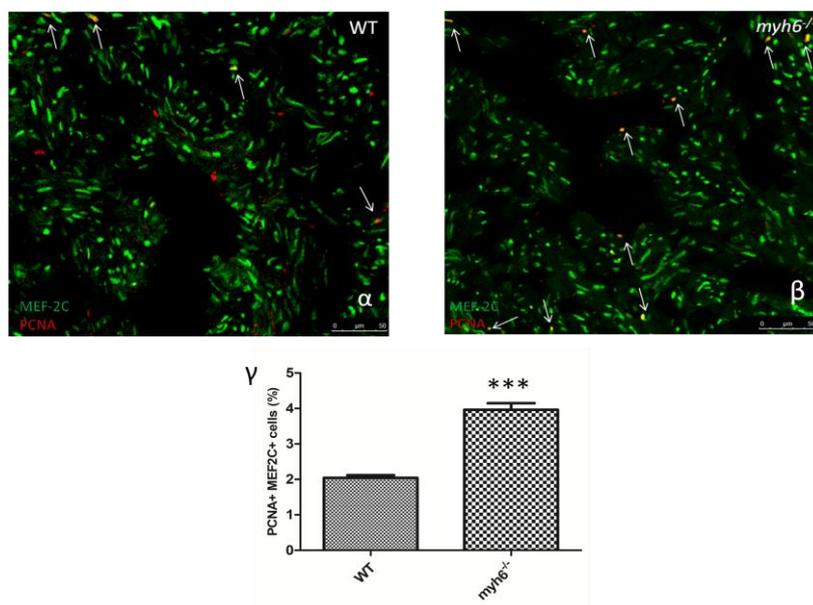
των καρδιομυοκυττάρων επισημάνθηκαν με αντίσωμα Mef-2c σε κρυτομές (πάχους 10 μm) (Εικ. 49α-στ). Υπολογίσαμε ότι η πυκνότητα των κυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερη στις κοιλίες άγριου τύπου ($2.265 \pm 74,93$ κύτταρα/ mm^2) από ό,τι στα $myh6^{-/-}$ ($2.804 \pm 98,35$ κύτταρα/ mm^2)(Εικ. 49ζ, $p=0,0016$).



Εικόνα 49: Απεικόνιση με κόκκινο χρώμα του Mef-2c, σε κρυτομές πάχους 10 μm από καρδιές ενήλικου αγρίου τύπου (α) και $myh6^{-/-}$ (δ) zebrafish. Αρχικά, μέσω του προγράμματος Imapris έχουμε την καταμέτρηση των πυρήνων (άρα κυττάρων) (β,δ) και έπειτα με το ίδιο πρόγραμμα υπολογίζεται το εμβαδόν που καταλαμβάνει το μυοκάρδιο στη συγκεκριμένη τομή και έχει σημειωθεί με φαλλοϊδίνη (γ, στ). Έπειτα, υπολογίζεται η πυκνότητα των κυττάρων ανά τετραγωνικό χιλιοστό και με τη βοήθεια στατιστικής ανάλυσης βρέθηκε πως στις καρδιές των μεταλλαγμένων ψαριών υπάρχουν περισσότερα

κύτταρα από τις καρδιές του αγρίου τύπου, υποδηλώνοντας την υπερπλασία . $p= 0.0016$, $N = 25$ κρυτομές από 7 ψάρια κάθε ομάδας.

Ως πρόσθετη απόδειξη υπερπλασίας, μετρήσαμε την αναλογία $Mef2^+ + PCNA^+/Mef2^+$, η οποία είναι δείκτης του πολλαπλασιασμού των καρδιομυοκυττάρων. Εντοπίσαμε περισσότερα καρδιομυοκύτταρα που βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού στις κοιλίες των $myh6^{-/-}$ ($3,96 \pm 0,183$) από ό,τι στις κοιλίες του αγρίου τύπου ($2,05 \pm 0,073$) (Εικόνα 50, $P < 0,0001$).

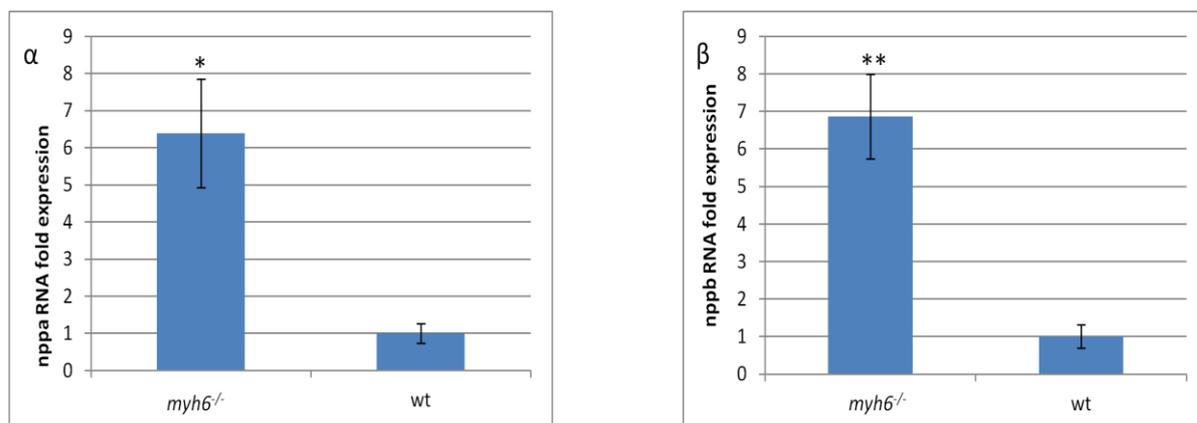


Εικόνα 50: Απεικόνιση κρυτομών πάχους 10 μm από καρδιές ενήλικου αγρίου τύπου (α) και $myh6^{-/-}$ (β) zebrafish, που έχουν επωαστεί με αντίσωμα αντι-PCNA το οποίο σημαίνει τα κύτταρα που βρίσκονται σε πολλαπλασιασμό (κόκκινο χρώμα) και με αντι-Mef-2c αντίσωμα που σημαίνει τους πυρήνες των καρδιομυοκυττάρων (πράσινο χρώμα). Για να αξιολογήσουμε πού υπάρχει μεγαλύτερο πολλαπλασιαστικό δυναμικό υπολογίζουμε την αναλογία $Mef2^+ + PCNA^+/Mef2^+$ και μετά από στατιστική ανάλυση προκύπτει πως περισσότερα καρδιομυοκύτταρα των $myh6^{-/-}$ βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού από αυτά των αγρίου τύπου. ($P < 0.001$, $N = 10$ αγρίου τύπου κρυτομές από 5 κοιλίες και $N = 12$ $myh6^{-/-}$ κρυτομές από 5 κοιλίες).

4.4A ΑΥΞΗΣΗ mRNA ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΥΠΕΡΤΡΟΦΙΑΣ ΣΤΙΣ

ΚΟΙΛΙΕΣ ΤΩΝ MYH6^{-/-} ΗΛΙΚΙΑΣ 6 ΕΒΔΟΜΑΔΩΝ

Το *nppa* (Natriuretic Peptide A) και το *nppb* (Natriuretic Peptide B) είναι μοριακοί δείκτες υπερτροφίας των καρδιομυοκυττάρων στα θηλαστικά. Η μεταγραφή αυτών των γονιδίων είναι αυξημένη σε περιπτώσεις αυξημένου μεγέθους της καρδιάς στο zebrafish (Hendricks et al., 2009). Εξετάσαμε λοιπόν την έκφραση των επιπέδων αυτών των γονιδίων σε καρδιές αγρίου τύπου και *myh6^{-/-}* ψαριών, ηλικίας 6 εβδομάδων. Τα επίπεδα mRNA αυτών των γονιδίων ήταν υψηλότερα στα *myh6^{-/-}* δείγματα. Συγκεκριμένα, για το γονίδιο *nppa*, η αύξηση των επιπέδων του mRNA των μεταλλαγμένων καρδιών ήταν 6,4 φορές σε σχέση με του αγρίου τύπου, ενώ για το *nppb* γονίδιο η αύξηση ήταν 6,86 φορές (Σχήμα 51α, *nppa* P=0,029. 51β *nppb* P=0,004, N=6 κοιλίες ανά ομάδα). Επομένως, αν και η μεταγραφική ενεργοποίηση υποδηλώνει μια υπερτροφική απόκριση, με βάση τα δεδομένα από τα θηλαστικά, στο zebrafish σηματοδοτεί μηχανισμό υπερπλασίας η αύξηση της καρδιάς που παρατηρείται στα μεταλλαγμένα ψάρια. Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το γονίδιο 18S.

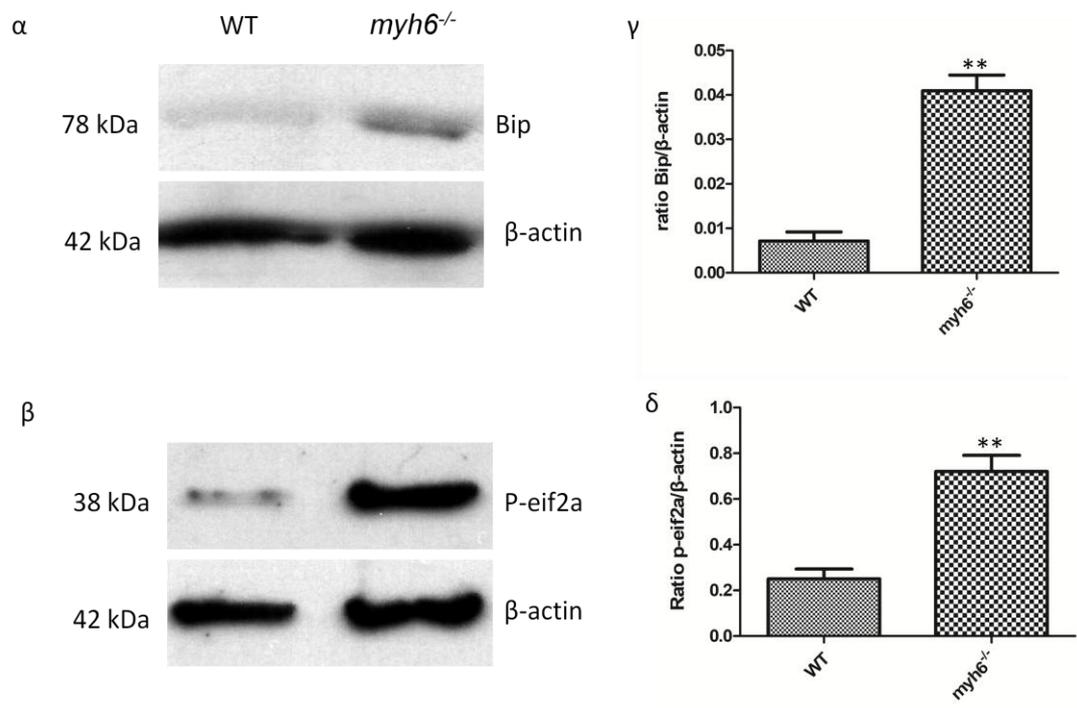


Εικόνα 51: Τα επίπεδα μεταγραφής των γονιδίων *nppa* (α) και *nppb* (β) σε κοιλίες ψαριών 6 εβδομάδων αγρίου τύπου και *myh6^{-/-}*. Και στα 2 γονίδια βρέθηκε πως υπάρχει

μεγαλύτερη μεταγραφή τους στις κοιλίες των μεταλλαγμένων ψαριών και μάλιστα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (ppra P=0,029 pprb p=0,004 N=6 κοιλίες). Η κανονικοποίηση πραγματοποιήθηκε ως προς το γονίδιο 18S. Ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο $2^{-\Delta Ct}$.

4.5A ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΟΥ ΕΝΔΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΟΥ ΔΙΚΤΥΟΥ

Πειράματα γονιδιωματικής ανάλυσης των κοιλιών των ψαριών που φέρουν τη μετάλλαξη *myh6^{-/-}* έδειξαν την ενεργοποίηση μεγάλου αριθμού γονιδίων που σχετίζονται με το στρες του ενδοπλασματικού δικτύου (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα του εργαστηρίου του Δρ. Μπέη). Σε μια προσπάθεια να κατανοήσουμε καλύτερα τον παθοφυσιολογικό μηχανισμό της κοιλιακής υπερπλασίας, χρησιμοποιήσαμε την ανοσοαποτύπωση κατά Western για να διερευνήσουμε μερικούς βασικούς δείκτες της ενεργοποίησης του στρες του ενδοπλασματικού δικτύου. Διαπιστώθηκε μια αύξηση 5,74 φορές του Bip, στην κοιλία των *myh6^{-/-}* σε σύγκριση με τις κοιλίες των αγρίου τύπου ψαριών, με στατιστικά σημαντική διαφορά (P=0,001). Επιπλέον, σε κοιλίες μεταλλαγμένων ψαριών, τα επίπεδα του P-eif2a αυξήθηκαν επίσης κατά 2,88 φορές σε σχέση με τις κοιλίες αγρίου τύπου ψαριών, με στατιστικά σημαντική διαφορά (p=0,0049). Χρησιμοποιήσαμε τρία διαφορετικά δείγματα καρδιών *myh6^{-/-}* και αγρίου τύπου και β-ακτίνη για την κανονικοποίηση (Εικ. 52)



Εικόνα 52: (α, β) Ανοσοαποτύπωση κατά Western χρησιμοποιώντας κοιλίες ενήλικων αγρίου τύπου και *myh6*^{-/-} ψαριών. Εξετάστηκε η έκφραση των πρωτεϊνών Bip και p-eif2a που συμμετέχουν στο μονοπάτι του στρες του ΕΔ. Μετά από στατιστική ανάλυση βρέθηκε πως το Bip (p=0.001) και το p-eif2a (p=0.004) έχουν μεγαλύτερη έκφραση στα μεταλλαγμένα ψάρια. N=3 κοιλίες για κάθε ομάδα.

4B ΧΗΜΙΚΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ **ΜΟΡΙΩΝ – ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ** **ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ VEGFR2**

4.1B ΈΛΕΓΧΟΣ ΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ VEGFR2 ΜΕΤΑΞΥ ZEBRAFISH, **ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΚΑΙ ΠΟΝΤΙΚΟΥ**

Για να πραγματοποιηθεί ο χημικός γενετικός έλεγχος, πρέπει πρώτα από όλα να αποδειχθεί πως υπάρχει αμινοξική ομολογία μεταξύ κυρίως του ανθρώπου και του zebrafish για τον VEGFR2. Αυτό επειδή τα χημικά μόρια-πιθανοί αναστολείς της αγγειογένεσης συντέθηκαν με βάση την ανθρώπινη πρωτεΐνη VEGFR2. Επιπλέον, οι μετατροπές στο αρχικό μόριο ALL993 πραγματοποιήθηκαν για να υπάρχει σύνδεση με τον VEGFR2 στις θέσεις των 4 αμινοξέων Lys868, Glu885, Cys919 και Cys1045 (οι 4 θέσεις φαίνονται με μπλε χρώμα στην εικ. 53).

Παρατηρείται πως μεταξύ του ανθρώπου και του zebrafish τα αμινοξέα σε αυτές τις θέσεις είναι συντηρημένα και συνεπώς ο χημικός γενετικός έλεγχος μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιόπιστα. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το UniProt. Η ομολογία μεταξύ ανθρώπου και zebrafish είναι 74,5%.

sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	LKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALM	883
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	LKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCKTVAVKMLKEGATHSEHRALM	881
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	LKLGEPLGRGAFGQVVEATAYGIEKATCTTVAVKMLKEGATSSEYRALM	892
*****:*****:* *:*:*:* ***** *:*:*****		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	SELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVFCKFGNLSYLRSKRN	933
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	SELKILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVFSKFGNLSYLRGKRN	931
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	SELKILIHIGHHLNVNLLGACTKQGGPLMVIVCYCKHGNLSYLRKSRG	942
*****:*****:.*.*****:.*.*****:.*.		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	EFVFPYKTKGARFR-----QGKD-YVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSG	976
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	EFVFPYKSKGARFR-----QGKD-YVGELSVDLKRRLDSITSSQSSASSG	974
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	EYSPYKRTPRMPNRREVQDQEDPREGDLGLGTSTRLDICTGTAVCTRIG	992
::.*:*:*:* *:* * : : . . *** *:* : : : *		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	FVEEKSLSDVEEEEAPEDLYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRRCIH	1026
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	FVEEKSLSDVEEEEASEELYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRRCIH	1024
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	EQTYKTLQDEQESSD-----WDHLTMDLISYSFQVAKGMEFLASRRCIH	1037
:.* :*.. *.*:*.*.*****		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	RDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPET	1076
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	RDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPET	1074
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	RDLAARNILLSSENSVVKICDFGLARDVYKDPDYVRKGDARLPLKWMAPET	1087
*****:.*.*****:.*.*****:.*.*****:.*.		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	IFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEFCRRLKEGTRMR	1126
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	IFDRVYTIQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEFCRRLKEGTRMR	1124
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	IFDRVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPYPGVCIDESFCRRLKEGTRMR	1137
***** ***** *		
sp P35968 VGFR2_HUMAN 834-1162	APDYTTPEMYQTMLDCWHGEPSPQRPTFSELVEHLGN	1162
sp P35918 VGFR2_MOUSE 832-1160	APDYTTPEMYQTMLDCWHEDPNQRPSFSELVEHLGN	1160
sp Q5GIT4 VGFR2_DANRE 843-1173	APDYATPEIYQTMLDCWLDRLDRPTFTQLVEHLGN	1173
*****:***** * :*:*:*:*****		

Εικόνα 53: Αμινοξικές αλληλουχίες και σύγκριση για τον VEGFR2 του ανθρώπου (UniProt accession number: P35968), του ποντικού (UniProt accession number: P35918) και του zebrafish (UniProt accession number: Q5GIT4). Με μπλε χρώμα οι θέσεις των 4 αμινοξέων Lys868, Glu885, Cys919 και Cys1045 που συνδέονται με τα υπό δοκιμή μόρια. Και τα 4 αμινοξέα είναι συντηρημένα μεταξύ του ανθρώπου και του zebrafish.

4.2B ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΓΙΑ ΤΑ 60 ΜΟΡΙΑ – ΥΠΟΨΗΦΙΟΥΣ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ ΜΕΣΩ VEGFR2

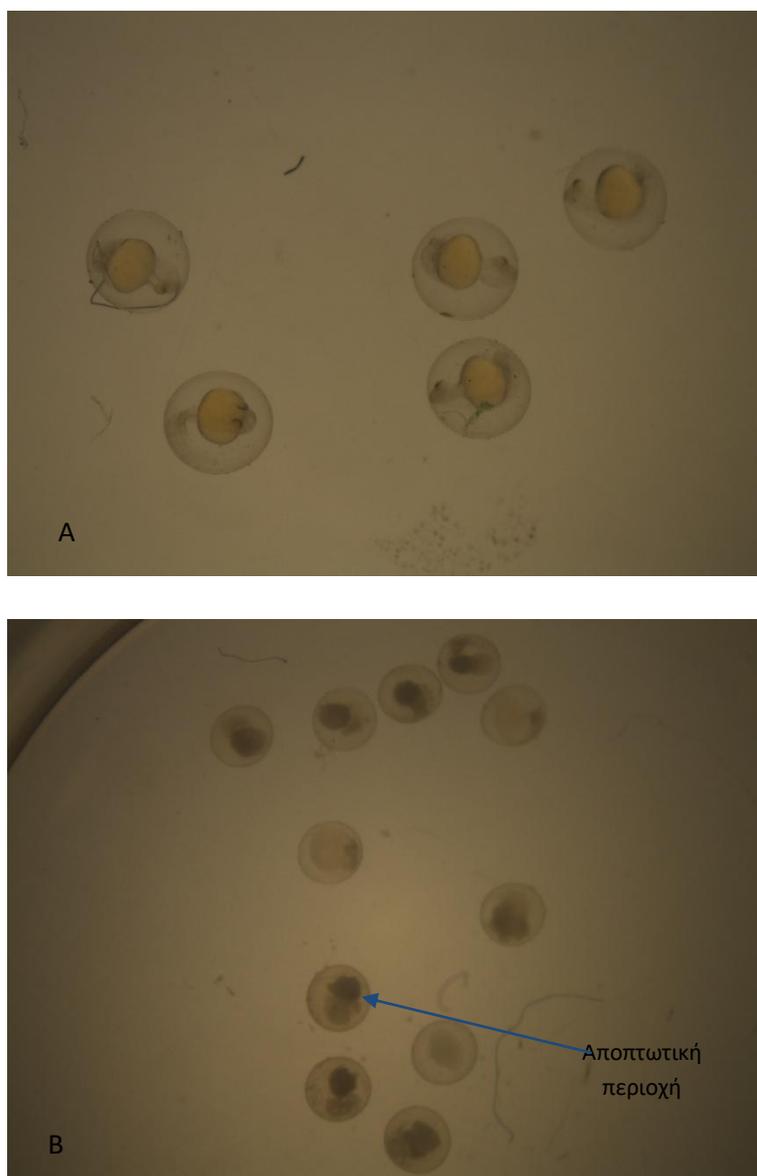
Για τον καλύτερο προσδιορισμό, η επώαση για τη μέτρηση της LC50 έγινε σε δύο αναπτυξιακά στάδια των εμβρύων, στις 4hrf (πριν από τη γαστριδίωση) και στις 22hrf. Επιπλέον, η μέτρηση έγινε και για το μόριο μάρτυρα AAL993 (γνωστός αναστολέας του VEGFR2) και για τα υπόλοιπα 59 μόρια. Η παρατήρηση έγινε στις 72 hrf και σαν νεκρά έμβρυα θεωρήθηκαν τα έμβρυα που δεν εμφάνιζαν κυκλοφορία αίματος. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **πίνακα 4**.

ID	Αναστολή στα 10 μΜ	LC ₅₀ (μΜ) 4 hpf ^(b)	LC ₅₀ (μΜ) (SD) 22 hpf ^(c)
AAL993	+++	5	5 (1)
1	+++	7	7 (1)
2	-	10	13 (2)
3	-	6	6 (1)
11a	-	12	14 (2)
11b	-	25	30 (4)
11c	-	12	9 (2)
11d	-	22	27 (3)
11e	-	22	31 (3)
11f	-	9	12 (1)
11g	-	18	19 (2)
11h	-	22	23 (2)
11i	-	20	22 (2)
11j	-	n.d.	n.d.
11k	-	22	23 (2)
11l	-	30	38 (3)
11m	-	45	45 (5)
11n	-	22	22 (3)
11o	-	22	27 (3)
12a	-	8	11 (2)
12b	-	20	23 (2)
12c	+	18	22 (2)
12d	-	12	12 (1)
12e	-	19	22 (2)
12f	+++	9	9 (2)
12g	-	12	16 (2)
12h	-	17	21 (2)
12i	+++	12	12 (1)
12j	-	13	15 (2)
12k	-	20	23 (2)
12l	-	22	25 (2)
12m	++	14	14 (2)
12n	++	10	11 (2)
12o	-	12	16 (2)

ID	Αναστολή στα 10 μΜ	LC ₅₀ (μΜ) 4 hpf ^(b)	LC ₅₀ (μΜ) (SD) 22 hpf ^(c)
13a	-	n.d.	n.d.
13b	-	10	11 (1)
13c	-	10	6 (1)
13d	-	10	9 (2)
13e	-	32	40 (5)
13f	-	10	10 (1)
13g	-	10	6 (1)
13h	-	n.d.	n.d.
13i	-	30	35 (4)
13j	-	23	15 (2)
13k	-	50	50 (5)
13l	-	20	25 (3)
13m	-	n.d.	n.d.
13n	-	n.d.	n.d.
13o	-	n.d.	n.d.
14a	-	n.d.	n.d.
14b	-	8	11 (2)
14c	-	22	22 (2)
14d	-	50	50 (5)
14e	-	19	13 (2)
14f	-	5	7 (1)
14g	-	10	5 (1)
14h	-	n.d.	n.d.
14i	-	10	9 (2)
14j	-	n.d.	n.d.
14k	-	n.d.	n.d.
14l	-	13	8 (1)
14m	-	n.d.	n.d.
14n	-	5	5 (1)
14o	-	50	50 (5)

Πίνακας 4: Η LC₅₀ υπολογίστηκε στις 72 hpf με βάση την έλειψη κυκλοφορίας του αίματος. Η επώαση ξεκίνησε στις 4 hpf και στις 22 hpf. n.d., δεν υπολογίστηκε η LC₅₀ λόγω δημιουργίας ιζήματος των διαλυμάτων των μορίων. Επιπλέον, στον πίνακα αναφέρεται και η αναστολή της αγγειογένεσης που προκαλεί κάθε μόριο. (-) αναστολή κάτω από <5%, (+) αναστολή 5%–25%, (++) 25%–75% και (+++) για >75%.

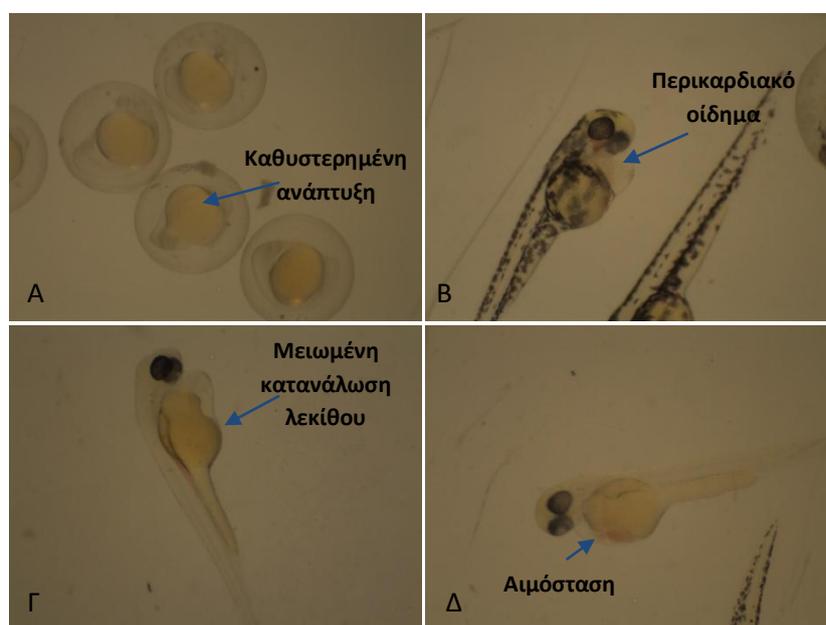
Στον πρώτο έλεγχο της τοξικότητας με επώαση στις 4hrf, η πλειοψηφία των μορίων εμφανίζεται με ίση ή μεγαλύτερη τοξικότητα απ' ό,τι στην επώαση στις 24hrf, επειδή δεν έχει ολοκληρωθεί το ευαίσθητο και σημαντικότερο στάδιο της γαστριδίωσης, παρά την παρουσία του χορίου στο στάδιο αυτό κατά την επώαση (Εικ. 54).



Εικόνα 54: Έμβρυα zebrafish 24hrf χωρίς επώαση (A) και με επώαση (B) στις 4hrf με το μόριο 13e σε συγκέντρωση 50µM. Παρατηρείται καθυστέρηση στην ανάπτυξη και θάνατος (αποπτωτικές περιοχές). (μεγέθυνση x20, X10)

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των ελέγχων, στις συγκεντρώσεις άνω της LC50 για κάθε μόριο, οι φαινότυποι που παρατηρήθηκαν στα έμβρυα, σχετίζονταν με

καθυστερημένη ανάπτυξη και μειωμένη κατανάλωση της λεκίθου, αιμόσταση και με περικαρδιακό οίδημα (Εικ. 55).



Εικόνα 55: Χαρακτηριστικοί φαινότυποι σε έμβρυα που επώαστηκαν στις 24hrpf. **A.** Καθυστέρηση στην ανάπτυξη **B.** περικαρδιακό οίδημα **Γ.** μειωμένη κατανάλωση λεκίθου **Δ.** Αιμόσταση. Έχουν χρησιμοποιηθεί casper (μεταλλαγμένα έμβρυα που δεν αναπτύσσουν μελανοκύτταρα) και WT έμβρυα. (μεγέθυνση X10)

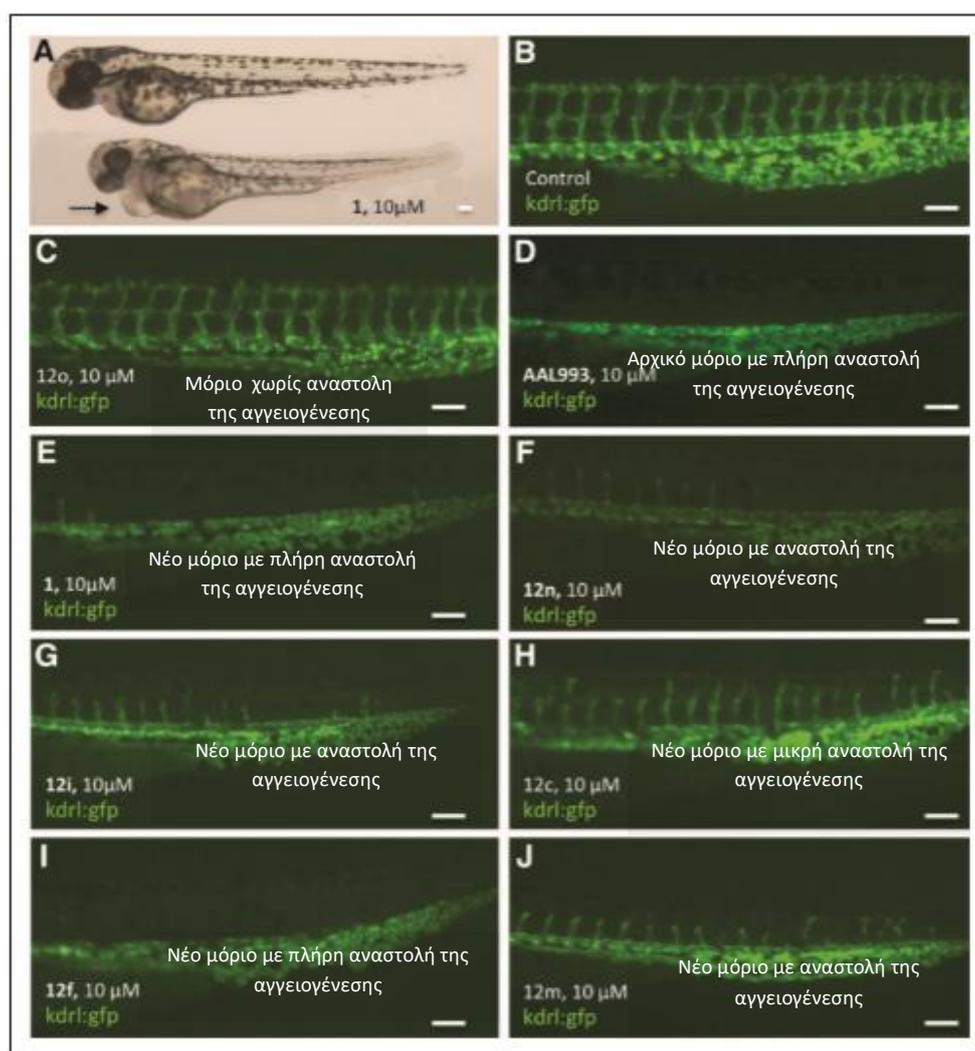
Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί πως σε 11 από τα 60 μόρια, δεν κατέστη εφικτό να πραγματοποιηθούν μετρήσεις διότι δεν διαλυτοποιούνταν και εμφάνιζαν ίζημα. Τα 10 από τα 11 μόρια έχουν ρίζα το 4-νιτροφενυλιο και το άλλο μόριο την 3-μεθυλπυριδίνη.

4.3B ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ 6 ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Το δεύτερο μέρος του χημικού γενετικού ελέγχου περιλάμβανε τον έλεγχο ειδικότητας των υποψήφιων μορίων για αναστολή της αγγειογένεσης μέσω του VEGFR2. Επειδή οι συγκεντρώσεις των μορίων θα έπρεπε να είναι μη θνησιγόνες λόγω τοξικότητας,

ελέγχθηκαν συγκεντρώσεις οι οποίες δεν υπερέβαιναν τη LC_{50} κάθε μορίου. Με τη βοήθεια της διαγονιδιακής σειράς zebrafish **Tg:kdr1:egfp**, έγινε επώαση εμβρύων πριν το στάδιο έναρξης της αγγειογένεσης (πριν τις 24hpf) και παρατηρήθηκε σε στερεοσκόπιο φθορισμού η ικανότητα των εμβρύων να σχηματίσουν τα αγγεία που διατρέχουν τους σωμίτες (Intersegmental vessels – ISVs), αφού σε αυτά απαιτείται ενεργοποίηση γονιδίων μέσω του μονοπατιού του VEGFR2.

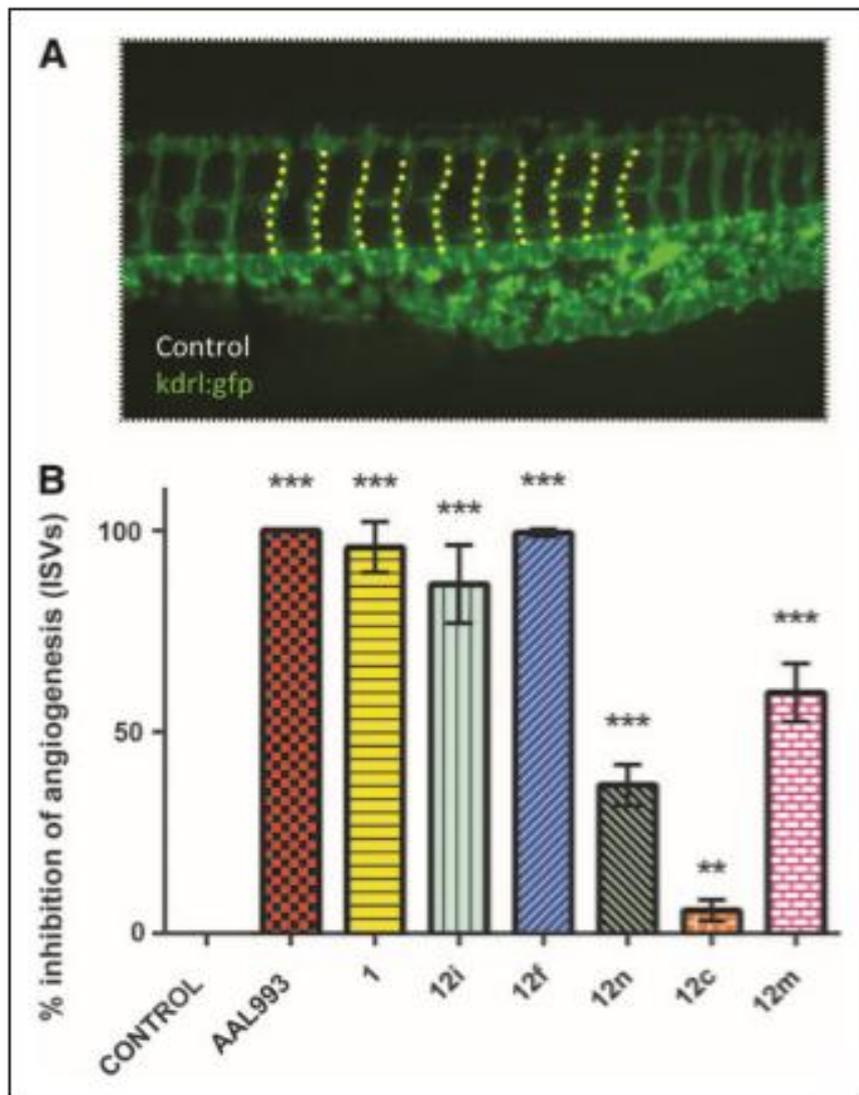
Από τον έλεγχο και τη σύγκριση με το γνωστό μόριο αναστολέα ALL993, ταυτοποιήθηκαν 6 νέα μόρια τα οποία προκάλεσαν αναστολή της αγγειογένεσης στα έμβρυα (Εικ. 56). Για την άμεση σύγκριση της αναστολής της αγγειογένεσης που προκαλούν τα 6 νέα μόρια, χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 10 μ M.



Εικόνα 56: (A) Εικόνα από οπτικό μικροσκόπιο η οποία δείχνει το φαινότυπο ενός εμβρύου 72 hpf και ενός εμβρύου στην ίδια ηλικία που έχει επωαστεί με τον αναστολέα 1 στα 10 μ M. Παρατηρείται περικαρδιακό οίδημα που οφείλεται στην ελαττωματική αγγειογένεση και κυκλοφορία του αίματος. (B–J) Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού

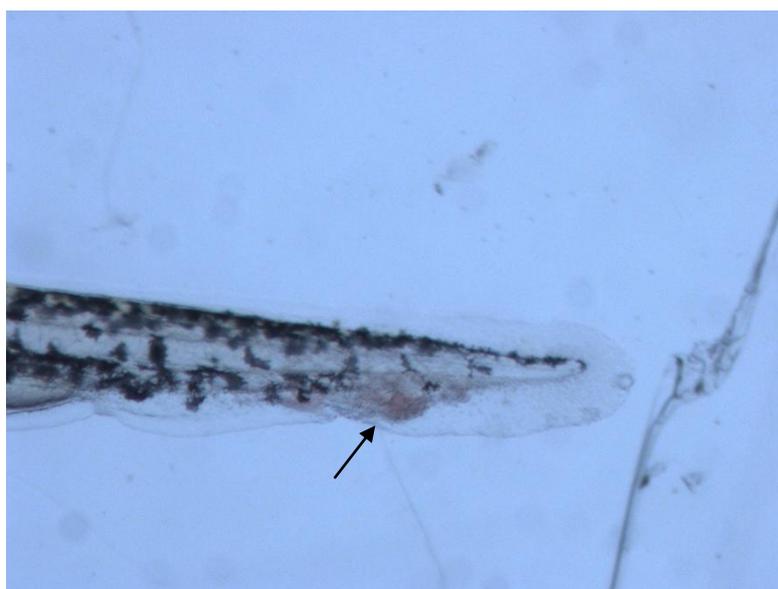
σε έμβρυα 50hrf που φέρουν το διαγονίδιο Tg(kdr1:gfp)s843 (B) ή που έχουν επωαστεί για 20 τις- 50 hrf σε συγκέντρωση 10 μ M με τα εξής μόρια : [12o] (C), AAL993 (D), [1] (E), [12n] (F), [12i] (G), [12c] (H), [12f] (I), [12m] (J). [12o] (C) είναι ένα αντιπροσωπευτικό μόριο σε συγκέντρωση 10 μ M, το οποίο δεν δημιουργεί αναστολή της αγγειογένεσης. Κλίμακα 100 μ m

Έπειτα, για τη στατιστική ανάλυση μετρήθηκε το μήκος των 10 διατμηματικών αγγείων που βρίσκονται στην άκρη της επέκτασης της λεκίθου (yolk extension) σε συγκέντρωση των μορίων 10 μ M. Ο τρόπος της ανάλυσης αλλά και τα αποτελέσματα της φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα: (Εικ. 57)



Εικόνα 57: Ποσοτική ανάλυση της αναστολής της αγγειογένεσης. (A) Οι στικτές κίτρινες γραμμές υποδεικνύουν τα διατμηματικά αγγεία που μετρήθηκαν για την ποσοτικοποίηση με τη βοήθεια του προγράμματος ImageJ. (B) Το συνολικό μέγεθος των 10 ISVs μετρήθηκε σε τουλάχιστον 20 έμβρυα από τρία ανεξάρτητα πειράματα, για κάθε ένα από τα 6 μόρια που εμφάνισαν αναστολή της αγγειογένεσης, αλλά και του αρχικού μορίου AAL993. **P<0.05, ***P<0.005

Στα έμβρυα που επώαστηκαν με αυτά τα μόρια παρατηρήθηκε και εμφάνιση δευτερογενών φαινοτύπων, λόγω διαταραχής της αγγειογένεσης. Η κυκλοφορία του αίματος ήταν μειωμένη, εμφανιζόταν περικαρδιακό οίδημα, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται και θρόμβος κοντά στο ουραίο πτερύγιο (Εικ. 58). Ο πιο χαρακτηριστικός φαινότυπος όμως ήταν αυτός κατά τον οποίο οι δύο θάλαμοι της καρδιάς παρέμεναν σχεδόν ευθυγραμμισμένοι, χωρίς να έχει γίνει σωστή συστροφή (looping).



Εικόνα 58: Ανίχνευση θρόμβου στο ουραίο πτερύγιο εμβρύου που είχε επωαστεί με το αντιαγγειογενετικό μόριο A3, λόγω της επακόλουθης μειωμένης ροής του αίματος (μεγέθυνση X40)

4.4B ΈΛΕΓΧΟΣ ΒΙΟΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗΣ

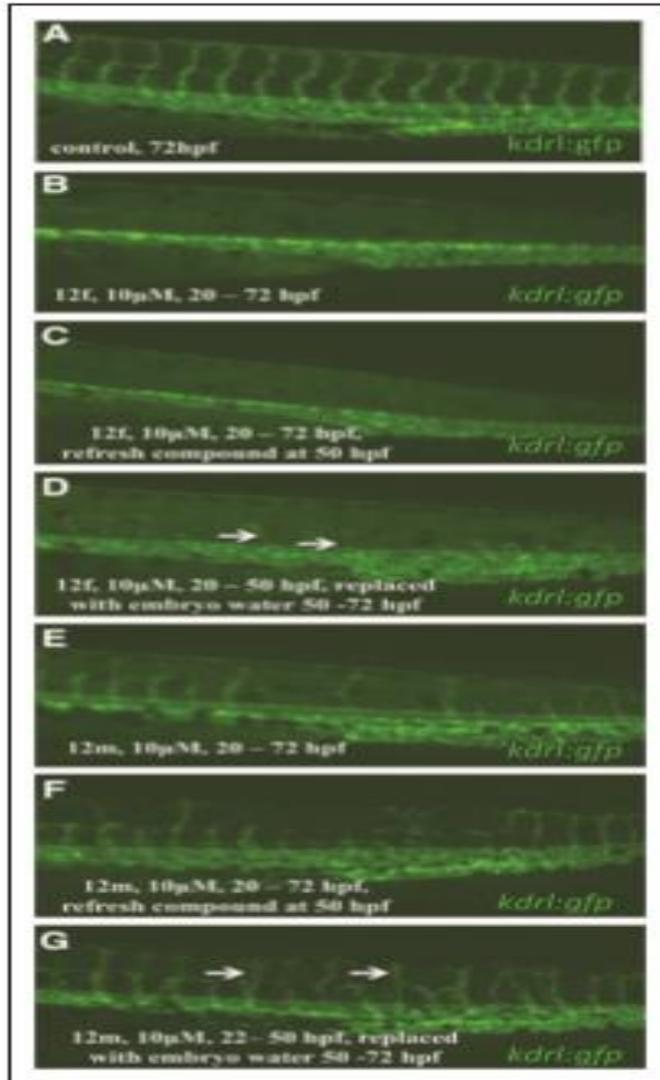
ΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ 6 ΝΕΩΝ ΜΟΡΙΩΝ – ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΤΗΣ

ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Για τον έλεγχο της βιοενεργότητας δηλαδή της διατήρησης των βιολογικών αποτελεσμάτων κατά τη διάρκεια της 28ώρης (22-50hrf) επώασης των παραπάνω πειραμάτων, έγινε επαναπροσθήκη φρέσκων διαλυμάτων των μορίων στις 50 hrf και επώαση μέχρι τις 72 hrf. Το αποτέλεσμα όπως φαίνεται και στην Εικ. 59 είναι πως δεν υπάρχει επιπλέον αναστολή της αγγειογένεσης μετά την επαναπροσθήκη των φρέσκων διαλυμάτων. Συμπερασματικά, η βιοενεργότητα των συγκεκριμένων μορίων παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της επώασης.

Για τη διερεύνηση της πιθανότητας αντιστρεπτής δράσης των 6 νέων μορίων – αναστολέων το πείραμα πραγματοποιήθηκε όπως στον έλεγχο βιοενεργότητας με τη διαφορά πως στις 50 hrf το διάλυμα των μορίων αντικαταστάθηκε με EW. Το αποτέλεσμα ήταν να αναιρείται η αναστολή της αγγειογένεσης και να δημιουργούνται αγγεία, όπως φαίνεται και στην Εικ. 59. Συνεπώς, η δράση των αναστολέων είναι αντιστρεπτή.

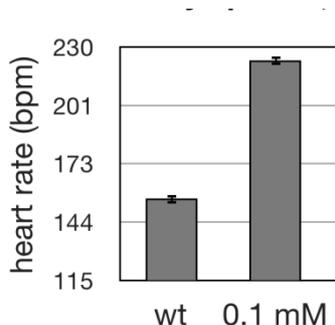
Πραγματοποιήθηκαν 3 ανεξάρτητα πειράματα και χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα από 20 έμβρυα για κάθε μόριο.



Εικόνα 59: Εικόνες από μικροσκόπιο φθορισμού εμβρύου 72 hpf που αναπτύχθηκε σε EW (A), έμβρυα 72 hpf που επωάστηκαν σε συγκέντρωση 10 μ M με το μόριο [12f] (B–D) και το μόριο [12m] (E–G) (63X μεγέθυνση). Η αναστολή της αγγειογένεσης είναι ορατή όταν τα μόρια παρέμεναν μέχρι τις 72 hpf. (B, E). Έπειτα από ανανέωση με φρέσκα διαλύματα μορίων στις 50 hpf, δεν παρατηρήθηκε επιπλέον αναστολή της αγγειογένεσης. (C, F, σε σύγκριση με B, E). Έπειτα από την αντικατάσταση των διαλυμάτων των μορίων με EW στις 50 hpf, παρατηρήθηκε πως δημιουργούνται ISVs από προϋπάρχοντα αγγεία. (βέλη στα D, G σε σύγκριση με τα B, E).

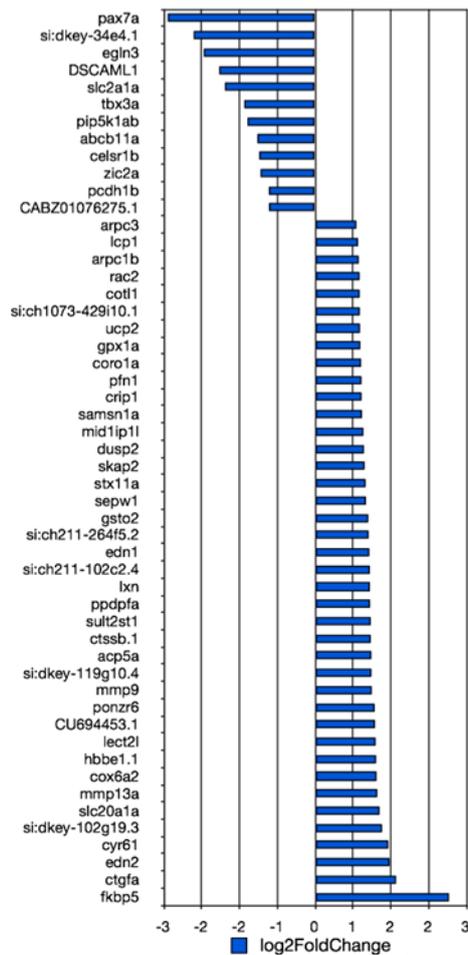
4Γ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΜΗΤΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ

Για τη μελέτη της απόκρισης των ενδοθηλιακών κυττάρων σε μεταβολή της διατμητικής τάσης πραγματοποιήθηκε επώαση εμβρύων 48 ωρών μετά τη γονιμοποίηση με φαινυλεφρίνη (ώστε να μεταβληθεί η διατμητική τάση) και έπειτα έγινε διαλογή των ενδοθηλιακών κυττάρων της καρδιάς με τη βοήθεια της τεχνικής της κυτταρομετρίας ροής. Η συγκέντρωση της φαινυλεφρίνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100 μM έπειτα από έλεγχο της καρδιακής συχνότητας αλλά και της τοξικότητας (Εικ. 60).



Εικόνα 60: Στα 100 μM φαινυλεφρίνης παρατηρείται αύξηση του καρδιακού ρυθμού.

Έπειτα, με τη διαδικασία της ανάλυσης αλληλουχίας του RNA (RNA-seq) και την ανάλυση των δεδομένων από αυτήν, επιλέχθηκαν 52 γονίδια που σχετίζονται με μεταβολές της διατμητικής τάσης (Εικ. 61). Η ανάλυση αλληλουχίας RNA πραγματοποιήθηκε από τη μεταδιδάκτορα του εργαστηρίου Claudia Roedel (μη δημοσιευμένα αποτελέσματα εργαστηρίου Δρ. Μπέη).



Εικόνα 61 : Τα 52 γονίδια που προέκυψαν μετά την ανάλυση αλληλουχίας του RNA και σχετίζονται με τις αλλαγές τις διατμητικής τάσης.

4.1Γ ΓΟΝΙΔΙΑ ΠΟΥ ΣΧΕΤΙΖΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΥΚΛΟΦΟΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ ΜΕ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΤΟΥ

Έπειτα από ενδελεχή βιβλιογραφική ανάλυση και των 52 γονιδίων, αναδύθηκαν τα 36 που σχετίζονταν με το κυκλοφορικό σύστημα ως τα πιο πιθανά υποψήφια για να συμμετέχουν στη μεταβολή της διατμητικής τάσης. Άλλοι παράγοντες που εξετάστηκαν ώστε να επιλέγει το καταλληλότερο γονίδιο ήταν α) η διαφοροποίηση του μεταγραφώματος κατά την αλλαγή της διατμητικής τάσης β) η συσχέτισή του με αλλαγές στη δομή ή στη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων δ) αν αφορά κάποιον

μεταγραφικό παράγοντα δ) η συσχέτισή του με ασθένειες του κυκλοφορικού συστήματος.

Πίνακας 4: Γονίδια που σχετίζονται με το κυκλοφορικό σύστημα (κόκκινο χρώμα) και γονίδια που σχετίζονται με την καρδιά συγκεκριμένα (έντονο κόκκινο χρώμα).

Γονίδιο	Ρόλος
pax7a ENSDARG00000005173	Μεταγραφικός παράγοντας
si:dkey-34e4.1 ENSDARG00000022085	Συνθάση νιτρικού οξειδίου
egln3 ENSDARG00000032553	Δέσμευση σιδήρου
tbx3a ENSDARG00000002216	Μεταγραφικός παράγοντας
slc2a1a ENSDARG00000001437	Διαμεμβρανικός μεταφορέας γλυκόζης
fkbp5 ENSDARG00000028396	Σύνδεση με FK506, ραπαμυκίνη και με πρωτεΐνες θερμικού σοκ
ctgfa ENSDARG00000042934	Δράση αυξητικού παράγοντα
cyr61 ENSDARG00000023062	Δράση αυξητικού παράγοντα σαν της ινσουλίνης
edn2 ENSDARG00000070578	Ρυθμιστής της αγγειοσυστολής
edn1 ENSDARG00000036912	Ρυθμιστής της αγγειοσυστολής
si:dkey-102g19.3 ENSDARG00000086337	Άγνωστος
slc20a1a ENSDARG00000020114	Μεταφορέας φωσφορικού νατρίου
cox6a2 ENSDARG00000054588	Ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας του μιτοχονδρίου
hbbe1.1 ENSDARG00000087390	Δέσμευση σιδήρου και οξυγόνου
mmp9 ENSDARG00000042816	Μεταλλοπεπτιδάση
ctssb.1 ENSDARG00000074656	Πρωτεΐνάση του λυσοσώματος

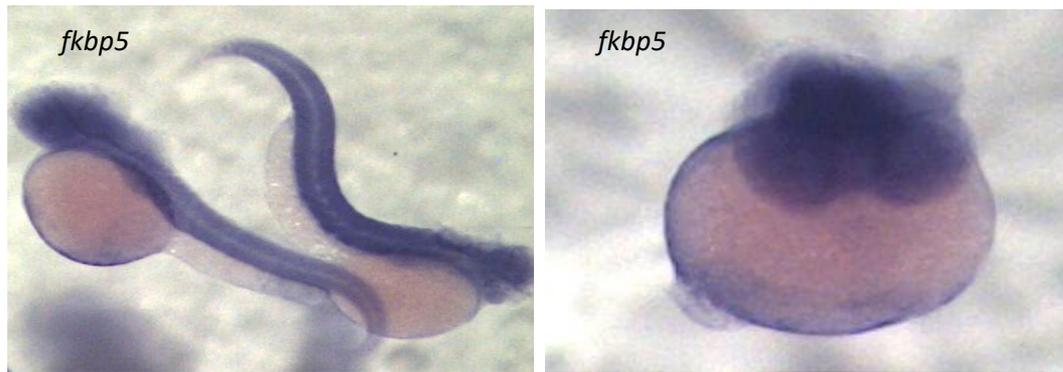
sult2st1 ENSDARG00000033170	Μεταφορέας θείου
ppdpfa ENSDARG00000007682	Ρυθμιστής της ανάπτυξης του παγκρέατος
lxn ENSDARG00000043102	Αναστολέας μεταλλοπεπτιδασών
si:ch211-102c2.4 ENSDARG00000079387	Άγνωστος
si:ch211-264f5.2 ENSDARG00000078547	Άγνωστος
gsto2 ENSDARG00000033285	Δράση οξειδοοξειδοκτάσης
sepw1 ENSDARG00000035136	Δέσμευση σεληνίου
stx11a ENSDARG00000044039	Παράγοντας που βοηθά στη σύντηξη ενδοκυτταρικών κυστιδίων
dup2 ENSDARG00000036572	Κινάση σχετιζόμενη με τη μίτωση
mid1ip1l ENSDARG00000018145	Ρύθμιση κυτταροσκελετού
samsn1a ENSDARG00000054543	Δέσμευση φωσφωτυροσίνης
crip1 ENSDARG00000053858	Μέλος της οικογένειας των δακτύλων ψευδαργύρου
pfn1 ENSDARG00000088091	Δεσμευτής μικρών μορίων ακτίνης
coro1a ENSDARG00000054610	Συστατικό κυτταροσκελετού
gpx1a ENSDARG00000018146	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
ucp2 ENSDARG00000043154	Μεταφορέας πρωτεϊνών στο μιτοχόνδριο
cotl1 ENSDARG00000026829	Δεσμευτής ακτίνης
arpc1b ENSDARG00000027063	Συστατικό του κυτταροσκελετού
lcp1 ENSDARG00000023188	Δεσμευτής ακτίνης
arpc3 ENSDARG00000057882	Συστατικό του κυτταροσκελετού

Πρωτίστως, αναδείχθηκε το γονίδιο **FK506 που δεσμεύει την πρωτεΐνη 5 (*fkbp5*)**, το οποίο ήταν το γονίδιο της λίστας της ανάλυσης αλληλουχίας του RNA με τη μεγαλύτερη αύξηση στο μεταγράψωμα (6,2 φορές). Επιπλέον, βιβλιογραφικές αναφορές υποστηρίζουν πως συμμετέχει σε αναγεννητικές διαδικασίες, καθώς και ότι σχετίζεται με την κολπική μαρμαρυγή (Chiang et al., 2015). Με βάση τα παραπάνω, επιλέχθηκε το συγκεκριμένο γονίδιο ώστε να πραγματοποιηθεί μόνιμη αποσιώπηση αυτού με τη μέθοδο CRISPR-Cas9 αλλά και για *in situ* υβριδοποίηση.

4.2Γ In situ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ

Παράλληλα, για να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχει έκφραση του γονιδίου *fkbp5* στο κυκλοφορικό σύστημα και ακόμη περισσότερο στην καρδιά ή στις βαλβίδες, πραγματοποιήθηκε η μέθοδος του *in situ* υβριδισμού. Αρχικά, δημιουργώντας τον κατάλληλο ιχνηθέτη και έπειτα χρησιμοποιώντας έμβρυα 48 hpf μετά από την επίδραση φαινυλεφρίνης 100 nM για 30 λεπτά και τη μονιμοποίησή τους, πραγματοποιήθηκε ο υβριδισμός. Σαν θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ο ιχνηθέτης για τα γονίδια *ctgfa* (αυξητικός παράγοντας α του συνδετικού ιστού, connective tissue growth factor α) και *hbbe1.1* (εμβρυονική β-αιμοσφαρίνη 1.1, hemoglobin beta embryonic-1.1) (Εικ. 62).





Εικόνα 62 : Έμβρυα 48 hpf όπου φαίνεται η έκφραση των γονιδίων *fkbp5* (μετά από επώαση με φαινυλεφρίνη), *ctgfa*, *hbbe1.1* (X20)
 Η έκφραση του *fkbp5* δεν φαίνεται να περιορίζεται μόνο στο καρδιαγγειακό σύστημα.

4.3Γ CRISPR fkbp5

Για το γονίδιο *fkbp5* σχεδιάστηκε να πραγματοποιηθεί η στοχευμένη μεταλλαγμένη στο εξώνιο 2 και παρακάτω δίνεται το προϊόν που παράγεται από τους εκκινητές που έχουν επιλεγεί. Σε αυτό το προϊόν με πράσινο χρώμα υποδεικνύεται η περιοχή που επιλέχθηκε ως αλληλουχία-στόχος για τη μέθοδο CRISPR-Cas9.

TGCATGCACATTTGAGCTTGTCTTTTGTGAGAATAATAAATAGCATTGTTTTCA
GGGTTTGATGTGTAAGCAAAGCTAGCCAGCATTACAATAAAAAGGATTAGAAAATA
ATTCTGTATGAAAATAGGTTTCAAGTGTATATTGCAATTTGGCTGGCAACATTTG
AATTTGTCTAAAGATAGCAGTGCCTTATTATATTTGTCAAAGATAAAGGGGAAAT
GTTGTATGCTTGTTTTTATAGGGGAACAAGGGCATGTATGAGTGGTGAGATGTC
ATCATTAGAGGATATCTTTTCCA **CGAACCAGTGCCCGACT** GCTGTCTTTACCTCC
CGAGGCACTGCTGTCACTCCAAACGGTGACAGTGGAGTATGCAAGGTAATCCA
GTCATTAGTAACACTATATCACAACAATTTGACATGTTTCCCAGTGTCAATAAATG
ACACAGCCGTGCACCTCTTTACCTGTTTAATATAGCATTGTTTCTTAAAATAAAAC
AATATGATGGTTTATTAGATTAGCCAGAAATATTTGGAATGTTTTCGGGAATTTG
CCAAAAGAACAACACTGCGCTCC

4.4Γ ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ

Πραγματοποιήθηκαν μικροενέσεις με τον RNA-οδηγό (25 ng/μl και 50 ng/μl) για το συγκεκριμένο γονίδιο σε συνδυασμό με την Cas9 με ψάρια αγρίου τύπου. Επιτυχημένες μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν σε περίπου 200 έμβρυα και από αυτά επέζησαν έως την ενήλικη ζωή 120. Διασταυρώθηκαν ~20 ψάρια της F0 γενιάς και από τα έμβρυα που προέκυψαν απομονώθηκε το DNA και στάλθηκε για ανάλυση της αλληλουχίας του DNA. Από αυτά δεν βρέθηκε κάποιο ψάρι να φέρει μετάλλαξη που να κληρονομείται.

4.5Γ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΟΥ ΖΩΟΥ ΠΟΥ ΝΑ

ΑΠΟΚΡΙΝΕΤΑΙ in vivo ΣΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΜΗΤΙΚΗΣ ΤΑΣΗΣ

Για την κατασκευή του διαγονιδιακού ζώου, πραγματοποιήθηκε ανάλυση μέσω του προγράμματος MEME για την εύρεση κοινών αλληλουχιών και κοινών μεταγραφικών παραγόντων μεταξύ των 52 γονιδίων (πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο του Δρ Σπύρου). Με το πρόγραμμα genomatix αρχικά διαχωρίστηκαν τα 52 γονίδια σε 2 ομάδες: σε αυτά που είχαν αυξημένο μεταγράψωμα (40 γονίδια) και σε αυτά που είχαν μειωμένο (12 γονίδια). Έπειτα, βρέθηκαν κοινές αλληλουχίες και κοινοί μεταγραφικοί παράγοντες για κάθε μια από τις 2 ομάδες ξεχωριστά. Για την πρώτη ομάδα μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα είχε η αλληλουχία TAATA και ο μεταγραφικός παράγοντας ATB και για τη δεύτερη η αλληλουχία TAATTA και ο μεταγραφικός παράγοντας NKX1.

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με το πρόγραμμα MEME επιλέχτηκαν οι εξής αλληλουχίες οι οποίες έχουν τη μεγαλύτερη στατιστική σημαντικότητα: MACACACA με E-value 4.0e-007, GGGGAAA με E-value 5.0e-004 και CAGCRGA με E-value 5.4e004 (Εικ 63, 64).

	Motif	Logo	RC Logo	E-value	Unersased E-value
1.	MACACACA			4.0e-007	4.0e-007
2.	GGGGGAAA			5.0e-004	5.0e-004
3.	CAGCRGA			5.4e-004	5.4e-004
4.	GAACYGCC			3.5e-003	3.5e-003
5.	GCGMCC			5.9e-003	2.0e-003
6.	CCTCCTC			7.4e-003	7.4e-003
7.	AAAAAAAA			1.9e-002	1.9e-002
8.	ATRAATGA			2.3e-002	2.3e-002
9.	CCWCACAG			4.2e-002	1.7e-002
10.	AAWATATA			4.6e-002	4.6e-002

Εικόνα 63 : κοινές αλληλουχίες που βρέθηκαν μετά από ανάλυση με το πρόγραμμα Genomatix. Όπου M = A ή C, R = A ή G, Y = C ή T, W = A ή T

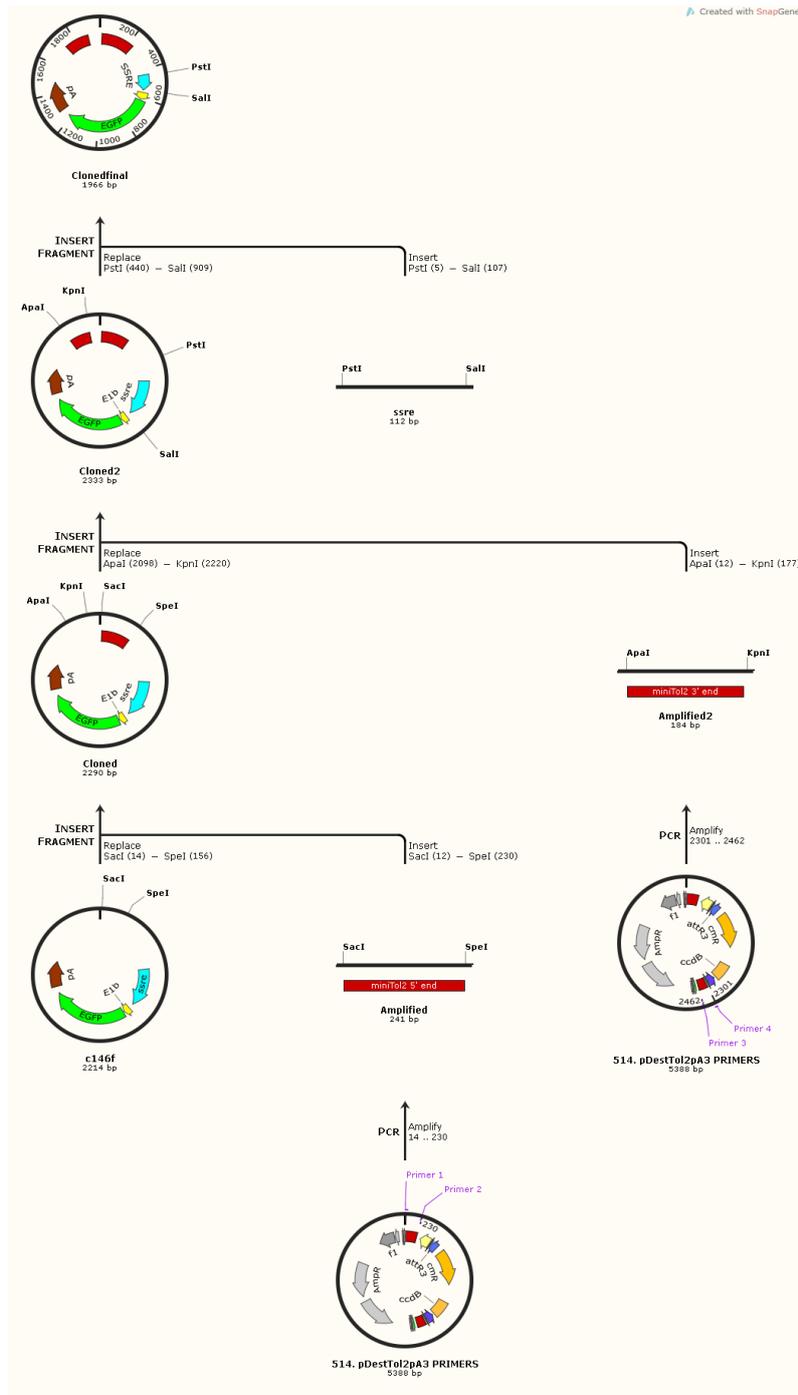
Name ?	Alt. Name ?	Preview ?	Matches ?	List ?
MACACACA	DREME		11	MA0493.1 (Klf1), MA0472.1 (EGR2), MA0039.2 (Klf4), MA0511.1 (RUNX2), MA0006.1 (Arnt::Ahr), MA0009.1 (T), MA0041.1 MA0002.2 (RUNX1), MA0042.1 (FOXI1), MA0073.1 (RREB1) MA0057.1 (MZF1_5-13), MA0470.1 (E2F4), MA0065.2 (PPARG::RXRA), MA0056.1 (MZF1_1-4), MA0471.1 (E2F6), MA0024.2 (E2F1), MA0152.1 (NFATC2), MA0105.3 (NFKB1), MA0155.1 (INSM1), MA0017.1 (NR2F1) MA0501.1 (NFE2::MAF), MA0081.1 (SPIB), MA0014.2 (PAX5), MA0139.1 (CTCF), MA0521.1 (Tcf12), MA0591.1 (Bach1::Mafk), MA0522.1 (Tcf3), MA0154 MA0496.1 (MAFK), MA05
GGGGGAAA	DREME		16	
CAGCRGA	DREME		10	

Εικόνα 64: Απεικονίζονται οι συσχετίσεις μεταξύ κοινών αλληλουχιών με μεταγραφικούς παράγοντες

Ο τεχνητός υποκινητής που δημιουργήθηκε, αποτελείται από 8 επαναλήψεις της μίας από τις 3 αλληλουχίες που προέκυψαν από βιοπληροφορική ανάλυση και από έναν υποκινητή που εμπεριέχει την αρχική θέση μεταγραφής και την TATA αλληλουχία. Το πλασμίδιο, επίσης, εμπεριέχει ένα γονίδιο αναφοράς που θα παράγει πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp), ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί *in vivo* η αλλαγή στη διατμητική τάση. Στη συνέχεια, εισήχθησαν στο πλασμίδιο στοιχεία του μεταθετού συστήματος *tol2*, τα οποία συμβάλλουν στη μεγαλύτερη αποδοτικότητα της διαγένεσης (από 1-3% που είναι τα ποσοστά διαγένεσης χωρίς τη χρήση αυτού του συστήματος προσεγγίζει στο 50% με τη χρήση του). Έπειτα, δημιουργήθηκε

mRNA για την tol2 μετατάση η οποία θα κόψει τα tol2 άκρα με τελικό σκοπό να ενθέσει μόνο τα σημαντικά στοιχεία που προαναφέρθηκαν και βρίσκονται ανάμεσα σε αυτά τα άκρα και όχι σε ολόκληρο το πλασμίδιο.

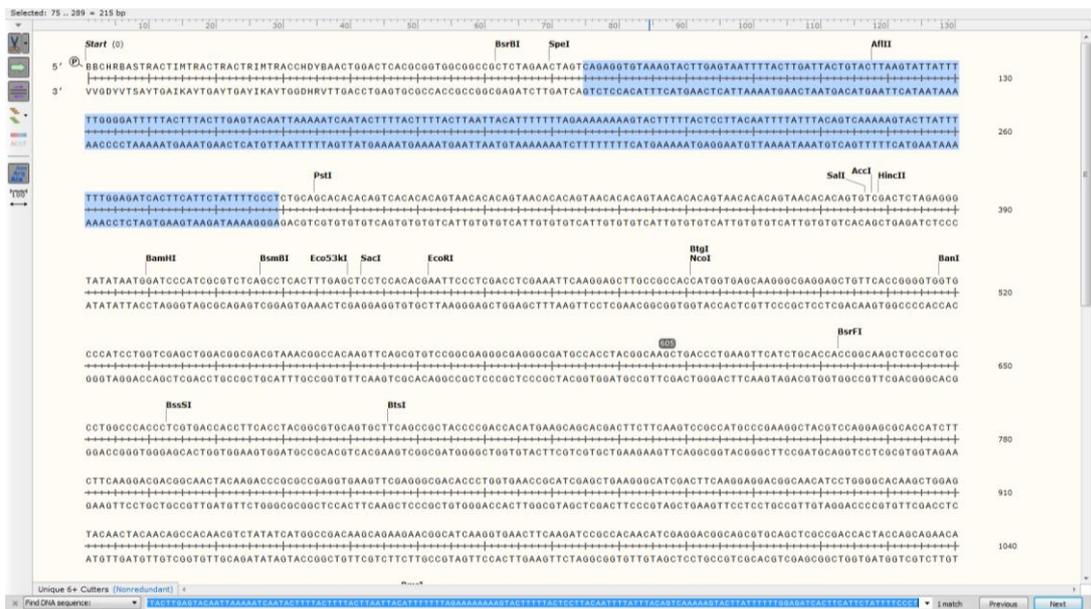
Όπως προαναφέρθηκε στα υλικά και μεθόδους (κεφάλαιο 3.21) η διαδικασία σχηματικά και περιληπτικά ήταν η εξής : (Εικ. 65)



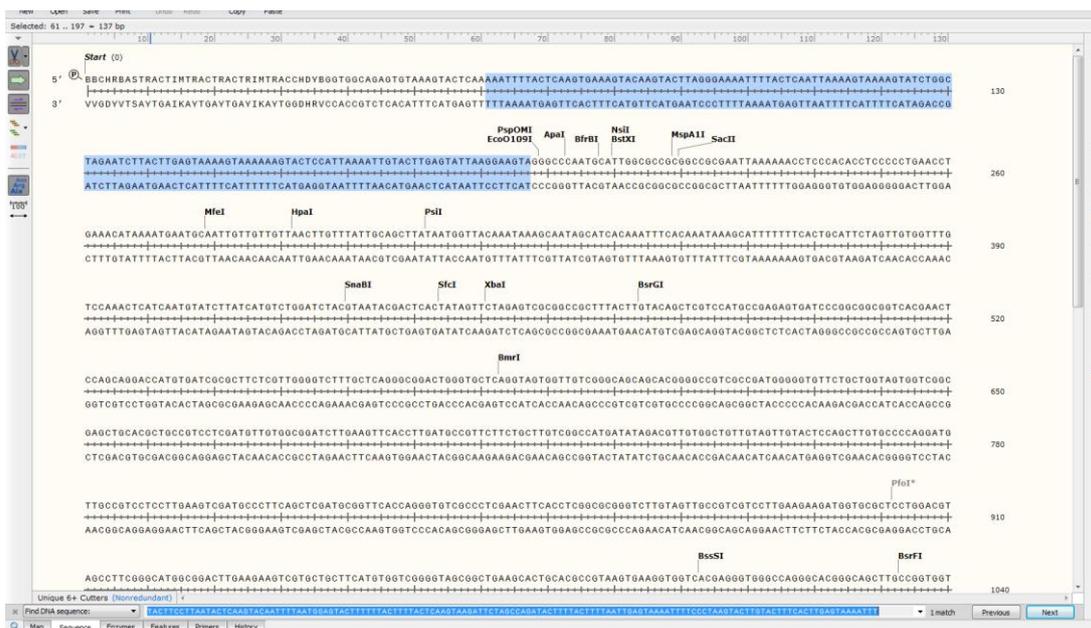
Εικόνα 65: Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία του τελικού πλασμιδίου όπως δημιουργήθηκε μέσω του προγράμματος snarpgene.

Πράγματι, όπως φαίνεται μετά από την αλληλούχηση βάσεων, εισήχθησαν στο πλασμίδιο τόσο τα *tol2* άκρα όσο και το SSRE (Εικ. 66)

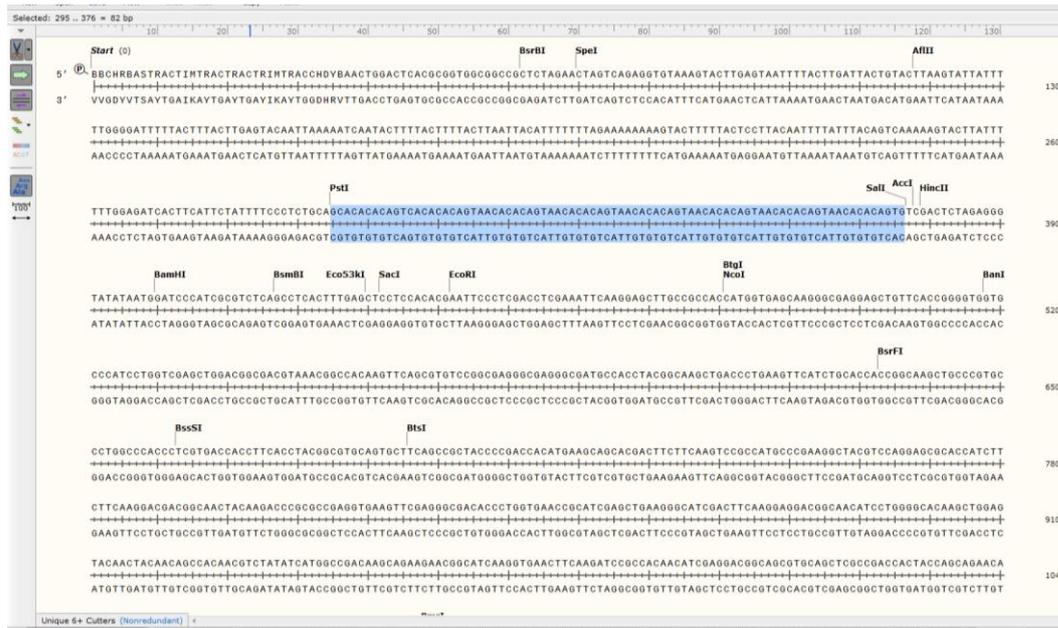
A.



B.



Γ.



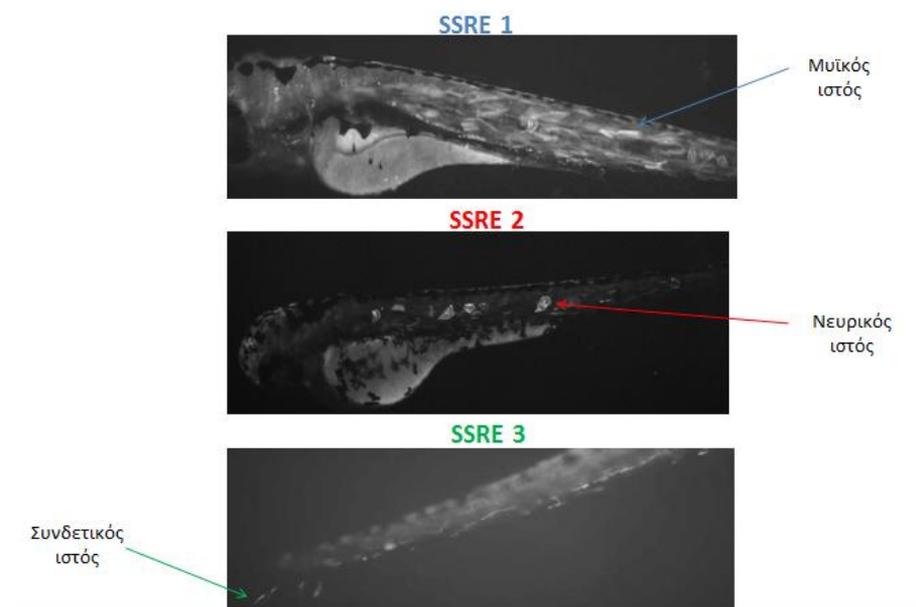
Εικόνα 66: Μετά από έλεγχο μέσω αλληλούχησης διαπιστώθηκε πως είχαν τοποθετηθεί σωστά τα άκρα tol2 (A, B) και η SSRE αλληλουχία (Γ)

Έπειτα, δημιουργήθηκε capped mRNA για την tol2 μεταθετάση η οποία θα κόψει στα tol2 άκρα, με τελικό σκοπό να ενθέσει μόνο τα σημαντικά στοιχεία που προαναφέρθηκαν και βρίσκονται ανάμεσα σε αυτά τα άκρα και όχι ολόκληρο το πλασμίδιο.

4.6Γ ΜΙΚΡΟΕΝΕΣΕΙΣ ΤΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ SSRE ΜΕ TOL2 ΑΚΡΑ

Για τις μικροενέσεις χρησιμοποιήθηκαν 50 pg/έμβρυο για τη μεταθετάση και 50 pg/έμβρυο για το καθένα από τα 3 πλασμίδια που δημιουργήθηκαν. Οι μικροενέσεις πραγματοποιήθηκαν στο στάδιο του ζυγωτού (Εικ. 68).

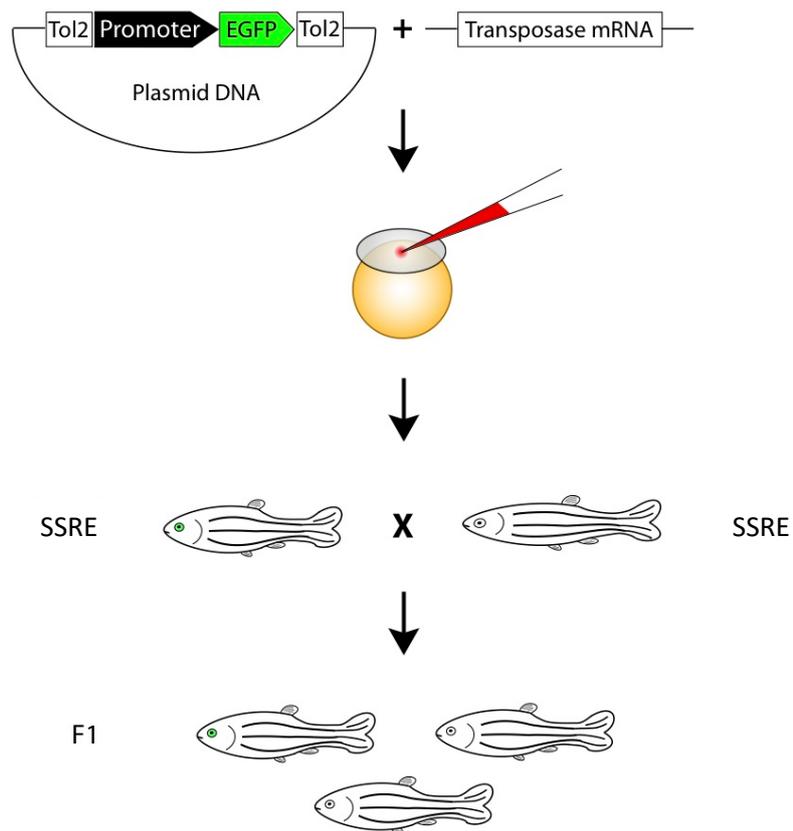
Αποτελέσματα των μικροενέσεων στην F0 γενιά : για το πρώτο μοτίβο παρατηρήθηκε σήμα gfr σε δομές του μυϊκού ιστού (σε 23 έμβρυα από σύνολο 82), για το δεύτερο μοτίβο σε δομές του νευρικού ιστού (18/67) και για το τρίτο μοτίβο σε δομές συνδετικού ιστού (15/71) (Εικ. 67).



Εικόνα 67: Για το πρώτο μοτίβο παρατηρήθηκε σήμα gfr σε δομές του μυϊκού ιστού, για το δεύτερο μοτίβο σε δομές του νευρικού ιστού και για το τρίτο μοτίβο σε δομές συνδετικού ιστού.

Οι παραπάνω ενθέσεις δεν σχετίζονται με αγγεία και συνεπώς με τη διατμητική τάση.

Για να επιβεβαιώσουμε ή όχι την ύπαρξη κάποιας συσχέτισης με τη διατμητική τάση, τα έμβρυα που ενέθηκαν επιτυχώς, αφέθηκαν να φτάσουν στην ενήλικη ζωή. Στη συνέχεια, διασταυρώθηκαν (F1 γενιά) τα έμβρυά τους στις 48 hpf και έπειτα από επώαση με φαινυλεφρίνη για να διαπιστώσουμε αν πριν και μετά την επώαση υπήρχε διαφοροποίηση του σήματος λόγω της αλλαγής της διατμητικής τάσης εξαιτίας της φαινυλεφρίνης. Τελικά δεν υπήρξε διαφοροποίηση.



Εικόνα 68: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία διαγονιδιακών ψαριών με πόκριση στις αλλαγές της διατμητικής τάσης.

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5Α ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη, αναλύσαμε τους μηχανισμούς που εμπλέκονται σε ένα γενετικό μοντέλο όπου υπάρχει μετάλλαξη στο *myh6* γονίδιο και δημιουργεί υποπλαστικό κόλπο της καρδιάς. Το Zebrafish διαθέτει συγκεκριμένα ανατομικά και φυσιολογικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα που είναι σημαντικά για τη μοντελοποίηση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Όπως και η ανθρώπινη καρδιά, η καρδιά του zebrafish αναπτύσσεται από έναν γραμμικό καρδιακό σωλήνα που σχηματίζεται από τη σύντηξη μεσοδερμικών προγονικών κυττάρων από δύο καρδιακά πεδία (Kupferman, 2000). Αξιοσημείωτο είναι ότι η καρδιά του zebrafish δεν διαχωρίζεται και δεν υποβάλλεται σε σημαντική συμπίεση του μυοκαρδίου μετά τη δοκίμηση. Σε ένα πλαίσιο που καθορίζεται από πρότυπα έκφρασης γονιδίων ειδικά για τους θαλάμους, οι κολποκοιλιακές και αορτικές βαλβίδες σχηματίζονται από ενδοκαρδιακά επάρματα με μετάπτωση ενδοθηλίου-μεσεγγύματος (EMT), σε μια διαδικασία που κατευθύνεται από γενετικούς και αιμοδυναμικούς παράγοντες.

Από τις 55 hpf ξεκινά η δημιουργία ενός στρώματος που περιβάλλει την καρδιά, το επικάρδιο (Peralta et al., 2014). Η καρδιά του zebrafish νευρώνεται με συμπαθητικές και παρασυμπαθητικές νευρικές ίνες (Stoyek et al., 2015), με καρδιακή συστολή που ξεκινά στο φλεβοκολπικό κόμβο (sinoatrial node), σταματώντας παροδικά στην κολποκοιλιακή ένωση και στη συνέχεια επιταχύνοντας μέσω της κοιλίας, με αποτέλεσμα τη συστολή από την κορυφή προς τη βάση. Σε αντίθεση με τα μοντέλα των μυών, οι καρδιακοί ρυθμοί και οι παράμετροι EKG που αντιπροσωπεύουν κολπική, κολποκοιλιακή και κοιλιακή εκπόλωση, καθώς και κοιλιακή επαναπόλωση είναι παρόμοιες με αυτές των ανθρώπων, για παράδειγμα, ο καρδιακός ρυθμός στο zebrafish (150-200 παλμοί/λεπτό) είναι πιο κοντά με τους 60-100 παλμούς / λεπτό του ανθρώπου, από τον καρδιακό ρυθμό του ποντικού (600 παλμοί/λεπτό, Milan et al., 2006).

Η μειωμένη συσταλτικότητα της καρδιάς και το περικαρδιακό οίδημα που προκύπτει, είναι προφανή σε έμβρυα zebrafish, οπότε το zebrafish κατέστη ιδανικό μοντέλο για να ελεγχθεί η παθογένεια νέων μεταλλάξεων που απαντούν σε ασθενείς με καρδιομυοπάθεια. Αρκετές μελέτες σε πονύμφες και ενήλικα ψάρια έχουν προκύψει για να αναλύσουν φαινοτύπους πιο περίπλοκους από το εμβρυϊκό

θανατηφόρο περικαρδιακό οίδημα και αυτές οι μελέτες ορίζουν τώρα ένα νέο πρότυπο της καρδιακής ανεπάρκειας του zebrafish (Brown et al., 2016).

Η επίδραση της μυοκαρδιακής δυσλειτουργίας του κόλπου σε εμβρυϊκά στάδια έχει αποδειχθεί ότι επιδρά στη διαμόρφωση του μυοκαρδίου και των άλλων κοιλοτήτων. Στο zebrafish, η μετάλλαξη *wca* που προκαλείται στη βαριά αλυσίδα της μυοσίνης του κόλπου και προκαλεί απουσία συστολής του κόλπου σε αρχικά εβρυϊκά στάδια, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στη διαμόρφωση της κοιλίας, συμπεριλαμβανομένων δομικών ανωμαλιών και αλλαγών στη γονιδιακή έκφραση. Προτείνεται συνεπώς, ότι η κοιλία αναδιαμορφώνεται ως απόκριση της απουσίας συστολής του κόλπου στα έμβρυα (Bartman et al., 2004).

Ωστόσο, συμπεραίνεται ότι είναι δύσκολο να διαχωριστεί πλήρως η καρδιακή λειτουργία από την αιματική κυκλοφορία. Έχει δειχθεί, άλλωστε, ότι η φυσιολογική ροή του αίματος είναι απαραίτητη για να προωθήσει την αύξηση του μεγέθους των καρδιομυοκυττάρων, την επιμήκυνσή τους καθώς, επίσης, ότι ορίζει και την έκφραση των γονιδίων σε συγκεκριμένη περιοχή της κοιλίας που συνοδεύουν το σχηματισμό των κοιλοτήτων της καρδιάς. Από την άλλη πλευρά, η συσταλτικότητα του μυοκαρδίου απαιτείται για να περιορίσει το μέγεθος των κυττάρων, το βαθμό επιμήκυνσής τους και την κατανομή τους στις αναπτυσσόμενες καρδιακές κοιλότητες (de Campos-Baptista et al., 2008)

Συνεπώς, η φυσιολογία της καρδιάς του zebrafish μοιάζει με εκείνη της ανθρώπινης καρδιάς σε πολλές πτυχές και περισσότερο από το 70% των ανθρώπινων γονιδιακών νόσων έχουν ένα σαφή ορθόλογο στο zebrafish (Howe et al., 2013). Το 2002, μεταλλάξεις στα γονίδια που κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες του σαρκομεριδίου, Τίπνη και Τροπονίνη, αναφέρθηκε ότι προκαλούν εμβρυϊκές θανατηφόρες καρδιομυοπάθειες. Οι αναλύσεις σύνδεσης σε οικογένειες που εμπλέκονται αυτά τα γονίδια σε διατακτική και υπερτροφική καρδιομυοπάθεια έδειξαν έναρξη στο ίδιο χρόνο (Stainier et al., 1996). Μεταξύ των ~ 51 γνωστών γονιδίων που προκαλούν διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, τα 49 γονίδια, ή το 96%, βρέθηκαν στο zebrafish (Shih et al., 2015).

Αυτοσωμικές, κυρίαρχες μεταλλάξεις στην ανθρώπινη καρδιακή μυοσίνη μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα είτε υπερτροφική είτε διατακτική καρδιομυοπάθεια, ανάλογα με το υπεύθυνο γονίδιο (Seidman and Seidman 2001). Για παράδειγμα, το σύνδρομο από ελαττώματα στη μορφογένεση της αριστερής κοιλίας, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα της μειωμένης ροής αίματος μέσω της αριστερής κοιλίας στο *myh6*^{-/-} (Sedmera et al., 2002). Οι εμβιο-μηχανικές δυνάμεις που σχετίζονται με τη

συσταλτικότητα και τη ροή του αίματος παίζουν σημαντικό ρόλο και μπορούν να προκαλέσουν καρδιακή αναδιαμόρφωση καθώς και ελαττώματα μορφογένεσης της καρδιακής βαλβίδας όπως παρατηρήθηκε σε μεταλλαγμένα ποντίκια και zebrafish (Hove et al., 2003, Bartman and Hove 2005; Kalogirou et al., 2014).

Στη συγκεκριμένη εργασία, αν και τα μεταλλαγμένα ψάρια έχουν ένα μόνο θάλαμο, ένα 40% καταφέρνει και επιβιώνει δημιουργώντας μια υπερμεγέθη κοιλία ως απόκριση στον υποπλαστικό—και υπολειτουργικό κόλπο. Ο μηχανισμός που ευθύνεται στα θηλαστικά για τη μεγαλοκαρδία είναι αυτός της υπερτροφίας. (Ahuja et al., 2007, Anversa et al., 2006). Η πλειοψηφία των γενετικών διαφοροποιήσεων που σχετίζονται με μεγαλύτερο μέγεθος καρδιάς στα θηλαστικά αφορούν επικρατή αυτοσωμικά γονίδια (Olivotto et al., 2015, McNally and Mestroni, 2017). Τα δεδομένα αυτής της εργασίας έδειξαν γονίδια που σχετίζονται με την υπερτροφική απόκριση στις *myh6^{-/-}* καρδιές. Τα γονίδια που αναδείχθηκαν είναι τα *hrra* και *hrrb*. Ωστόσο, ιστολογικές μελέτες με τη χρήση ανοσοϊστοχημικών τεχνικών στα ενήλικα ψάρια που φέρουν τη μετάλλαξη, έδειξαν ότι η μεγέθυνση της κοιλίας οφείλεται στην υπερπλασία. Κάτω από χρόνια αιμοδυναμική υπερφόρτωση, τα γονίδια *hrra* και *hrrb* αυξάνουν τη μεταγραφική τους σύνθεση στην καρδιά. Η αύξηση αυτή θεωρείται καρδιοπροστατευτική, λόγω των ευεργετικών επιδράσεων των *hrra* και *hrrb* στην ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος (McGrath et al., 2005). Θα πρέπει επίσης να τονίσουμε ότι οι μοριακοί δείκτες της υπερτροφίας των καρδιομυοκυττάρων (*hrra* και *hrrb*) που εμπλέκονται σε υπερπλασμένες-διαδικασίες, είναι σύμφωνες με τα ευρήματα των Becker et al. (2011). Περαιτέρω ανάλυση του μεταγραφικού προφίλ των *myh6^{-/-}* κοιλιών των ενήλικων zebrafish είναι επιβεβλημένη ώστε να δοθεί απάντηση για τους λόγους που τα υπερτροφικά γονίδια των θηλαστικών ρυθμίζουν την υπερπλασία στο zebrafish.

Η απουσία ενός λειτουργικού κόλπου έχει ως αποτέλεσμα την κοιλιακή υπερφόρτωση, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην εξασθένηση του επιστίβαξης των πρωτεϊνών κατά το στρες-ΕΔ και την ενεργοποίηση του μονοπατιού UPR (απόκριση των αποδιατεταγμένων πρωτεϊνών) (Glembotski 2008). Όταν συσσωρεύονται ελαττωματικές πρωτεΐνες στο ΕΔ, η Bip αυξάνεται στις καρδιές σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και υπερτροφία, γεγονός που υποδηλώνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού UPR (Okada et al., 2004). Κατά συνέπεια, το στρες-ΕΔ σηματοδοτικό μονοπάτι παρέχει περαιτέρω καρδιοπροστατευτική δράση. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της PERK (ίδια οδός με το *p-eif2a*) προάγει στα κύτταρα καλύτερες συνθήκες επιβίωσης σε συνθήκες υποξίας (Lu et al., 2004). Η φωσφορυλίωση του *eIF2a* είναι ένα πρώιμο συμβάν που παρατηρήθηκε στα

καρδιομυοκύτταρα μετά από ισχαιμία *in vitro* και μετά από ισχαιμία/επαναιμάτωση *in vivo* (Szegezdi et al., 2006, Miyazaki et al., 2011). Τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα του μονοπατιού UPR μπορούν να αποδοθούν στην επαγωγή των μοριακών συνοδών του ΕΔ και την επακόλουθη βελτίωση του «επιστίβαξης» των πρωτεϊνών (Glembotski 2008).

Παράλληλα, αξίζει να σημειωθεί η διαφοροποίηση των κολπικών καρδιομυοκυττάρων σε θετικά στην ελασίνη κύτταρα. Η ελασίνη είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη στο αρτηριακό τοίχωμα και μπορεί να συνεισφέρει έως και 50% του ξηρού βάρους του (Karnik et al., 2003). Η ελασίνη, επίσης, παρέχει ελαστικότητα, αποτρέποντας τη ρήξη του ιστού με μηχανική διάταση (Patel et al., 2006) και παρέχει τις ιδιότητες της εκτατότητας και ελαστικής επαναφοράς σε μεγάλες αρτηρίες, πνευμονικό παρέγχυμα, ελαστικούς συνδέσμους, ελαστικούς χόνδρους, δέρμα και άλλους ελαστικούς ιστούς όλων των σπονδυλωτών με εξαίρεση τα άγναθα ψάρια (Miao et al., 2007). Λόγω της γενετικής μετάλλαξης στο γονίδιο *amhc*, τα κολπικά καρδιομυοκύτταρα δεν μπορούν να συστέλλονται. Ωστόσο, φαίνεται ότι κατά τη μακροπρόθεσμη μεταβολή της αιμοδυναμικής ροής, επάγεται η βιοσύνθεση της ελασίνης όπως περιγράφηκε προηγουμένως σε ένα διαφορετικό σύστημα (Isenberg 2003). Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι τα ικρίωματα PGA προάγουν την παραγωγή ελασίνης από μια δυναμική διέγερση (Kim et al., 1999). Οι εμβιομηχανικές δυνάμεις που σχετίζονται με τη συσταλτικότητα και τη ροή του αίματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην καρδιακή μορφογένεση. Μεταβολές στην κυκλοφορία, όπως παρατηρήθηκε σε μεταλλάξεις *wes*, μπορεί να προκαλέσουν καρδιακή αναδιαμόρφωση και βλάβες των βαλβίδων (Bartman and Hove 2005, Hove et al., 2003, Kalogiourou et al., 2014). Επομένως, ένας πιθανός μηχανισμός για την εναπόθεση ελασίνης είναι η αλλαγή της αιμοδυναμικής στον κόλπο λόγω της υποπλασίας. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ενίσχυση του υποπλαστικού κόλπου, έτσι ώστε να αντέχει στη ροή του αίματος, προσομοιάζοντας ένα αιμοφόρο αγγείο. Η εναπόθεση ελασίνης στον κόλπο θα μπορούσε να αντισταθμίσει την έλλειψη της πρωτεΐνης Myh6, διατηρώντας μια, συμβατή με τη ζωή, λειτουργική κατάσταση της καρδιάς και είναι ανάλογη με την αναγέννηση του μυοκαρδίου μετά από τραυματισμό.

Η συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μοντέλο για να μελετήσουμε τη συσχέτιση μεταξύ στρες-ΕΔ και καρδιαγγειακών παθήσεων. Πολυάριθμες μελέτες που χρησιμοποιούν φαρμακολογικούς παράγοντες και ρυθμίζουν άμεσα το UPR έχουν δημοσιευθεί και ρίχνουν φως στα αναδυόμενα και ελπιδοφόρα εργαλεία για την αποτελεσματική θεραπεία καρδιαγγειακών παθήσεων

(Wang et al., 2018). Επιπλέον, μεταβολές στην κυκλοφορία, όπως παρατηρήθηκε σε *vea* μεταλλάξεις, μπορούν να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στο μέγεθος του θαλάμου, το σχήμα, την κυτταρική οργάνωση και την έκφραση γονιδίων, καθιστώντας έτσι τα ψάρια που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη, ένα δυνητικά χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση των συγγενών παθήσεων της καρδιάς που σχετίζονται με τις συνθήκες μη φυσιολογικής αιμοδυναμικής ροής (Berdougo et al., 2003; Holtzman 2012). Συμπερασματικά, η υπόθεση αυτή καθιερώνει περαιτέρω τις τεράστιες δυνατότητες του zebrafish για ανασύσταση/αναδιαμόρφωση της καρδιάς του σε παθολογικές καταστάσεις και αποδεικνύει την ικανότητά του να χρησιμοποιηθεί ως ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των καρδιαγγειακών παθήσεων.

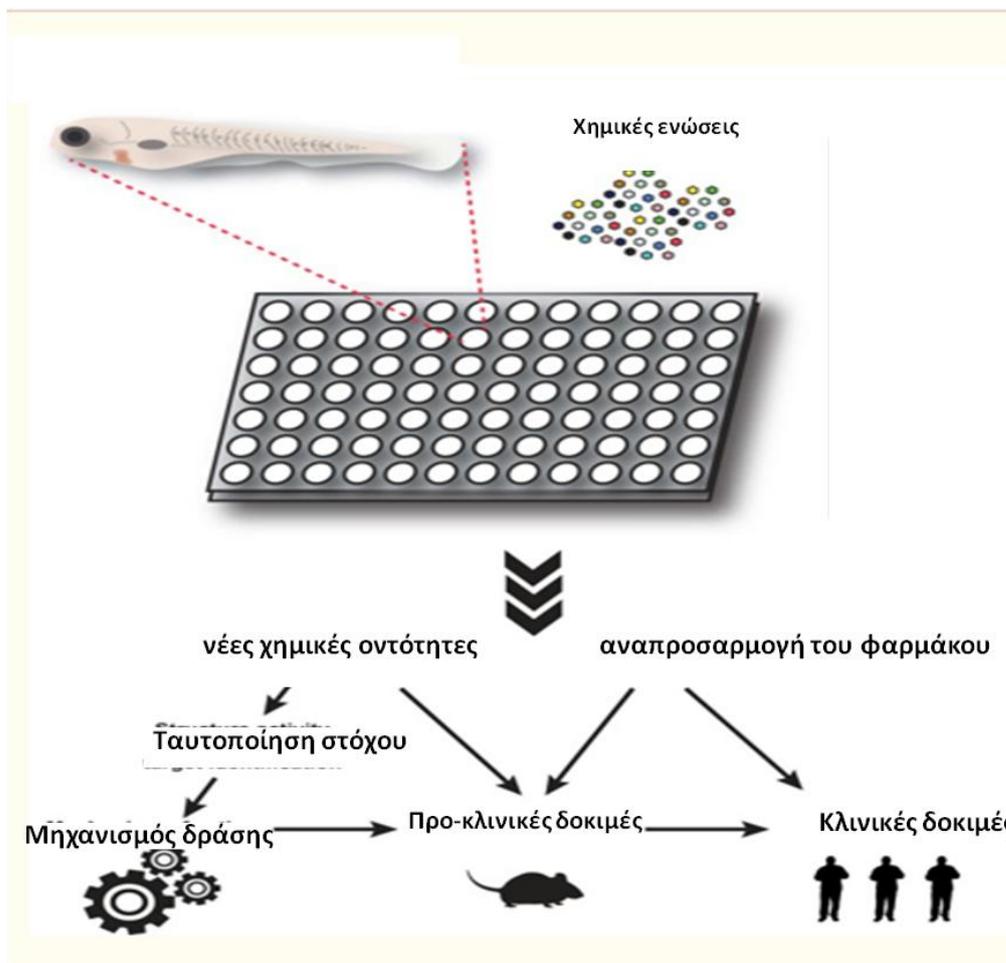
5B ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανακάλυψη φαρμάκων έχει ενεργοποιήσει μερικές από τις πιο επαναστατικές εξελίξεις στη σύγχρονη ιατρική. Το Zebrafish χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τόσο στον ακαδημαϊκό, όσο και στο φαρμακευτικό κόσμο, για να αντιμετωπίσουν τις μεγάλες προκλήσεις για την ανακάλυψη φαρμάκων: να εντοπίσουν νέες αλληλεπιδράσεις φαρμάκων-στόχων, να συνδυάσουν τα υπάρχοντα φάρμακα με νέες χρήσεις και να αξιολογήσουν την τοξικότητα και την αποτελεσματικότητά τους *in vivo*. Η ανακάλυψη φαρμάκων ακολουθεί δύο βασικές στρατηγικές: μια βασισμένη σε μία πρωτεΐνη-στόχο και μια βασισμένη σε φαινοτυπικό έλεγχο.

Η ανακάλυψη φαρμάκων με επίκεντρο μια πρωτεΐνη-στόχο έχει γίνει το κέντρο επένδυσης στη φαρμακευτική βιομηχανία σήμερα, λόγω των δυνατοτήτων προσυμπωματικού ελέγχου για την εξαιρετικά υψηλή απόδοση στον προσδιορισμό του στόχου καθορισμένων πρωτεϊνών. Αυτή η προσέγγιση που επικεντρώνεται στο στόχο ακολουθεί μια καθορισμένη ακολουθία βημάτων: ανίχνευση του στόχου, διαλογή υψηλής απόδοσης *in vitro*, προκλινικά μοντέλα και τελικά κλινικές δοκιμές. Μία ολοένα και περισσότερο εφαρμοζόμενη εναλλακτική στρατηγική είναι ο φαινοτυπικός έλεγχος που στοχεύει στον εντοπισμό ενώσεων που ασκούν επιθυμητή φυσιολογική επίδραση χωρίς την εκ των προτέρων γνώση του στόχου. Η χρήση φαινοτυπικών ελέγχων σε κυτταρικά συστήματα, όπως αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές, ιστοκαλλιέργειες και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα, εξελίχθηκαν γρήγορα, παράλληλα με τις αναδυόμενες τεχνολογίες στη ρομποτική, την απεικόνιση υψηλής ευκρίνειας, την επεξεργασία εικόνων και την αυτοματοποιημένη ανάλυση. Ωστόσο, τόσο οι στοχευμένες όσο και οι φαινοτυπικές στρατηγικές εξακολουθούν να αντιμετωπίζουν την πρόκληση μιας μακράς φάσης ανάπτυξης (Zon and Peterson, 2005).

Οι πληθυσμοί κυτάρων ή τα σηματοδοτικά μονοπάτια μπορούν να παρακολουθούνται όταν τα έμβρυα zebrafish είναι ακόμη αρκετά μικρά ώστε να τοποθετηθούν σε πλάκες 96 φρεατίων (Εικ. 69). Η απλή προσθήκη χημικών ουσιών στις προνύμφες επιτρέπει στη συνέχεια την παρακολούθηση μεγάλου αριθμού χημικών ουσιών με τη φαινοτυπική απόκριση των προνυμφών σε κάθε φρεάτιο. Οι

ομοιότητες μεταξύ των γονιδίων του zebrafish και των ανθρώπινων γονιδίων υποδεικνύουν τη σημαντικότητα του χημικού ελέγχου.



Εικόνα 69 : Σχηματική απεικόνιση της σημασίας του χημικού ελέγχου σε έμβρυα Zebrafish.

Οι συνήθεις χημικοί έλεγχοι με zebrafish χρησιμοποιούν 2.000-5.000 ενώσεις και στις περισσότερες περιπτώσεις σε μία μόνο συγκέντρωση. Ο μεγαλύτερος έλεγχος που δημοσιεύτηκε μέχρι σήμερα εξέτασε 30.000 μικρά μόρια για να εντοπίσει ενώσεις που παρεμβαίνουν σε μονοπάτια σηματοδότησης που είναι κρίσιμα για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ένας πρόσφατος έλεγχος που μελετά το σχηματισμό δευτερογενών νησίδων στο πάγκρεας ήταν σε θέση να βελτιώσει την αυτοματοποίηση του χειρισμού του zebrafish για να αυξήσει την απόδοση και να ελεγχθούν ~ 3.000 ενώσεις σε 16 επαναλήψεις και σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις, αθροίζοντας έως και 500.000 ψάρια που εκτίθενται σε χημικές ουσίες (Wang et al., 2015).

Ένας αριθμός χημικών βιβλιοθηκών έχει δοκιμαστεί σε zebrafish. Υπάρχουν τρεις ευρείες κατηγορίες βιβλιοθηκών μικρών μορίων: Α) βιβλιοθήκες εμπορικών προμηθευτών που περιλαμβάνουν μικρά μόρια που συμμορφώνονται με τους κανόνες του Lipinski . Αυτοί οι κανόνες περιγράφουν χημικά χαρακτηριστικά των μικρών μορίων που τους προσφέρουν καλή φαρμακοκινητική και δυναμική. Οι ενώσεις έχουν χαμηλό μοριακό βάρος και συντελεστές κατανομής που παρέχουν αποτελεσματική απορρόφηση διαμέσου της μεμβράνης. Αυτές οι ιδιότητες προβλέπουν καλή βιοδιαθεσιμότητα στους οργανισμούς (Lipinski, 2000).

Β) βιβλιοθήκες φυτικών προϊόντων, όπου οι ουσίες προέρχονται από την εκχύλιση φυτικών προϊόντων και Γ) συνθετικές βιβλιοθήκες, όπου ορισμένα εργαστήρια συνθέτουν τις δικές τους ενώσεις ανάλογα με τους συγκεκριμένους στόχους τους. Τέτοιες βιβλιοθήκες βασίζονται σε γνωστές φαρμακευτικές ουσίες και το αποτέλεσμα ενός τέτοιου ελέγχου βιβλιοθήκης είναι συνήθως η ανακάλυψη νέας βιοδραστικότητας ενός αναλόγου γνωστού φαρμάκου (MacRae and Peterson, 2015). Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν τα μόρια που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική μελέτη.

Η αγγειογένεση αναφέρεται στο σχηματισμό νέων αγγείων που αναπτύσσονται από προϋπάρχοντα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω δομής σωληνοειδούς σχηματισμού. Ο χωροταξικός και χρονικός έλεγχός της παίζει καθοριστικό ρόλο όχι μόνο στην ανάπτυξη, αλλά και στη δημιουργία καρκίνου, την ηλικιακή εκφύλιση της ωχράς κηλίδας, το διαβήτη, την πρόωρη έναρξη αμφιβληστροειδοπάθειας, την επούλωση τραυμάτων και την αναγέννηση ιστών. Προσδιορισμός νέων μορίων που ελέγχουν την αγγειογένεση θα είναι κρίσιμος στην ανάπτυξη νέων θεραπευτικών στρατηγικών για όλες αυτές τις καταστάσεις.

Όσον αφορά στη μοριακή βάση της αγγειογένεσης, η οικογένεια των αγγειακών ενδοθηλιακών αυξητικών παραγόντων (VEGFs) και οι αντίστοιχοι υποδοχείς τους αντιπροσωπεύουν τους κεντρικούς ρυθμιστές. Ενώ υπάρχει κάποιος πλεονασμός σε αλληλεπιδράσεις λειτουργίας προσδέτη-υποδοχέα, ο VEGFR2 αντιπροσωπεύει τον κύριο υποδοχέα με βασικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος και στην προώθηση της αγγειογένεσης. Ο παράγοντας ανάπτυξης δεσμεύεται στην εξοκτυταρική περιοχή του VEGFR2 και διευκολύνει το διμερισμό του υποδοχέα. Η ενδοκυτταρική επικράτεια αποτελείται από την περιοχή κινάσης τυροσίνης και την περιοχή καρβοξυλικού άκρου, τα οποία αυτοφωσφορυλιώνονται κατά το διμερισμό για να πυροδοτήσουν τις οδούς σηματοδότησης που οδηγούν στην αγγειογένεση. Ο VEGFR2 εκφράζεται ήδη από τα πρώτα εμβρυϊκά στάδια και παραμένει μέχρι την

ενηλικίωση στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ο VEGFR2 είναι υπεύθυνος για τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων και εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα αγγειακά δίκτυα των όγκων. Επομένως, ο VEGFR2 έχει προταθεί ως στόχος που αναστέλλει το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων σε αναπτυσσόμενους όγκους (McMahon, 2005).

Το Zebrafish εκφράζει τέσσερις υποδοχείς που ρυθμίζουν την αγγειογένεση: Flt1, Kdr, Kdr-like (kdr) και Flt4, οι οποίοι έχουν πολύ μεγάλη ομολογία με τους αντίστοιχους του ανθρώπου. Το πρότυπο αγγειογένεσης στο zebrafish είναι εξαιρετικά στερεότυπο και έχει περιγραφεί πλήρως. Επιπλέον, τα έμβρυα zebrafish μπορούν να επιβιώσουν και να αναπτυχθούν κανονικά για τις πρώτες 4 ημέρες ακόμα και απουσία αγγειακού συστήματος, όπως στα έμβρυα που φέρουν τη μετάλλαξη *cloche*. Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν προηγουμένως χρησιμοποιήσει ειδικές διαγονιδιακές ενδοθηλιακές σειρές για διαλογή νέων αντι-αγγειογενετικών ενώσεων (Jin et al., 2005)

Επιπλέον, με βάση το σκελετό του ανθραμιλαμιδίου AAL993 (ένας πολύ ισχυρός και επιλεκτικός αναστολέας των VEGFRs με καλές φαρμακολογικές ιδιότητες και εξαιρετική από το στόμα βιοδιαθεσιμότητα), σχεδιάστηκε και συντέθηκε μια μικρή βιβλιοθήκη αναστολέων (60 σε αριθμό) του VEGFR2.

Με το γενετικό χημικό διαχωρισμό ως προς την επίδραση ουσιών στην αγγειογένεση, έγινε δυνατή η ταυτοποίηση 6 νέων μορίων-αναστολέων της αγγειογένεσης. Μάλιστα, έπειτα από πειραματικό έλεγχο διαπιστώθηκε πως η δράση τους είναι αντιστρεπτή, σημαντική παράμετρος για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων καθώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ένα συγκεκριμένο χρονικό πλαίσιο με ελεγχόμενα αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, η ανακάλυψη των νέων και αντιστρεπτών αναστολέων αγγειογένεσης [12f] και [12i] υποστηρίζει την υπόθεσή μας, ότι η επέκταση της λειτουργικότητας της αμιδικής ανιλίνης του ALL993 ώστε να περιλαμβάνει βενζυλικές και ακυλοϋδραζονικές ομάδες, θα παρήγαγαν εξίσου ισχυρούς αναστολείς.

Επιπλέον, τα δεδομένα μας υποδεικνύουν ότι η 3-τριφλουορομεθυλοφαινυλομάδα είναι ο βέλτιστος υποκαταστάτης, δεδομένου ότι το 4-βρωμοφαινύλιο στο [12c], 4-

φλουοροφαινύλιο στο [12m] ή 4-τριφλουορομεθυλοφαινύλιο στο [12η] οδήγησαν σε λιγότερο ισχυρούς αναστολείς (5%-75% στα 10 μM). Από την άλλη πλευρά, οι μεγαλύτεροι σε μέγεθος υποκαταστάτες όπως οι ομάδες ναφθαλινίου, 3,4-διμεθοξυφαινυλίου και 4-τριπ-βουτυλοφαινυλίου δεν εμφανίζουν καμία καταστολή της αγγειογένεσης στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις.

Η φαινοτυπική ανάλυση στο zebrafish χρησιμοποιώντας τη σειρά Tg(kdrl:gfp)^{s843} ενσωματώνει μια σειρά πρόσθετων πληροφοριών σε σχέση με μια *in vitro* διαδικασία έναντι μιας ομάδας κινασών. Γίνεται επίσης αντιληπτό από τους παρατηρηθέντες φαινοτύπους (δημιουργία θρόμβων, περικαρδιακό οίδημα, πρόβλημα στη συστολή της καρδιάς) ότι η ανάπτυξη των διασωμιακών αγγείων επηρεάζει την κυκλοφορία του εμβρύου.

Από το χημικό γενετικό έλεγχο που έγινε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, αναπτύχθηκε ένα ακόμα παράδειγμα συνεργασίας των κλάδων της βιολογίας και της χημείας στον κλάδο της χημικής βιολογίας.

Με την παραπάνω μελέτη ισχυροποιείται η θέση του Zebrafish ως μοντέλου για τη δοκιμή νέων μορίων – πιθανών φαρμάκων, παρακολουθώντας τις επιπτώσεις όχι μόνο στο φαινότυπο αλλά και σε εσωτερικές δομές όπως είναι τα αγγεία. Μάλιστα, στην παρούσα έρευνα ποσοτικοποιήθηκαν οι επιπτώσεις αυτές στην αναστολή της αγγειογένεσης.

Διαπιστώνει λοιπόν κανείς πως ο έλεγχος της αναστολής παθολογικών φαινομένων μέσω δοκιμών νέων φαρμακολογικών παραγόντων με τη χρήση του zebrafish, μπορεί να αποτελέσει ένα πρώτο στάδιο στην ανάπτυξη φαρμάκων, με την εξαγωγή χρησιμων αποτελεσμάτων, τόσο ως προς την τοξικότητα ενός μορίου όσο και ως προς την ειδικότητά του (Kithcart and MacRae, 2017). Έτσι, μπορεί να επιτευχθεί κέρδος, τόσο οικονομικό, όσο και χρονικό στην ανάπτυξη ενός φαρμάκου, αφού μπορεί να επιταχυνθεί η μεταφορά του στις κλινικές μελέτες και να επιτευχθεί μειωμένη χρήση πειραματικών μοντέλων θηλαστικών, λόγω του καλύτερα πλέον σχεδιασμένου δοσολογικού σχήματος κατά την εφαρμογή του φαρμάκου από τις ενδείξεις της τοξικότητας στο zebrafish (Wiley DS et al., 2017).

5Γ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι συγγενείς καρδιοπάθειες εμφανίζονται σε μεγάλο ποσοστό στο γενικό πληθυσμό και πληθώρα αυτών προκύπτει από ανωμαλίες κατά τη μορφογένεση της καρδιάς. Η συχνότητα εμφάνισής τους ποικίλλει από 4 έως 50 ανά 1000 ζώντα νεογνά. Ως οι πιο συχνές αναφέρονται οι διαφραγματικές ανωμαλίες των κοιλιών (Ventricular Septal Defects-VSDs) με συχνότητα 75 ανά 1000 γεννήσεις, με την παραμονή του ανοικτού βοτάλειου πόρου να ακολουθεί σε συχνότητα εμφάνισης. Μεγάλη επίπτωση εμφανίζει, με μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στους ενήλικες, και η μεσοκολπική επικοινωνία από την απουσία σχηματισμού του μεσοκολπικού διαφράγματος. Η συχνότητα αυτής της δυσμορφίας είναι πολύ μεγαλύτερη στα νεογνά, αλλά λόγω ασυμπτωματικής παρουσίας πολλές φορές δεν διαγιγνώσκεται κατά τη γέννηση και εμφανίζεται στην ενήλικη ζωή. Ακολουθούν σε συχνότητα οι ανωμαλίες του κολποκοιλιακού διαφράγματος, η στένωση της πνευμονικής βαλβίδας, η αορτική στένωση και η δίπτυχη αορτική βαλβίδα (Micheletti, 2019). Ελαττωματική ανάπτυξη των καρδιακών βαλβίδων επηρεάζει το 1% του πληθυσμού και προκαλεί διαταραχή της καρδιακής λειτουργίας με δια βίου επιπλοκές (Kalogirou et al., 2014).

Οι αιτίες των συγγενών καρδιοπαθειών παραμένουν άγνωστες. Αναφέρεται ότι οι γενετικές αιτίες (χρωμοσωμικές ανωμαλίες και σύνδρομα) είναι υπεύθυνες μόνο για το 8% των συγγενών καρδιοπαθειών και μόλις το 2% οφείλονται σε περιβαλλοντικά αίτια. Στο υπόλοιπο 90% παρατηρείται πολυπαραγοντική κληρονόμηση και περιβαλλοντική επίδραση (έκθεση σε τερατογόνους παράγοντες κατά το χρόνο ευπάθειας). Οι συγγενείς καρδιοπάθειες είναι αποτέλεσμα διαταραχών της καρδιακής ανάπτυξης σε πρώιμα εμβρυικά στάδια, αλλά και απόρροια ανώμαλης ανάπτυξης, όπως από αιμοδυναμικές αλλαγές (Hoffman et al., 2004).

Οι μέχρι τώρα μελέτες είχαν εστιάσει στην αλληλεπίδραση μυοκαρδίου-ενδοκαρδίου και στην επίδραση επιγενετικών παραγόντων, όπως η συσταλτικότητα και η αιματική ροή, στην ανάπτυξη της καρδιάς μόνο σε εμβρυικά στάδια. Έχει υποστηριχθεί ότι οι συγγενείς καρδιοπάθειες είναι αποτέλεσμα διαταραχών της καρδιακής ανάπτυξης που συμβαίνουν σε πρώιμα εμβρυικά στάδια αλλά και απόρροια ανώμαλης ανάπτυξης που προκαλούνται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως από αιμοδυναμικές αλλαγές. Οι ιστοί αντιδρούν στα μηχανικά ερεθίσματα που προέρχονται από την αλλαγή στη ροή του αίματος διαμέσου της καρδιάς και ιδιαίτερα στην περιοχή της κολποκοιλιακής βαλβίδας. Όπως έχει δειχθεί στον άνθρωπο και σε διάφορα είδη όπως το zebrafish, η μορφογένεση και η

λειτουργία της καρδιάς συμβαίνουν παράλληλα κατά την ανάπτυξη και οι δυσμορφίες που μπορούν να εμφανιστούν προκύπτουν μέσω περισσότερων παθογενετικών οδών (Hoffman et al. 2004).

Οι αλλαγές στην αιμοδυναμική ροή προκαλούν αύξηση των αγγείων ή κάνουν τα αγγεία επιρρεπή σε αθηροσκληρωτικές βλάβες. Έχει δειχθεί ότι το τοιχωματικό στρες παίζει ρόλο στην αναδιαμόρφωση των αγγείων στον λεκιθικό ασκό του ποντικού. Ωστόσο, είναι πολύ δύσκολο να μελετηθούν οι αλληλεπιδράσεις του σχηματισμού και της λειτουργίας της καρδιάς *in vivo* κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του ποντικού, αφού σε μία καρδιά τεσσάρων κοιλοτήτων που συστέλλεται και συστρέφεται, τα πρότυπα της ροής του αίματος είναι εξαιρετικά πολύπλοκα (Chen et al., 2003).

Σε αντίθεση, τα έμβρυα zebrafish, τα οποία είναι διαφανή και αναπτύσσονται εξωτερικά, επιτρέπουν τη μελέτη με μη επεμβατικές τεχνικές. Μεγάλο πλεονέκτημα αποτελεί επίσης το ότι τα έμβρυα zebrafish επιβιώνουν ακόμα και σε πλήρη απουσία αιματικής κυκλοφορίας. Επιπλέον, το γεγονός ότι σε αυτά μπορούν να εφαρμοστούν γενετικές τεχνικές, όπως η ορθόδρομη και η ανάδρομη γενετική ανάλυση, καθιστούν το zebrafish ένα ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη των διαδικασιών ανάπτυξης της καρδιάς.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να αναδυθούν νέα γονίδια που σχετίζονται με τη μορφογένεση των καρδιακών βαλβίδων και να αποδειχθεί η σχέση τους μέσω στοχευμένης μεταλλαξιγένεσης με τη βοήθεια του συστήματος CRISPR-Cas. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το γονίδιο *fkbp5* το οποίο μετά από RNA-αλληλούχιση ήταν αυτό με τη μεγαλύτερη διαφορά στα επίπεδα mRNA και έχει συσχετιστεί με την κολπική μαρμαρυγή. Παρόλο που ενέθηκαν δεκάδες έμβρυα, δεν βρέθηκε κάποιο μεταλλαγμένο έμβρυο πιθανότατα επειδή έπρεπε να χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη ποσότητα gRNA ανά έμβρυο (μεγαλύτερη από 35 ng/μl).

Επίσης, στην παρούσα εργασία επιχειρήθηκε να δημιουργηθεί τεχνητός υποκινητής που θα εισαχθεί στα ψάρια, ώστε να ανταποκρίνεται στις αλλαγές της διατμητικής τάσης. Δεν υπάρχει κάτι αντίστοιχο στη βιβλιογραφία για τη δημιουργία διαγονιδιακού ζώου που να αποκρίνεται *in vivo* στην αλλαγή της διατμητικής τάσης (Shear Stress Response Elements-SSRE). Παραδείγματα τεχνητών υποκινητών που έχουν εισαχθεί στο zebrafish είναι τα εξής: στοιχεία αντιοξειδωτικής απόκρισης (AREs) (Raghunath et al., 2018), Δεσμειτική πρωτεΐνη στοιχείου απόκρισης cAMP (CREB) (Tregnago et al., 2012), στοιχεία που ρυθμίζουν την απόκριση της στερόλης

(SRE) (Tay et. al., 2018), απορυθμιστές του ενδοκρινούς συστήματος εξαρτώμενοι από το περιβάλλον (EED) (Gorelick et al., 2014).

Ο τεχνητός υποκινητής που δημιουργήθηκε, αποτελείται από 8 επαναλήψεις της μίας από τις 3 αλληλουχίες που προέκυψαν από βιοπληροφορική ανάλυση και από έναν υποκινητή που εμπεριέχει την αρχική θέση μεταγραφής και την TATA αλληλουχία. Το πλασμίδιο, επίσης, εμπεριέχει ένα γονίδιο αναφοράς που θα παράγει πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη (gfp), ώστε να μπορεί να παρατηρηθεί *in vivo* η αλλαγή στη διατμητική τάση. Στη συνέχεια, εισήχθησαν στο πλασμίδιο στοιχεία του μεταθετού συστήματος *tol2*, τα οποία συμβάλλουν στη μεγαλύτερη αποδοτικότητα της διαγένεσης (από 1-3% που είναι τα ποσοστά διαγένεσης χωρίς τη χρήση αυτού του συστήματος προσεγγίζει στο 50% με τη χρήση του). Έπειτα, δημιουργήθηκε mRNA για την *tol2* μεταθετάση η οποία θα κόψει τα *tol2* άκρα με τελικό σκοπό να ενθέσει μόνο τα σημαντικά στοιχεία που προαναφέρθηκαν και βρίσκονται ανάμεσα σε αυτά τα άκρα και όχι σε ολόκληρο το πλασμίδιο.

Τα έμβρυα που είχαν επιτυχώς ενεθεί, τοποθετήθηκαν στο ενυδρείο ώστε να αναπτυχθούν και να γίνει έλεγχος των εμβρύων της F1 γενιάς. Δυστυχώς, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές πριν και μετά την επώαση με φαινυλεφρίνη, ούτε κάποια έκφραση της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης που να θεωρείται σχετική με τη διατμητική τάση.

Οι πιθανοί λόγοι που δεν είχαμε το επιθυμητό αποτέλεσμα είναι αρκετοί. Καταρχάς τα 52 υποψήφια γονίδια για τη διατμητική τάση που αναδύθηκαν από τη RNA-αλληλούχιση) και τη βιοπληροφορική ανάλυση για την εξαγωγή κοινών αλληλουχιών τους (έδωσαν 3 αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν), μπορεί να μην σχετίζονται όλα με τη διατμητική τάση, με συνέπεια να αλλοιώθηκαν τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης για τις αλληλουχίες που αφορούν τη διατμητική τάση. Επίσης, κατά τη βιοπληροφορική ανάλυση το βέλτιστο με βάση τη βιβλιογραφία θα ήταν να εξαχθούν κοινές αλληλουχίες δύο κατηγοριών: μία για τα γονίδια που προέκυψαν από τη RNA-αλληλούχιση και είχαν αυξημένες τιμές μεταγραφώματος και μία δεύτερη για τα γονίδια τα οποία είχαν μειωμένες τιμές μεταγραφώματος. Στη συγκεκριμένη περίπτωση δεν υπήρξε ο διαχωρισμός αυτός. Επιπρόσθετα, μπορεί να μην επιτεύχθηκε ο στόχος γιατί το μοτίβο που επιλέχθηκε (8 επαναλήψεις των αλληλουχιών με ένα κενό ανάμεσα τους) να μην είναι το κατάλληλο και να πρέπει να δοκιμαστούν διαφορετικά μοτίβα. Τέλος, ίσως να χρειαζόταν

μεγαλύτερος αριθμός εμβρύων με επιτυχείς ενέσεις ώστε να αυξηθούν οι πιθανότητες να ανιχνευθούν τα επιθυμητά διαγονιδιακά ψάρια.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR (2007) Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 87(2):521-544

Alexander J, Stainier DY (1999). A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish. *Curr Biol.* 1999 Oct 21;9(20):1147-57.

Alexander R.A., Garner A. (1983) Elastic and precursor fibres in the normal human eye. *Exp. Eye Res.* 36:305–315

Anversa P, Kajstura J, Leri A, Bolli R (2006) Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113(11):1451-1463

Arber, W. (1965). Host-Controlled Modification of Bacteriophage. *Annual Review of Microbiology* 19, 365-378.

Armentano R, Simon A, Levenson J, Nguyen PC, Megnien JL, Pichel R. (1991) Mechanical pressure versus intrinsic effects of hypertension on large arteries in humans. *Hypertension.* 18: 657–664

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999;18(14):3964–3972. doi:10.1093/emboj/18.14.3964

Auer TO, Del Bene F, (2014) CRISPR/Cas9 and TALEN--mediated knock--in approaches in zebrafish. *Methods.* 69(2):142--- 50.

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

Baker K, Holtzman NG, Burdine RD. (2008) Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;105(37):13924-9.

Bakkers, J. (2011) Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* 91(2): 279-88.

Bartman T, Hove J (2005) Mechanics and function in heart morphogenesis. *Dev Dyn.* 233(2):373-381

Bartman, T., Walsh, E.C., Wen, K.K., McKane, M., Ren, J., Alexander, J., Rubenstein, P.A., Stainier, D.Y., (2004) Early myocardial function affects endocardial cushion development in zebrafish. *PLoS Biol.* 2, E129.

Bashur CA, Venkataraman L, Ramamurthi A. (2012) Tissue engineering and regenerative strategies to replicate biocomplexity of vascular elastic matrix assembly. *Tissue Eng Part B Rev.* 18(3):203–217. doi:10.1089/ten.TEB.2011.0521

Becker JR, Deo RC, Werdich AA, Panakova D, Coy S, MacRae CA (2011) Human cardiomyopathy mutations induce myocyte hyperplasia and activate hypertrophic pathways during cardiogenesis in zebrafish. *Dis Model Mech.* 4(3):400-410

Beis D, Bartman T, Jin SW, Scott IC, D'Amico LA, Ober EA, Verkade H, Frantsve J, Field HA, Wehman A, Baier H, Tallafuss A, Bally-Cuif L, Chen JN, Stainier DY, Jungblut B (2005) Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development. *Development* 132(18):4193-4204

Berdougo E, Coleman H, Lee DH, Stainier DY, Yelon D (2003) Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development* 130(24):6121-6129

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of Bip and ER stress transducers in the unfolded- protein response. *Nat Cell Biol* 2: 326–332

Bird IM (2005) Extraction of RNA from cells and tissue. *Methods Mol. Med.* 108: 139–48

Blackburn PR, Campbell JM, Clark KJ, Ekker SC, (2013), The CRISPR System—Keeping Zebrafish Gene Targeting Fresh. *Zebrafish* 10(1):116--- 8.

Bourmele D, Beis D (2016) Zebrafish models of cardiovascular disease. *Heart Fail Rev.* (6):803-813

Braun, M.H., Brill, R.W., Gosline, J.M., Jones, D.R., (2003). Form and function of the bulbus arteriosus in yellowfin tuna (*thunnus albacares*): dynamic properties. *L. Environ. Biol.* 206: 3327-3335

Breckenridge, D.G. et al., (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *The Journal of cell biology*, 160, pp.1115–1127

Brown DR, Samsa LA, Qian L, Liu J (2016) Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. *J Cardiovasc Dev Dis* 3: 13, doi:10.3390/jcdd3020013.

Bussmann, J., Bakkers, J., and Schulte-Merker, S. (2007) Early Endocardial Morphogenesis Requires Scl/Tal1. *PLoS Genet.* 3(8): e140.

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

Chen, J.-N. and Fishman, M. C. (1996). Zebrafish tinman homolog demarcates the heart field and initiates myocardial differentiation. *Development* 122, 3809-3816

Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman Ma, Medford RM, Jaiswail AK, Kunsch C. (2003) Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *J Biol chem*278:703-711.

Chiang, D. Y., Zhang, M., Voigt, N., Alsina, K. M., Jakob, H., Martin, J. F., Dobrev, D., Wehrens, X. H., & Li, N. (2015). Identification of microRNA-mRNA dysregulations in paroxysmal atrial fibrillation. *Int J Cardiol.* 184, 190–197.

Chico TJ, Ingham PW, Crossman DC (2008) Modeling cardiovascular disease in the zebrafish. *Trends Cardiovasc Med.* 18(4):150-155

Choi WY, Gemberling M, Wang J, Holdway JE, Shen MC, Karlstrom RO, Poss KD (2013) In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. *Development* 140(3):660-666

Coons AH, Creech HJ, Jones RN (1941) Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 47: 200-202.

Cooper, M.S. and D'Amico, L.A. (1996) A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation. *Dev. Biol.* 180(1): 184-198.

D'Amico L. A., Cooper M. S. (1997). Spatially distinct domains of cell behavior in the zebrafish organizer region. *Biochem. Cell Biol.* 75, 563-577 *Developing Heart. PLoS Biol* 7(11) Development, December 1996

Dang, M., Fogley, R., & Zon, L. I. (2016). Identifying Novel Cancer Therapies Using Chemical Genetics and Zebrafish. *Advances in experimental medicine and biology*, 916, 103–124. doi:10.1007/978-3-319-30654-4_5

de Campos-Baptista MI, Holtzman NG, Yelon D, Schier AF. (2008) Nodal signaling promotes the speed and directional movement of cardiomyocytes in zebrafish. *Dev Dyn.* Dec 237(12):3624-33

Dooley K. & Zon L.I. (2000), Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*10(3): 252-256

Ellgaard, L., Molinari, M. & Helenius, A., (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science (New York, N.Y.)*, 286, pp.1882–8.

Engel FB, Schebesta M, Duong MT, Lu G, Ren S, Madwed JB, Jiang H, Wang Y, Keating MT (2005) p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19(10):1175-1187

Evans, D.H., Harrie, A.C., Kozlowski, M.S., (2003) Characterization of the effects of vasoactive substances on the bulbus arteriosus of the eel, *Anguilla rostrata*. *J. Exp. Boil.*, 297A: 45-51

Farrell ET, Grimes AC, de Lange WJ, Armstrong AE, Ralphe JC. (2017) Increased Postnatal Cardiac Hyperplasia Precedes Cardiomyocyte Hypertrophy in a Model of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Front Physiol.* 8:414. Published 2017 Jun 14. doi:10.3389/fphys.2017.00414

Farrell, A.P., (1996) Features heightening cardiovascular performance in fishes, with special reference to tunas. *Comp. Biochem. Physiol.* A113: 61–67

Farrell, A.P.,(2001a) From hagfish to tuna: a perspective on cardiac function. *Physiol. Zool.* 64: 1137-1164

Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D. L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., & Zhu, J. K. (2013). Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research*, 23(10), 1229–1232. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.114>

Fewell, S.W. et al., (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annual review of genetics*, 35, pp.149–191

Fishman MC & Chien KR., (1997) Fashioning the vertebrate heart: Earliest embryonic decisions. *Development* 124(11): 2099-2117

Foglia MJ, Poss K (2016) Building and re-building the heart by cardiomyocyte proliferation. *Development* 143(5):729-740

Gaurav K. et al., (2015) High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Res.* 25(7):1030-42.

Gething MJ (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol.* 10:465-72

Glembotski CC (2008) The role of the unfolded protein response in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 44: 453-459

Glickman, N.S. and Yelon, D. (2002) Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13(6): 507-513.

Gorelick D. and Halpern M. (2014) Probing the actions of endocrine disrupting compounds through genetic approaches in zebrafish, *Endocrine Disruptors*, 2:1, DOI: 10.4161/23273747.2014.975547

Gosline J, Lillie M, Carrington E, Guerette P, Ortlepp C, Savage K. (2002) Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 357(1418):121-132. doi:10.1098/rstb.2001.1022

Gupta MP, Amin CS, Gupta M, Hay N, Zak R. (1997) Transcription enhancer factor 1 interacts with a basic helix-loop-helix zipper protein, Max, for positive regulation of cardiac alpha-myosin heavy-chain gene expression. *Mol Cell Biol.* 17(7):3924-3936. doi:10.1128/mcb.17.7.3924

Hammadi, M. et al., (2013) Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: involvement of GRP78. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27, pp.1600-9.

Hendricks M, Sun X, Hoage T, Bai P, Ding Y, Chen Z, Zhang R, Huang W, Jahangir A, Paw B (2009) Cardiac Hypertrophy Involves Both Myocyte Hypertrophy and Hyperplasia in Anemic Zebrafish. *PloS One* 4(8):e6596

Hirose et al., (2019) Evidence for hormonal control of heart regenerative capacity during endothermy acquisition *Science* Vol. 364, Issue 6436, pp. 184-188. doi:10.1126/science.aar2038.

Hoar W.S., Randall D.J. and Farrell AP., (1992) *The Cardiovascular System*. Academic Press, London, p.p. 1-88 <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.11.022>.

Hoffman JI, Kaplan S, Liberthson RR. (2004) Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J.* 147(3):425-39.

Holtzman, N.G., Schoenebeck, J.J., Tsai, H.J., and Yelon, D. (2007) Endocardium is necessary for cardiomyocyte movement during heart tube assembly. *Development* 134(13): 2379-2386.

Hove JR, Koster RW, Forouhar AS, Acevedo-Bolton G, Fraser SE, et al. (2003) Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature.* 421:172–177

Howe, K., Clark, M., Torroja, C. et al. (2013) The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* 496, 498–503 doi:10.1038/nature12111

Icardo, M.J, Colvee, E., Cerra, M.C., Tota, B., (1999) Bulbus arteriosus of the Antarctic Teleost. I. The white-blooded *Chionodraco hamatus*. *The anatomical record* 254: 396-407

Icardo, M.J, Schib J.L., Ojeda J.L., Duran A.C., Guerrero A., Colvee E., Amelio D. and Sans-Coma V., (2003) The conus valves of the adult gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *J. Anat.* 202: 537-550

Isenberg BC, Tranquillo RT (2003) Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media equivalents. *Ann Biomed Eng* 2003;31:937-949

Isogai S.H.M & Weinstein B.M., (2001) The vascular anatomy of the developing zebrafish: An atlas of embryonic and early larval development. *Dev. Biol.* 230(2): 278.-301

Jean MJ, Deverteuil P, Lopez NH, Tapia JD, Schoffstall B. (2012) Adult zebrafish hearts efficiently compensate for excessive forced overload cardiac stress with hyperplastic cardiomegaly. *Biores Open Access.* 1(2):88–91. doi:10.1089/biores.2012.0201

Jin SW, Beis D, Mitchell T, et al.: (2005) Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development* 132:5199–5209.

Jing, L. (2011) Real Time Quantitative PCR Bio-101: e27. DOI: 10.21769/BioProtoc.27.

Jing, L. (2012) Zebrafish Embryo DNA Preparation. Bio-101: e184. DOI: 10.21769/BioProtoc.184.

Kalogirou S, Malissovass N, Moro E, Argenton F, Stainier DY, Beis D (2014) Intracardiac flow dynamics regulate atrioventricular valve morphogenesis. *Cardiovasc Res* 104(1):49-60

Kane D, Kimmel C (1993) "The zebrafish midblastula transition". *Development* 119 (2): 447–456

Kane, D.A., Hammerschmidt, M., Mullins, M.C., Maischein, H.M., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kelsh, R.N., Odenthal, J., Warga, R.M., and Nüsslein-Volhard, C. (1996) The zebrafish epiboly mutants. *Development*. 123:47-55

Karnik SK, Brooke BS, Antonio BG, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY (2003) A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development* 130(2):411-423

Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. (2005) Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science*. 307:247–249

Keegan BR, Meyer D, Yelon D. (2004) Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development*. 131:3081–3091

Keeley FW, Bellingham CM, Woodhouse KA (2002). "Elastin as a self-organizing biomaterial: use of recombinantly expressed human elastin polypeptides as a model for investigations of structure and self-assembly of elastin". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. 357 (1418): 185–9. doi:10.1098/rstb.2001.1027

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA (2002) "Elastic fibres". *Journal of Cell Science*. 115: 2817–28. PMID 12082143

Kikuchi K, Holdway J. E, Major R. J, Blum N, Dahn R. D, Begemann G, Poss K. D. (2011) Retinoic acid production by endocardium and epicardium is an injury response essential for zebrafish heart regeneration. *Developmental cell*, 20(3), 397-404.

Kim BS, Nikolovski J, Bonadio J, Mooney DJ. (1999) Cyclic mechanical strain regulates the development of engineered smooth muscle tissue. *Nat Biotechnol* 1999;17:979–83

Kimmel C.B., and Law R.D., (1985) Cell lineage of zebrafish blastomeres. II. Formation of the yolk syncytial layer. *Dev. Biol.* 108: 86-93.

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

Kierszenbaum A., Tres L. (2011), Ιστολογία με στοιχεία Κυτταρικής Βιολογίας, ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ

Kithcart A, MacRae CA. (2017) Using Zebrafish for High-Throughput Screening of Novel Cardiovascular Drugs. *JACC Basic Transl Sci.* 2(1):1–12. Published 2017 Feb 27. doi:10.1016/j.jacbts.2017.01.004

Konno, T., Chang, S., Seidman, J. G., & Seidman, C. E. (2010). Genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Current opinion in cardiology*, 25(3), 205–209. <https://doi.org/10.1097/HCO.0b013e3283375698>

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.

Lee AS (2005) The ER chaperone and signaling regulator GRP78/bip as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods* 35: 378–381

Li F WX, Bunger PC, Gerdes AM (1997) Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I., role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol.* 29, 1541-1551

Liebling, M., Forouhar, A.S., Wolleschensky, R., Zimmermann, B., Ankerhold, R., Fraser, S.E., Gharib, M., and Dickinson, M.E. (2006) Rapid three-dimensional imaging and analysis of the beating embryonic heart reveals functional changes during development. *Dev. Dyn.* 235(11): 2940-2948.

Lipinski CA.(2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 44(1):235-49.

Liu D-W, Hsu C-H, Tsai S-M, Hsiao C-D, Wang W-P (2011) A Variant of Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (Fgfr2) Regulates Left-Right Asymmetry in Zebrafish. *PLoS ONE* 6(7)

Lu P.D, Jousse C, Marciniak S.J., Zhang Y, Novoa I, Scheuner D, Kaufman R.J., Ron D., Harding H.P. (2004) Cytoprotection by pre-emptive conditional phosphorylation of translation initiation factor 2. *EMBO J* 23: 169–179

Ma, Y. et al., (2002) Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *Journal of Molecular Biology*, 318, pp.1351–1365.

MacRae CA, Peterson RT. (2015) Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 14(10):721–731.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., & Church, G. M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>

Marciniak SJ, Ron D. (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev*. 86:1133–1149

McGrath MF, de Bold ML, de Bold AJ (2005) The endocrine function of the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 16(10):469-77

McNally EM, Mestroni L (2017) Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res*121(7):731-748

McMahon G (2000) VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 5:3–10

Melby A. E., Warga R. M., Kimmel C. B. (1996) Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula. *Development* 122, 2225-2237

Miao M, Bruce AE, Bhanji T, Davis EC, Keeley FW (2007) Differential expression of two tropoelastin genes in zebrafish. *Matrix Biol* 26(2):115-124

Milan, D.J., Giokas, A.C., Serluca, F.C., Peterson, R.T., and MacRae, C.A. (2006) Notch1b and neuregulin are required for specification of central cardiac conduction tissue. *Development (Cambridge, England)*. 133(6):1125-1132.

Millauer B. et al., (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Volume 72, ISSUE 6, P835-846.*

Micheletti A. (2019) Congenital Heart Disease Classification, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Outcome. *Congenital Heart Disease*.

Miyazaki Y, Kaikita K, Endo M, Horio E, Miura M, Tsujita K., Hokimoto S, Yamamuro M, Iwawaki T, Gotoh T, Ogawa H, Oike Y. (2011) C/EBP homologous protein deficiency attenuates myocardial reperfusion injury by inhibiting myocardial apoptosis and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1124–1132

Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN (1997) Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 1997 Apr 15;11(8):1061-72.

Muiznieks L. and Keeley F., (2013) Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Volume 1832, Issue 7, Pages 866-875

Nemtsas P, Wettwer E, Christ T, Weidinger G, Ravens U (2010) Adult zebrafish heart as a model for human heart? An electrophysiological study. *J Mol Cell Cardiol.* 48(1):161-171

Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. (2004) Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic. *Circulation* 110: 705–712

Okada T, Inoue R, Yamazaki K, Maeda A, Kurosaki T, Yamakuni T, Tanaka I, Shimizu S, Ikenaka K, Imoto K, Mori Y., (1999) Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* 1999 Sep 24;274(39):27359-70.

Olivetti G., Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P (1996) Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 28, 1463-1477

Olivetto I, d'Amati G, Basso C, Van Rossum A, Patten M, Edmin, Pinto Y, Tomberli B, Camici PG, Michels M (2015) Defining phenotypes and disease progression in sarcomeric cardiomyopathies; contemporary role of clinical investigations. *Cardiovasc Res* 1;105(4):409-23

Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P., (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4, pp.552–565

Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K (2006) Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res* 71(1):40-49

Peralta, M., González-Rosa, J. M., Marques, I. J., & Mercader, N. (2014). The Epicardium in the Embryonic and Adult Zebrafish. *J Dev Biol*, 2(2), 101–116. <https://doi.org/10.3390/jdb2020101>

Peyriiras, N., Ströhle, U., and Rosa, F. (1998) Conversion of zebrafish blastomeres to an endodermal fate by TGF- β -related signaling. *Curr. Biol.* 8: 783-786.

Poss KD, Wilson LG, Keating MT (2002) Heart regeneration in zebrafish. *Science* 13;298(5601):2188-90

Poss KD (2007) Getting to the heart of regeneration in zebrafish, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Volume 18, Issue 1,2007, Pages 36-45, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.11.009>.

Raghunath A, Sundarraj K, Nagarajan R, Arfuso F, Bian J, Kumar A, Sethi G, Perumal E, (2018) Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications, *Redox Biology*, Volume 17, Pages 297-314, ISSN 2213-2317, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.05.002>.

Rao, R. V et al., (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp.21836–21842.

Reiter JF, Verkade H, Stainier DY (2001). Bmp2b and Oep promote early myocardial differentiation through their regulation of gata5. *Dev Biol.* 234:330–338

Rivello HG, Meckert PC, Vigliano C, Favalaro R, Laguens RP (2001) Cardiac myocyte nuclear size and ploidy status decrease after mechanical suport. *Cardiovasc Pathol.* 10, 53-57

Rizzuto, R., Duchen, M.R. & Pozzan, T., (2004) Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2004, p.re1

Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. (2015) REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue):D298–D299. doi:10.1093/nar/gku1046

Sambrook J et al., (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*.

Σαράντη Π., (2012) ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΟ ZEBRAFISH Μεταπτυχιακή εργασία

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

Schröder, M. & Kaufman, R.J., (2005) The mammalian unfolded protein response. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.739–789

Sedmera D, Hu N, Weiss KM, Keller BB, Denslow S, Thompson RP (2002) Cellular changes in experimental left heart hypoplasia. *Anat Rec* 267(2):137-145.

Seidman JG and Seidman C (2001) The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*, Vol 104, 557–567

Shalaby F. et al., (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* volume 376, pages62–66

Sharma, N., Anleu Gil, M. X. and Wengier, D. (2017) A Quick and Easy Method for Making Competent Escherichia coli Cells for Transformation Using Rubidium Chloride. *Bio-101*: e2590. DOI: 10.21769/BioProtoc.2590.

Shibuya M. (2006) Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol*. 2006 Sep 30;39(5):469-78.

Shih, J. and Fraser, S. E. (1995). Distribution of tissue progenitors within the shield region of the zebrafish gastrula. *Development* 121, 2755-2765.

Singleman C and Holtzman N. G. (2012) Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 241(12), 1993-2004

Sokolis DP, Kefaloyannis EM, Kouloukoussa M, Marinos E, Boudoulas H, Karayannacos PE (2006). A Structural Basis for the Aortic Stress-Strain Relation in Uniaxial Tension. *Journal of Biomechanics* 39: 1651-1662.

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

Stainier, D.Y.R. and Fishman, M.C. (1992) Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. *Dev. Biol.* 153: 91-101.

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

Stoyek, M.R., Croll, R.P., Smith, F.M. (2015) Intrinsic and extrinsic innervation of the heart in zebrafish (*Danio rerio*). *The Journal of comparative neurology*. 523(11):1683-700.

Sun X, Hoage T, Bai P, Ding Y, Chen Z, Zhang R, Huang W, Jahangir A, Paw B, Li Y. G, Xu, X. (2009) Cardiac hypertrophy involves both myocyte hypertrophy and hyperplasia in anemic zebrafish. *PloS one*, 4(8), e6596. doi:10.1371/journal.pone.0006596

Susaki EA, Tainaka K, Perrin D, Yukinaga H, Kuno A, Ueda HR (2015) Advanced CUBIC protocols for whole -brain and whole-body clearing and imaging. *Nat Protoc* 10(11):1709-1727

Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney M.E., Logue S.E, Mylotte L.A, O'Brien T, Samali A. (2006) ER stress contributes to ischemia- induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 349: 1406–1411

Tay S., Kuah M.K., Shu-Chien A.C. (2018) Transcriptional activation of zebrafish *fads2* promoter and its transient transgene expression in yolk syncytial layer of zebrafish embryos *Sci. Rep.*, 8 p. 3874

Thisse, C. and Thisse, B. (2008) High resolution in situ hybridization on whole-mount zebrafish embryo. *Nat. protoc.* 3 : 59 – 69

Tregnago, C., Aveic, S., Manara, E., Pigazzi, M., & Basso, G. (2012) The cAMP Response Element Binding Protein (CREB) Overexpression Induces Myeloid Transformation in Zebrafish. *Blood*, 120(21), 4727. Accessed September 24, 2019.

Trinh, L.A., and Stainier, D.Y. (2004) Cardiac development. *The Zebrafish: Cellular and Developmental Biology*, 2nd Ed. *Methods Cell Biol.* 76:455-473

Ushioda R, Hoseki J, Araki K, Jansen G, Thomas DY, Nagata K (2008) ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER. *Science* 321, 569–572

Van der Heiden K, Groenendijk BC, Hierck BP, Hogers B, Koerten HK, et al. (2006) Monocilia on chicken embryonic endocardium in low shear stress areas. *Developmental Dynamics.* 235:19–28.

Vander A., Sherman J., Luciano D., Τσακόπουλος M. (2001) Φυσιολογία του ανθρώπου- Μηχανισμοί της λειτουργίας του οργανισμού. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδη.

Vermot J, Forouhar AS, Liebling M, Wu D, Plummer D, et al. (2009) Reversing Blood Flows Act through *klf2a* to Ensure Normal Valvulogenesis in the Developing Heart. *PLoS Biol* 7(11)

Vitale M, Bakunts A, Orsi A, et al. (2019) Inadequate BiP availability defines endoplasmic reticulum stress. *Elife.* 8:e41168. Published 2019 Mar 14. doi:10.7554/eLife.41168

Voeltz, G.K., Rolls, M.M. & Rapoport, T.A., (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO reports*, 3, pp.944–950

Walsh EC, Stainier DY (2001) UDP-glucose dehydrogenase required for cardiac valve formation in zebrafish. *Science*. 2001 Aug 31;293(5535):1670-3.

Wang, G., Rajpurohit, S. K., Delaspre, F., Walker, S. L., White, D. T., Ceasrine, A., Kuruvilla, R., Li, R. J., Shim, J. S., Liu, J. O., Parsons, M. J., & Mumm, J. S. (2015). First quantitative high-throughput screen in zebrafish identifies novel pathways for increasing pancreatic β -cell mass. *eLife*, 4, e08261. <https://doi.org/10.7554/eLife.08261>

Wang J, Poss KD (2016) Methodologies for Inducing Cardiac Injury and Assaying Regeneration in Adult Zebrafish. *Methods Mol Biol*. 2016;1451:225-35

Wang S, Binder P, Fang Q, Wang Z, Xiao W, Liu W, Wang X. (2018) Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets. *Br J Pharmacol* 175: 1293–1304. doi: 10.1111/bph.13888

Westerfield M (2000) *The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene

Wiley DS, Redfield SE, Zon LI. Chemical screening in zebrafish for novel biological and therapeutic discovery. (2017) *Methods Cell Biol*. 138:651–679. doi:10.1016/bs.mcb.2016.10.004

Wills AA, Holdway JE, Major RJ, Poss KD (2008) Regulated addition of new myocardial and epicardial cells fosters homeostatic cardiac growth and maintenance in adult zebrafish. *Development* 135(1):183-192

Yelon, D., Horne, S.A., and Stainier, D.Y.R. (1999) Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish. *Dev. Biol*. 214(1): 23-37.

Zebrafish in the World: A Review of Natural History and New Notes from the Field; Zebrafish. (2007); 4: 1.

Zebrowski DC, Engel FB (2013) The cardiomyocyte cell cycle in hypertrophy, tissue homeostasis, and regeneration. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 165:67-96

Zhang R, Han P, Yang H, Ouyang K, Lee D, Lin YF, Ocorr K, Kang G, Chen J, Stainier DY (2013) In vivo cardiac reprogramming contributes to Zebrafish heart regeneration. *Nature* 498(7455):497-501

Zon LI, Peterson RT. In vivo drug discovery in the zebrafish. (2005) *Nature Reviews Drug Discovery*. 4(1):35–44.

7.ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΑΡΑΝΤΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΓΕΝΝΗΣΗΣ: 7/7/1981
ΔΙΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΛΑΤΑΙΩΝ 16, ΒΡΙΛΗΣΣΙΑ Τ.Κ.: 15235
ΤΗΛΕΦΩΝΟ: 6932855541
E-MAIL: panayotissarantis@gmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΣΤΟ ΙΙΒΕΑΑ ΜΕ ΘΕΜΑ « Μελέτη μηχανισμών καρδιοπαθειών χρησιμοποιώντας το Zebrafish ως πειραματικό μοντέλο»
12/2012 -

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ - ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΞΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ Ε.Κ.Π.Α. : « ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΙΑΤΡΙΚΗ»
10/2010-10/2012 ΒΑΘΜΟΣ: ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ (8,3)

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ-ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ-ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
2/2006-10/2010 ΒΑΘΜΟΣ: ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ (6,9)

Τ.Ε.Ι. ΑΘΗΝΑΣ-ΣΧΟΛΗ ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΠΡΟΝΟΙΑΣ-ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΣΤΗΡΙΩΝ
3/2002-10/2005 ΒΑΘΜΟΣ: ΛΙΑΝ ΚΑΛΩΣ (8,3)

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΫΠΗΡΕΣΙΑ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΤΟ ΣΙΣΜΑΝΟΓΛΕΙΟ Γ.Ν.Α. ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΑ ΣΤΟ ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ 1 ΕΤΟΥΣ 10/2009-10/2010
✓ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ ΣΕ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΕΞΑΣΚΗΣΗ ΣΤΟ 401 Γ.Σ.Ν.Α. ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ 6 ΜΗΝΩΝ 4/2009-10/2009 ΣΤΑ ΕΞΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ:

- ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ
- ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ
- ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ
- ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ
- ΑΙΜΟΔΟΣΙΑΣ

ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΕΞΑΣΚΗΣΗ ΣΤΟ ΣΙΣΜΑΝΟΓΛΕΙΟ Γ.Ν.Α ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ 6 ΜΗΝΩΝ 10/2004-4/2005
ΣΤΑ ΕΞΗΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ:

- ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ
- ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ
- ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ
- ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ
- ΦΥΜΑΤΙΩΣΗΣ
- ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΟ

ΓΛΩΣΣΙΚΕΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

- **ΠΟΛΥ ΚΑΛΗ ΓΝΩΣΗ ΑΓΓΛΙΚΗΣ ΓΛΩΣΣΑΣ : Certificate of Competency in English**
- **ΑΡΙΣΤΗ ΓΝΩΣΗ Η/Υ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ HARDWARE ΚΑΙ SOFTWARE : ΚΑΤΟΧΟΣ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΤΙΚΟΥ ΓΝΩΣΕΩΝ Η/Υ ECDL CORE.**
- **ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗ : ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΕΣ ΚΑΙ ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ, ΧΡΗΣΗ ΚΡΥΟΤΟΜΟΥ-ΜΙΚΡΟΤΟΜΟΥ-VIBRATOME, CONFOCAL, ΟΠΤΙΚΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ, ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΙΚΟΝΩΝ (IMAGEJ-IMARIS), TISSUE DISSOCIATION, ZEBRAFISH HANDLING AND MAINTENANCE, CELL LINES CULTURE, EXPLANT CULTURE OF ADULT ZEBRAFISH HEART, WESTERN BLOT, DNA-RNA EXTRACTION, PCR ΚΑΙ RT-PCR, CLONING ΚΑΙ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΜΕ TOL2 ΣΥΣΤΗΜΑ ΚΑΙ CRISPR/CAS9, MICROINJECTIONS, ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ PROBES, IN SITU HYBRIDIZATION, DNA SEQUENCING, ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ (SNAP GENE, UNIPROT, BLAST, GENOMATIX, CHROMAS), DRUG SCREENING (ΣΕ ZEBRAFISH ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΙΝΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ)**
- **ΚΑΤΟΧΟΣ ΠΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΧΕΙΡΙΣΜΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ – FELASA A,B,C,D FUNCTIONS**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ - ΣΥΝΕΔΡΙΑ

- ✓ ΓΙΑ ΤΟ Μ.Δ.Ε. ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΘΕΜΑ « Η ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΡΙΣΤΕΡΗΣ – ΔΕΞΙΑΣ ΑΣΥΜΜΕΤΡΙΑΣ ΤΗΣ ΚΑΡΔΙΑΣ ΣΤΟ ZEBRAFISH»
- ✓ ΓΙΑ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ Ε.Κ.Π.Α. : «ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ HSP70 ΣΕ ΕΓΚΕΦΑΛΟ, ΗΠΑΡ ΚΑΙ ΝΕΦΡΟΥΣ ΜΥΩΝ *Mus musculus* C57BL/6 ΕΠΕΙΤΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΜΑΓΝΗΤΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΑΣΥΡΜΑΤΟΥ ΤΗΛΕΦΩΝΟΥ ΤΥΠΟΥ DECT»
- ✓ ΓΙΑ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ ΤΟΥ Τ.Ε.Ι ΑΘΗΝΑΣ : «ΙΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ (HPV) : ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ»
- ✓ “MODELS OF CARDIOVASCULAR DISEASE” ΑΝΑΡΤΗΣΗ POSTER ΣΤΟ 8^ο ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΣΥΝΕΔΡΙΟ Zebrafish 2013, Barcelona

- ✓ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΡΤΗΣΗ POSTER ΣΤΟ 39^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΗΣ ΕΕΒΕ ΤΟ 2012 ΣΤΑ ΤΡΙΚΑΛΑ ΜΕ ΘΕΜΑ «ΤΟ ZEBRAFISH (*Danio rerio*) ΩΣ ΠΡΟΤΥΠΟΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ»
- ✓ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟ 37^ο ΣΥΝΕΔΡΙΟ ΤΗΣ ΕΕΒΕ 2010 ΣΤΟ ΚΑΡΠΕΝΗΣΙ ΜΕ ΑΝΑΡΤΗΣΗ POSTER
- ✓ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ ΤΗΣ ΕΕΒΕ ΑΠΟ ΤΟ 2006 ΩΣ ΤΟ 2012
- ✓ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΗΜΕΡΙΔΑΣ «ΥΠΗΡΕΣΙΕΣ ΕΛΕΓΧΟΥ DOPING»
- ✓ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ 1^ο ΔΙΕΘΝΟΥΣ ΣΥΝΕΔΡΙΟΥ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Sarantis, P., Gaitanaki, C. & Beis, D. Ventricular remodeling of single-chambered myh6^{-/-} adult zebrafish hearts occurs via a hyperplastic response and is accompanied by elastin deposition in the atrium. *Cell Tissue Res* (2019). doi.org/10.1007/s00441-019-03044-4

Papakyriakou A, Kefalos P, Sarantis P, et al. A Zebrafish *In Vivo* Phenotypic Assay to Identify 3-Aminothiophene-2-Carboxylic Acid-Based Angiogenesis Inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies* (2014) doi:10.1089/adt.2014.606.

8.ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Ventricular remodeling of single-chambered *myh6*^{-/-} adult zebrafish hearts occurs via a hyperplastic response and is accompanied by elastin deposition in the atrium

Panagiotis Sarantis^{1,2} · Catherine Gaitanaki² · Dimitris Beis¹

Received: 24 July 2018 / Accepted: 7 May 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Zebrafish (*Danio rerio*) is widely used as an animal model to understand the pathophysiology of cardiovascular diseases. Here, we present the adult cardiac phenotype of *weak atrium, myh6*^{-/-}, which carry mutations in the zebrafish atrial myosin heavy chain. Homozygous mutants survive to adulthood and are fertile despite their initial weak atrial beat. In adult mutants, the atrium remains hypoplastic and shows elastin deposition while mutant ventricles exhibit increased size. In mammals, hypertrophy is the most common mechanism resulting in cardiomegaly. Using immunohistochemistry and confocal microscopy to measure cardiomyocyte cell size, density and proliferation, we show that the enlargement of the *myh6*^{-/-} ventricle is predominantly due to hyperplasia. However, we identified similar transcriptional profiles to the mammalian hypertrophy response via RT-PCR of the hyperplastic ventricles. Furthermore, we show activation of the ER-stress pathway by western blot analysis. In conclusion, we can assume, based on our model, that molecular signaling pathways associated with hypertrophy in mammals, in combination with ER-stress activation, result in hyperplasia in zebrafish. In addition, to our knowledge, this is the first time to report elastin deposition in the atrium.

A Zebrafish *In Vivo* Phenotypic Assay to Identify 3-Aminothiophene-2-Carboxylic Acid-Based Angiogenesis Inhibitors

Athanasios Papakyrriakou,^{1,*} Panagiotis Kefalos,^{2,*} Panagiotis Sarantis,^{2,*} Christos Tsiamantas,¹ Kleonthis P. Xanthopoulos,¹ Dionisios Vourfoumis,¹ and Dimitris Beis²

¹Laboratory of Chemical Biology of Natural Products and Designed Molecules, NCSR Demokritos, Athens, Greece.

²Developmental Biology, Biomedical Research Foundation Academy of Athens, Athens, Greece.

*These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Small molecules that inhibit angiogenesis are attractive drug candidates for cancer, retinopathies, and age-related macular degeneration. *In vivo*, phenotypic screening in zebrafish (*Danio rerio*) emerges as a powerful methodology to identify and optimize novel compounds with pharmacological activity. Zebrafish provides several advantages for *in vivo* phenotypic screens especially for angiogenesis, since it develops rapidly, externally, and does not rely on a functional cardiovascular system to survive for several days during development. In this study, we utilize a transgenic line that allows the noninvasive monitoring of angiogenesis at a cellular level. The inhibition of angiogenesis can be observed under a fluorescent stereoscope and quantified. To exemplify the versatility and robustness of the zebrafish screen, we have employed a series of 60 novel compounds that were designed based on a potent VEGFR2 in-

signal transduction and in the promotion of angiogenesis. The growth factor binds to the extracellular domain of VEGFR2 and facilitates dimerization of the receptor. The intracellular part consists of the tyrosine kinase domain and the carboxyl terminus domain, which get autophosphorylated upon dimerization to initiate the signal transduction pathways that lead to angiogenesis. VEGFR2 is expressed as early as the first embryonic stages and persists until adulthood in endothelial cells. During development, VEGFR2 is responsible for the proliferation of endothelial cells and is also highly expressed in tumor vascular networks. Therefore, VEGFR2 has been proposed as a target to inhibit blood vessel formation in growing tumors.³

Zebrafish express four receptors that regulate angiogenesis: Flt1, Kdr, Kdr-like (kdr1), and Flt4 are highly homologous to the human receptors.⁴ Different combinations of these enzymes regulate the development of the various vessels in the developing embryo. The zebrafish angiogenesis pattern is highly stereotypical, tightly regulated, and well described at the cellular resolution during development.⁵ In addition, zebrafish embryos can survive and develop normally for the first 4 days even in the absence of a vascular system, as in the *cloche* mutant, or in the absence of circulation due to a noncontractile heart, as in the *silent heart* mutant.^{6,7} Other advantages of the zebrafish embryos include (a) small size, (b) rapid development, (c) the ability to conduct noninvasive observations due to their transparent nature, and (d) the availability of transgenic and reporter lines that